

# Un nouveau dialogue entre les neutrophiles et Snail dans les cellules tumorales orchestre la progression de l'adénocarcinome pulmonaire

Rapport final

*Etienne Meylan*

## Introduction

Peu de temps après la soumission de notre proposition de recherche, nous avons publié une étude importante, initiée par une exploration de la signature immunitaire de la tumeur pulmonaire des souris *Kras*<sup>LoxSTOPLox-G12D/WT</sup>; *p53*<sup>Flox/Flox</sup> (KP). Nous avons trouvé une fonction pro-tumorale pour les neutrophiles et identifié un dialogue entre les neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) et les cellules tumorales, les TAN entraînant une augmentation de l'expression du facteur de transcription Snail dans les cellules tumorales ; à son tour, une augmentation de la quantité de Snail favorise le recrutement des neutrophiles dans les tumeurs et accélère la progression de la maladie (Faget *et al.*, 2017). Ce projet a généré de nombreuses nouvelles questions de recherche que mon laboratoire est en train et continuera d'examiner durant les 5 à 10 prochaines années de recherche. Au cours de cette année de soutien, nous avons commencé à aborder certaines de ces questions. Celles-ci sont développées ci-dessous.

## Résultats

### L'activité de Snail dans les cellules tumorales module l'expression du locus *Dlk1-Dio3* dans les cellules immunitaires.

Afin de déterminer comment Snail régule le recrutement des neutrophiles, nous avons effectué un profil d'expression génique des tumeurs du poumon présentant des niveaux normaux, réduits ou augmentés de Snail dans les cellules tumorales. De manière surprenante, nous avons constaté que plusieurs gènes réprimés par l'activité de Snail appartiennent à un locus génomique spécifique, appelé « *Dlk1-Dio3* ».

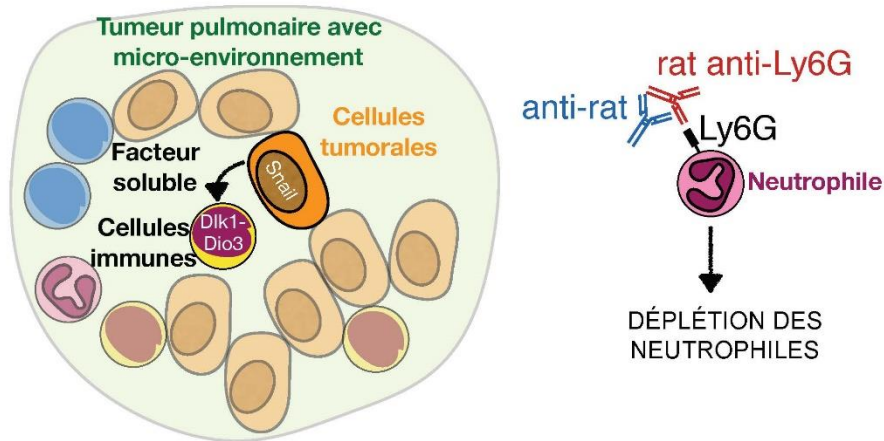
Intrigués par ces observations, nous avons décidé d'interroger les mécanismes sous-jacents. Pour ce faire, nous avons induit Snail *in vitro* dans des lignées cellulaires dérivées de tumeurs humaines et murines. Cependant, nous n'avons pas observé de régulation négative des gènes du locus sous ces conditions, ce qui contraste avec nos données *in vivo*. Ces observations nous ont incités à étudier la possibilité que Snail régule les gènes du locus via une communication intercellulaire avec des cellules non tumorales. Nous avons séparé les tumeurs KP en cellules non immunes et immunes, et avons en effet constaté une régulation négative des gènes de ce locus dans la fraction de cellules immunitaires. Des investigations ultérieures nous ont conduit à postuler l'existence d'un facteur soluble sécrété par les cellules tumorales d'une manière dépendante de Snail et conduisant à la répression des gènes du locus *Dlk1-Dio3* dans les cellules immunitaires (Figure, à gauche) (Groeneveld et al., 2018). Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour identifier ce facteur soluble.

## Vers un système spécifique et efficace de déplétion des neutrophiles.

Notre plan initial était d'étudier l'impact des TAN sur les cellules tumorales. Pour comparer l'efficacité de deux anticorps couramment utilisés en tant qu'anticorps destructeurs de neutrophiles, anti-Gr1 et anti-Ly6G, nous avons traité des souris avec chacun d'eux. A l'issue d'analyses multiples et approfondies, nous concluons que, malgré son utilisation largement rapportée, l'anti-Ly6G ne parvient pas à épuiser les neutrophiles dans la circulation des souris C57BL6.

Ensuite, nous avons décidé de développer une stratégie de déplétion spécifique et efficace des neutrophiles. Nous avons utilisé un traitement de combinaison consistant à injecter à des souris d'abord l'anti-Ly6G, puis un anticorps secondaire se liant à l'anti-Ly6G. Cette combinaison d'anticorps a conduit à une déplétion efficace des neutrophiles dans la circulation (entre 85 et 95%), comparable à celle atteinte avec l'anti-Gr1.

Contrairement à l'anti-Gr1, aucune autre population de cellules immunitaires n'a diminué, ce qui indique que notre approche est spécifique. Ainsi, nous avons pu développer une méthode simple pour la déplétion efficace et spécifique des neutrophiles (Figure, à droite). J'imagine que cette stratégie sera importante pour les chercheurs travaillant dans tous les domaines se consacrant à l'étude de la fonction des neutrophiles. J'espère également que notre comparaison approfondie des outils existants et des stratégies de validation permettra de dissiper la confusion qui règne parmi les scientifiques quant aux approches correctes et donc reproductibles à utiliser lorsque l'on travaille sur ce type crucial de cellules immunitaires innées. Un manuscrit a été soumis pour publication et est déposé dans bioRxiv.



### Légende de la figure

**Communication intercellulaire impliquant Snail dans les tumeurs du poumon, et nouvelle stratégie de déplétion des neutrophiles. A gauche :** Schéma représentant le micro-environnement de la tumeur pulmonaire. L'activation de Snail dans les cellules tumorales entraîne la libération d'un facteur soluble non encore identifié, qui transmet un signal aux cellules immunitaires non tumorales, déclenchant ainsi la régulation négative des gènes du locus *Dlk1-Dio3*. **A droite :** Schéma illustrant la stratégie à doubles anticorps développée dans notre étude pour dépléter les neutrophiles de manière spécifique et efficace.

### Références

1. Article publié avant le projet  
Faget, J., Groeneveld, S., Boivin, G., Sankar, M., Zangger, N., Garcia, M., Guex, N., Zlobec, I., Steiner, L., Piersigilli, A., *et al.* (2017). Neutrophils and Snail Orchestrate the Establishment of a Pro-tumor Microenvironment in Lung Cancer. *Cell reports* 21, 3190-3204.
2. Article publié et directement lié au projet  
Groeneveld, S., Faget, J., Zangger, N., and Meylan, E. (2018). Snail mediates repression of the *Dlk1-Dio3* locus in lung tumor-infiltrating immune cells. *Oncotarget* 9, 32331-32345.
3. Preprint directement lié au projet  
Faget J., Boivin G., Ancey P.-B., Gkasti A., Mussard J., Engblom C., Pfirschke C., Vazquez J., Bendriss-Vermare N., Caux C., Vozenin M.-C., Pittet M.J., Gunzer M., and Meylan E. Efficient and specific Ly6G<sup>+</sup> cell depletion: A change in the current practices toward more relevant functional analyses of neutrophils.  
**bioRxiv** 2018. <http://biorxiv.org/cgi/content/short/498881v1>