



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude transcriptomique, protéomique et fonctionnelle des effets de l'hypoxie cyclique combinée à un environnement inflammatoire sur la polarisation des macrophages : Implications dans le cancer

LAMARCHE , Adrien

Award date:
2014

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

Etude des effets de l'hypoxie cyclique combinée à un environnement inflammatoire sur la polarisation des macrophages : Implications dans le cancer

Mémoire présenté pour l'obtention du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Adrien LAMARCHE

Janvier 2014

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur
Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20
E-mail : joelle.jonet@unamur.be – <http://www.unamur.be>

Etude transcriptomique, protéomique et fonctionnelle des effets de l'hypoxie cyclique combinée à un environnement inflammatoire sur la polarisation des macrophages : Implications dans le cancer

LAMARCHE Adrien

Résumé

Le cancer constitue la seconde cause de mortalité dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires, affectant un homme sur deux et une femme sur trois. Il apparaît de plus en plus clairement que le microenvironnement associé aux tumeurs joue un rôle majeur dans la progression de celles-ci. Prenant part à ce microenvironnement, les macrophages peuvent représenter jusqu'à 70% de la masse tumorale. De nombreuses études ont fait état d'une corrélation étroite entre le nombre et/ou la densité des macrophages tumoraux (TAMs) avec un mauvais pronostic. Les mécanismes sous-jacents de cette polarisation alternative ne sont pas totalement élucidés. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux rôles joués par l'hypoxie cyclique et l'inflammation inhérentes au microenvironnement tumoral sur cette polarisation. Dans un premier temps, nous avons sélectionné et étudié les variations transcriptomiques de marqueurs de macrophages M1 et M2 ainsi que d'autres marqueurs typiquement impliqués dans la progression tumorale sur des macrophages M0. Cinq marqueurs pouvant contribuer à l'apparition d'un phénotype de macrophages pro-tumoraux, l'IL-1R2, la fibronectine, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-10 ont montré une expression en ARNm augmentée en Hcy. La présence de TNF- α a également induit une hausse de l'expression de l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-10 dans ces macrophages. L'expression protéique de ces trois cytokines a également été étudiée à l'aide d'ELISA afin de tenter de confirmer les profils obtenus en RT-qPCR. Du à la faible concentration des échantillons, seul le profil de l'IL-8 a pu être confirmé, montrant une augmentation de la sécrétion. Dans un second temps, une étude fonctionnelle de milieux conditionnés de macrophages M0 a été réalisée pour tenter d'évaluer les effets de ces milieux sur le comportement migratoire et la viabilité de cellules endothéliales (EAhy926) et tumorales (A549). Cette étude n'a cependant pas permis de montrer l'influence de l'un ou l'autre milieu conditionné.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2014

Promoteur : C. Michiels

REMERCIEMENTS

J'aimerais avant toute chose adresser mes remerciements les plus sincères aux différentes personnes ayant contribué à ce mémoire.

Mes premières pensées vont directement à la personne qui m'a chaleureusement accueillie au sein de son équipe : Carine Michiels. Je voudrais plus particulièrement la remercier pour sa disponibilité et son suivi mais aussi pour son soutien et ses conseils avisés.

Merci également aux autres seniors dirigeant l'URBC, à savoir Florence Chainiaux, Martine Raes, Patsy Renard et Thierry Arnould pour leur accueil et la confiance qu'ils m'ont témoigné en m'offrant l'opportunité de réaliser ce mémoire au sein de ce laboratoire.

J'aimerais ensuite remercier ma tutrice, Céline, pour m'avoir initié à la vie de laboratoire. Je la remercie également pour sa franchise, ses conseils, son suivi, ainsi que pour l'extrême patience dont elle a fait preuve envers moi durant ces 10 mois.

Merci aussi aux autres membres de l'équipe HIF, à savoir Edith, Marie, Magali et Annick pour leur écoute et leurs conseils lors des réunions d'équipe. Merci également à tous les autres chercheurs du labo pour leur sympathie, leur aide, et leur soutien.

J'adresse également mes remerciements à tous les techniciens de l'URBC, sans qui la vie au labo serait bien compliquée. Je remercie donc Guy pour sa bonne humeur légendaire, Maude et Antoine pour leurs explications posées et leur savoir, et les autres (Martine, Edouard, Noëlle) pour leur gentillesse quotidienne.

Je tiens également à remercier les différents mémorants qui ont partagé ma vie au bureau. Merci donc à André-Claude pour sa culture, ses débats, son amitié et son soutien sans faille dans les moments difficiles. Merci à Flore pour avoir égaillé les journées par son humour, sa gentillesse et ses rires. Enfin, merci à Justine et Etienne pour leur présence et leur sympathie.

Enfin, j'adresserai mes derniers remerciements à mes proches, mes amis et à toutes les autres personnes qui m'ont permis d'arriver là où j'en suis aujourd'hui. Je pense essentiellement à mes parents, mon frère et ma moitié pour leur confiance, leur soutien, et le bonheur qu'ils m'ont apporté au cours de ce mémoire et de ces études.

Adrien

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADP	Adénosine DiPhosphate
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPK	AMP Kinase
ANG-2	Angiopoïétine 2
ARG1	ARGinase 1
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bcl-2	B-cell CLL/Lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2
CCL5	Chemokine (C-C motif) Ligand 5
CCL17	Chemokine (C-C motif) Ligand 17
CCL18	Chemokine (C-C motif) Ligand 18
CCL22	Chemokine (C-C motif) Ligand 22
CCR2	Chemokine (C-C motif) Receptor 2
CCR5	Chemokine (C-C motif) Receptor 5
CD120	Cluster of Differentiation 120
CD206	Cluster of Differentiation 206
CDK2	Cyclin Dependent Kinase 2
CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4
CDK6	Cyclin Dependent Kinase 6
c-FLIP	Cellular Fllice-Like Inhibitory Protei
COX-2	CycloOXYgénase-2
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
Ct	Cycle threshold
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 9
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DHGL-1	Dulbecco's Modified Eagle's High Glucose
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMBA	7,12-DiMethylBenzAnthracène
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	désoxyriboNucléotide TriPhosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMAPII	Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II
EMMPRIN	Extracellular Matrix MetalloPRoteinase INducer
EtK	Epithelial and endothelial Tyrosine Kinase
FAD ⁺ /FADH ₂	Flavine Adenine Dinucleotide
FADD	Fas-Associated Death Domain
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
Hch	Hypoxie chronique
Hcy	Hypoxie cyclique
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
HKG	House Keeping Gene
HPV	Human Papilloma Virus
HRE	Hypoxia Response Element
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
iCAD	Inhibitor of Caspase Activated DNase
ICAM-1	IntraCellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
IKK	IκB Kinase

LISTE DES ABREVIATIONS

IL-1R2	IL-1 Receptor 2
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
I κ B	Inhibitor of NF κ B
kDa	kilo Dalton
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MEM	Minimal Essential Medium
MMPs	Matrix MetalloProteinases
N	Normoxie
NLS	Nuclear Localization Sequence
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NIK	NF- κ B-Inducing Kinase
NK	Natural Killer
NLS	Nuclear localization sequence
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
RIP1	Receptor Interacting Protein 1
RNI	Reactive Nitrogen Intermediate
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPS9	Ribosomal Protein S9
RT-qPCR	Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TAMs	Tumor-Associated Macrophages
TGF- α	Transforming Growth Factor α
TGF- β	Transforming Growth Factor β
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TNFR2	Tumor Necrosis Factor Receptor 2
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TRADD	TNFR1-Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
xIAP	chromosome X Inhibitor of Apoptosis Protein

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	1
1) Epidémiologie du cancer	1
2) Le système vasculaire sanguin	1
2.1 Le système vasculaire sanguin normal	1
2.2 Le système vasculaire tumoral	2
2.2.1 Le switch angiogénique	2
2.2.2 Mécanismes angiogéniques tumoraux	3
2.2.3 Architecture et fonctionnalité du réseau vasculaire tumoral	4
3) L'hypoxie	4
3.1 Relations entre cancer et hypoxie	4
3.2 Effets cellulaires de l'hypoxie	5
3.3 Adaptation cellulaire générale à l'hypoxie	6
3.4 Adaptation moléculaire à l'hypoxie	7
3.4.1 Le facteur de transcription HIF-1 : structure, fonction et régulation	7
3.4.2 La régulation de HIF-1 α en hypoxie cyclique	7
3.5 Réponses phénotypiques induites par HIF-1	8
4) Le microenvironnement tumoral	8
4.1 L'inflammation à l'origine du cancer	9
4.2 L'inflammation dans la progression tumorale	9
4.2.1 Les acteurs moléculaires	9
4.2.2 Voies de signalisation du TNF- α	10
a) Voies de signalisation TNFR1	11
b) Voie de signalisation TNFR2	11
c) Répartition et régulation des récepteurs au TNF- α	11
4.3 Rôle des macrophages	12
4.3.1 Polarité et rôles physiologiques	12
4.3.2 Macrophages associés aux tumeurs : TAMs	13
a) Recrutement dans la tumeur	13
b) Domestication des macrophages par la tumeur	13
TAMs et angiogenèse	14
TAMs, invasion et métastases	14
TAMs et immunosuppression	15
5) Objectifs	16

II. MATERIEL ET METHODES 17

1) Cultures cellulaires.....	17
1.1 Les cellules EAhy926.....	17
1.2 Les cellules A549.....	17
1.3 Les cellules THP1.....	17
2) Différenciation des monocytes THP1 en macrophages M0.....	18
3) Incubation en hypoxie et en présence de TNF- α	18
4) RT-qPCR.....	18
4.1 Principe.....	18
4.2 Méthode.....	18
4.2.1 Extraction des ARN totaux avec le système QIAcube.....	18
4.2.2 Dosage des ARN totaux.....	19
4.2.3 Rétro-transcription.....	19
4.2.4 PCR en temps réel.....	20
5) Test de migration cellulaire.....	20
5.1 Principe.....	20
5.2 Méthode.....	20
6) Test de viabilité cellulaire.....	21
6.1 Principe.....	21
6.2 Densités cellulaires.....	21
6.3 Méthode.....	21
7) Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Folin-Lowry.....	21
7.1 Principe.....	21
7.2 Méthode.....	22
8) Mesure de la sécrétion d'IL-8.....	22
8.1 Principe de l'ELISA.....	22
8.2 Méthode.....	22
8.2.1 Préparation des surnageants pour mesurer la sécrétion d'IL-8.....	22
8.2.2 Dosage ELISA.....	23

III. RESULTATS 24

1^{ère} PARTIE : CARACTERISATION DE MACROPHAGES M0 INCUBES EN N, Hch ET Hcy EN PRESENCE OU NON D'UNE CONCENTRATION DE 0,1 ng/ml DE TNF- α 24

Etude des variations d'expression en ARNm..... 24

1) Mises au point.....	24
2) Effets de l'hypoxie cyclique et du TNF- α en présence de 3,75g de glucose et selon une cinétique de 6h+0hR.....	25
2.1 Objectif :.....	25

2.2	Effets de l'hypoxie cyclique et du TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs de macrophages M1	25
2.3	Effets de l'hypoxie cyclique et du TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs de macrophages M2	25
2.4	Effet de l'hypoxie cyclique et du TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs inflammatoires et angiogéniques.....	26
	<i>Etude de l'expression protéique de l'IL-8, l'IL-6 et l'IL-10</i>	26
	2^{ème} PARTIE : ETUDE DE L'EFFET DE MILIEUX CONDITIONNES DE MACROPHAGES M0 SUR LE COMPORTEMENT MIGRATOIRE ET SUR LA VIABILITE DES CELLULES ENDOTHELIALES (EAhy926) ET TUMORALES (A549)	27
	<i>Etude de la migration cellulaire</i>	27
1)	Etude de la migration des cellules EAhy926.....	27
2)	Etude de la migration des cellules A549	28
	<i>Etude de la viabilité cellulaire</i>	29
1)	Etude de la viabilité des cellules EAhy926	29
2)	Etude de la viabilité des cellules A549.....	29
	IV DISCUSSION, CONCLUSION, PERSPECTIVES	30
1)	Discussion	30
2)	Conclusion et perspectives	32
	V. BIBLIOGRAPHIE	34

I. INTRODUCTION

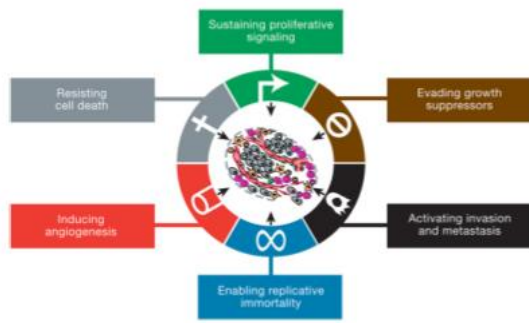


Figure I.1 : Caractéristiques principales du cancer. Les cellules tumorales sont caractérisées par une prolifération anarchique, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance, une capacité d'invasion et de formation de métastases, un potentiel répliatif illimité, une capacité d'induction de l'angiogenèse et de résistance à l'apoptose (Hanahan and Weinberg, 2000).

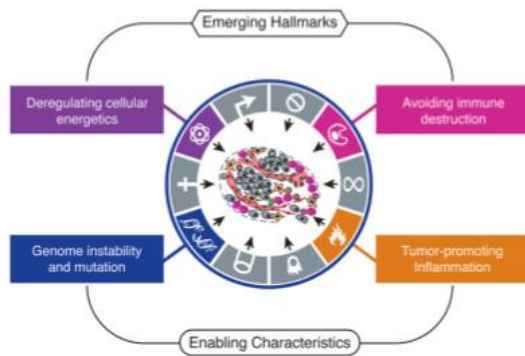


Figure I.2 : Caractéristiques émergentes et permissives du cancer. Deux caractéristiques additionnelles ont récemment été attribuées au cancer. La première implique la capacité de modifier ou de reprogrammer le métabolisme cellulaire. La seconde permet aux cellules tumorales d'éviter leur destruction induite par le système immunitaire. Les caractéristiques principales du cancer sont rendues possibles grâce à l'instabilité et les mutations du génome, mais aussi à l'inflammation présente dans le microenvironnement tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011).

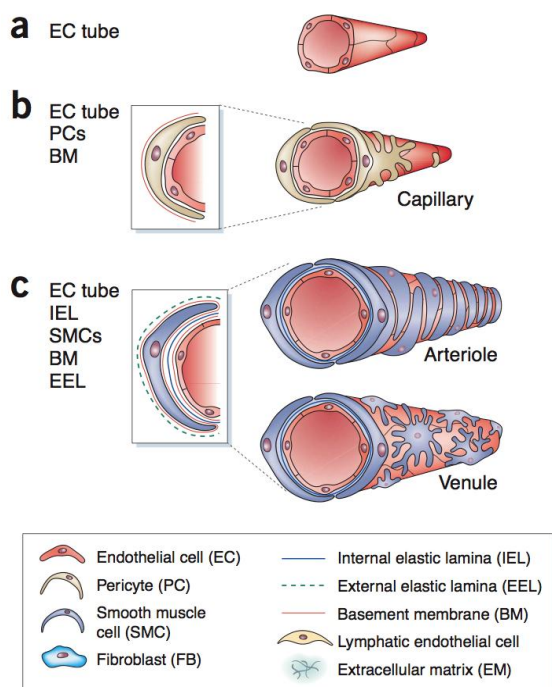


Figure I.3 : Organisation structurale des capillaires, artérioles et veinules. La couche interne bordant la lumière des vaisseaux est constituée de cellules endothéliales arrangées de manière tubulaire. Des péricytes, en établissant des contacts étroits avec les cellules endothéliales, permettent une stabilisation vasculaire ainsi qu'une régulation de la perfusion. Finalement, une membrane basale vient entourer et délimiter la structure formée. La paroi des vaisseaux plus larges peut également être constituée de fibroblastes et de cellules musculaires lisses (Jain, 2003).

1) **Epidémiologie du cancer**

Le cancer constitue la seconde cause de mortalité dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires, affectant un homme sur deux et une femme sur trois. En 2008, il était responsable de 7,6 millions de décès, représentant 13% de la mortalité mondiale. D'après les estimations de l'OMS, cette maladie devrait être responsable de 13,1 millions de décès en 2030. Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (12,7%), du sein (10,9%) et le cancer colorectal (9,7%) tandis que la majorité des décès sont provoqués par le cancer du poumon (18,2%), de l'estomac (9,7%) et du foie (9,2%). De nombreux facteurs peuvent favoriser le développement de cette maladie. Dans une grande majorité, les cancers humains sont associés à des facteurs environnementaux comme le tabac qui représente à lui seul 22% de la mortalité par cancer, ou l'exposition à divers agents carcinogènes. Dans d'autres cas, le cancer implique une origine génétique, virale ou bactérienne.

Le cancer est une maladie cellulaire multistep caractérisée par une prolifération anarchique de cellules au sein d'un tissu normal de l'organisme. Au départ, une cellule acquiert une ou plusieurs mutations lui permettant de devenir immortelle. C'est à partir de ce seul clone que naît une tumeur. Les cellules tumorales présentent des capacités uniques leur permettant de survivre. Ces caractéristiques sont multiples. Les six caractéristiques principales sont la capacité à proliférer de façon anarchique, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance, le potentiel réplicatif illimité, la résistance à l'apoptose, la capacité d'induction de l'angiogenèse et la capacité à former des métastases (Figure I.1) (Hanahan et Weinberg, 2000). D'autres caractéristiques ont récemment émergées et été attribuées aux cellules tumorales telles que la dérégulation du métabolisme énergétique et la capacité du cancer à échapper au système immunitaire de l'individu. Les caractéristiques typiques du cancer sont rendues possibles grâce à l'instabilité et aux mutations du génome, mais aussi à l'inflammation présente dans le microenvironnement tumoral (Figure I.2) (Hanahan and Weinberg, 2011).

2) **Le système vasculaire sanguin**

2.1 Le système vasculaire sanguin normal

Les vaisseaux sanguins fournissent des nutriments et de l'oxygène à tous les tissus de notre corps. Ces tâches sont rendues possibles grâce à un réseau vasculaire dense comprenant une organisation spatiale hautement hiérarchisée. Le ventricule gauche du cœur propulse le sang à travers tout l'organisme. Le sang artériel circule ainsi via les artères, puis artérioles, jusqu'aux capillaires sanguins. Ces capillaires sont le lieu des échanges de nutriments et des déchets métaboliques entre le sang et les tissus cellulaires. Le sang rejoint alors l'oreillette droite du cœur à travers les veinules et les veines et est finalement réoxygéné via la petite circulation au niveau des poumons. Tous les vaisseaux sont organisés en une structure de base très ordonnée s'ancrant dans une matrice extracellulaire. La couche interne bordant la lumière des vaisseaux est constituée de cellules endothéliales arrangées de manière tubulaire. Des péricytes, en établissant des contacts étroits avec les cellules endothéliales, permettent une stabilisation vasculaire ainsi qu'une régulation de la perfusion. Finalement, une membrane basale vient entourer et délimiter la structure formée par les cellules endothéliales et les péricytes. La paroi des vaisseaux plus larges peut également être constituée de fibroblastes ainsi que de cellules musculaires lisses (Figure I.3) (Jain, 2003). L'oxygène transporté par les globules rouges à travers les vaisseaux sanguins peut diffuser sur une distance comprise entre 100 et 200 μm . Toutes les cellules de l'organisme doivent donc se situer dans ce rayon pour pouvoir être

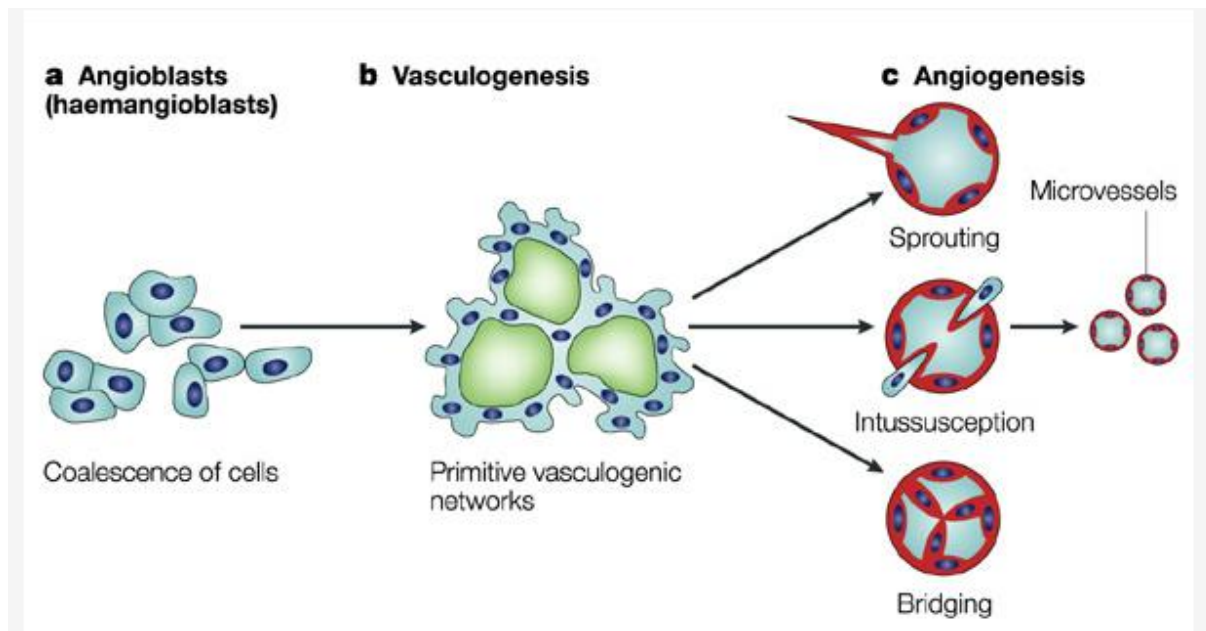


Figure I.4 : Processus de formation *de novo* de vaisseaux sanguins. Au cours de la vasculogénèse, des précurseurs endothéliaux, les angioblastes, donnent naissance à un labyrinthe vasculaire primitif de petits capillaires à partir duquel se développera le nouveau réseau vasculaire (Hendrix et al., 2003).

INTRODUCTION

oxygénées correctement. Les organismes multicellulaires doivent donc impérativement recruter de nouveaux vaisseaux sanguins pour leur croissance. Ce processus peut être réalisé par deux mécanismes distincts que sont la vasculogénèse et l'angiogénèse (Carmeliet and Jain, 2000).

La vasculogénèse désigne la formation *de novo* de vaisseaux sanguins lors du développement embryonnaire. Ce processus repose sur l'assemblage de précurseurs endothéliaux dérivés du mésoderme appelés angioblastes (Potente et al., 2011). Ceux-ci donnent naissance à un labyrinthe vasculaire primitif de petits capillaires à partir duquel se développera le nouveau réseau vasculaire (Figure I.4) (Carmeliet, 2005).

L'angiogénèse, au contraire, est la croissance de bourgeons vasculaires à partir de vaisseaux pré-existants. Chez l'adulte, l'angiogénèse prend part à divers processus physiologiques majeurs tels que la réparation tissulaire et le cycle menstruel chez la femme. Plus généralement, l'angiogénèse est définie comme le remodelage du réseau vasculaire (Gupta and Qin, 2003). Ce processus se déroule en plusieurs étapes médiées par la présence de nombreux facteurs angiogéniques d'origine autocrine et paracrine. En réponse à l'angiopoïétine 2 (ANG-2), les péricytes se détachent des vaisseaux en sécrétant des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui détruisent la membrane basale. Les cellules endothéliales perdent alors leurs jonctions et le vaisseau naissant se dilate. La présence de VEGF augmente encore la perméabilité de la couche endothéliale, causant l'extravasation de protéines plasmatiques dans la matrice extracellulaire et la dégradation de celle-ci. En réponse à d'autres facteurs angiogéniques physiques (hypoxie) ou chimiques (FGF-2), les cellules endothéliales migrent et prolifèrent dans l'espace périvasculaire où elles formeront des structures tubulaires (Carmeliet and Jain, 2011). L'initiation du flux sanguin, l'établissement d'une membrane basale et le recrutement des cellules murales stabilisent alors les nouvelles connexions. Le processus de bourgeonnement continue jusqu'à ce que les signaux proangiogéniques disparaissent et que la quiescence soit rétablie (Gupta and Qin, 2003, Potente et al., 2011). Ce processus angiogénique est hautement régulé et peut être contrebalancé par l'action de diverses molécules inhibitrices telles que la thrombospondine-1, l'IFN α , l'IFN γ , l'antithrombine III, l'angiostatine et l'endostatine (Furuya et al., 2005). Si ces processus sont dérégulés, il peut alors y avoir un impact majeur sur notre santé et un développement de certaines pathologies, dont la plus évidente est le cancer (Carmeliet, 2003).

2.2 Le système vasculaire tumoral

2.2.1 **Le switch angiogénique**

Dès 1971, J. Folkman émet l'hypothèse que la croissance tumorale pouvait être dépendante de l'angiogénèse et décrit pour la première fois des perspectives potentielles d'une thérapie cancéreuse ciblant l'angiogénèse (Folkman, 1971). En effet, tout comme les tissus normaux, les tumeurs ont besoin des nutriments et d'oxygène. Il leur est également nécessaire de pouvoir évacuer le dioxyde de carbone et les autres déchets métaboliques. La néovascularisation associée à la tumeur permet de remplir cette fonction. Lors de la progression tumorale, un switch angiogénique est quasi toujours activé de manière permanente, causant le bourgeonnement des vaisseaux qui aident à soutenir la croissance de la tumeur. L'origine de ce switch angiogénique provient d'un déséquilibre entre facteurs inducteurs et inhibiteurs de l'angiogénèse, lui-même induit par des changements d'expression génique des cellules tumorales (Hanahan and Folkman, 1996).

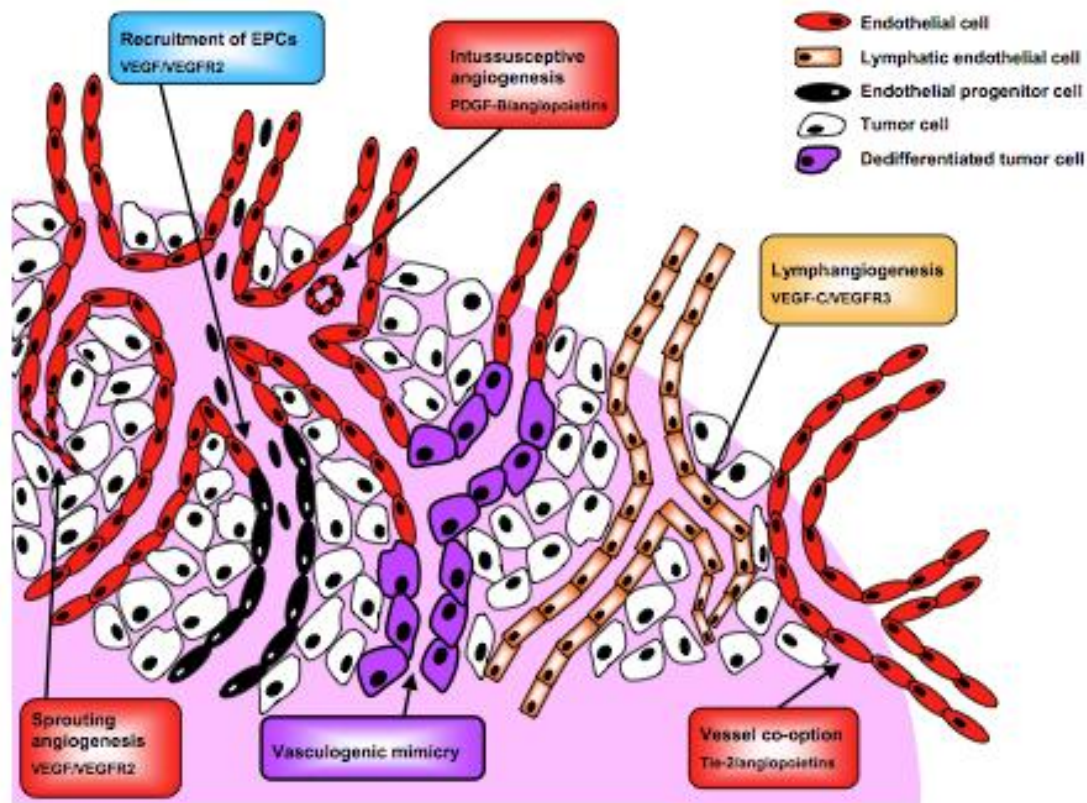


Figure I.5 : Les différents mécanismes de la vascularisation tumorale. Le réseau vasculaire sanguin de la tumeur peut s'étendre par bourgeonnement, intussusception vasculaire, cooptation vasculaire, mimétisme vasculaire ou encore par recrutement de précurseurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse (Hillen and Griffioen, 2007).

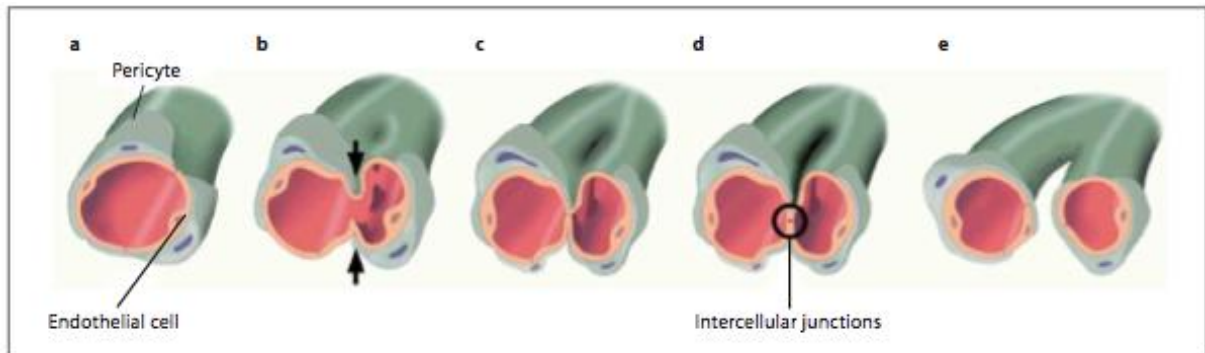


Figure I.6 : Processus détaillé de l'intussusception vasculaire. (a) Capillaire au repos entouré de péricytes. (b) Les parois opposées du capillaire commencent à migrer l'une vers l'autre, (c) un pilier intraluminal est formé, (d) et les jonctions de cellules endothéliales sont réarrangées. (e) La croissance du pilier mène à la séparation du capillaire en deux nouveaux vaisseaux (De Spiegelaere et al., 2012).

INTRODUCTION

2.2.2 Mécanismes angiogéniques tumoraux

Actuellement, on dénombre cinq mécanismes majeurs sous-jacents au développement vasculaire tumoral. Ainsi, le réseau vasculaire tumoral peut s'étendre par bourgeonnement (angiogenèse classique), intussusception vasculaire, cooptation vasculaire, mimétisme vasculaire ou encore par vasculogenèse dérivée de la moelle osseuse (Figure I.5).

Le bourgeonnement de capillaires à partir de vaisseaux pré-existants représente le mécanisme majeur de l'angiogenèse tumorale. Ce processus est initié par une étape d'activation au cours de laquelle les cellules tumorales libèrent des facteurs angiogènes tels que le VEGF qui se lie à des récepteurs membranaires des cellules endothéliales. Ces cellules se mettent alors à sécréter des protéases permettant la dégradation de la membrane basale et migrent dans l'espace matriciel dégradé où elles peuvent proliférer. Un bourgeon vasculaire se forme à cet endroit. Celui-ci est conduit par une cellule dite « pionnière » unique riche en filopodes qui migre en réponse à un stimulus angiogénique produit par les cellules tumorales. Un autre groupe de cellules nommées « cellules-tiges », en se divisant, favorise alors l'élongation du bourgeon. Elles enclenchent ensuite le processus de « lumenization » et contribuent à la formation de la membrane basale du nouveau capillaire (Figure I.5) (Hillen and Griffioen, 2007, Plate et al., 2012).

L'intussusception vasculaire fut découverte vers la fin du 20^e siècle. Elle survient lorsque les parois endothéliales opposées d'un vaisseau sanguin s'invaginent l'une vers l'autre dans la lumière vasculaire. Il se forme alors une travée tissulaire transvasculaire dans la lumière du vaisseau. Les jonctions entre les cellules endothéliales sont réorganisées et une perforation centrale est formée. La travée est finalement envahie par des péricytes et des myélofibroblastes qui vont déposer de la matrice extracellulaire (Figures I.5 et I.6). On pense que le bourgeonnement angiogénique peut switcher vers l'intussusception pour permettre un développement plus rapide de nouveaux vaisseaux. Les mécanismes moléculaires qui dirigent ce processus sont à l'heure actuelle peu connus (De Spiegelaere et al., 2012).

Le terme de cooptation vasculaire fut défini pour la première fois par Holash et al. (Holash et al., 1999). Lors de ce processus, des cellules tumorales entourant des vaisseaux sanguins « piratent » les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales cooptées synthétisent alors de l'angiopoïétine 2 ainsi que son récepteur Tie 2. Cette signalisation autocrine provoque la dissociation des péricytes et augmente l'apoptose des cellules endothéliales. L'activité de l'angiopoïétine 2 induit une importante diminution du nombre de vaisseaux tumoraux. L'hypoxie qui en résulte induit la surexpression de VEGF-A par les cellules tumorales amplifiant le processus angiogénique (Figure I.5) (Holash et al., 1999, Auguste et al., 2005).

Le mimétisme vasculaire fut découvert en 1999 par Maniotis et al. lors de l'étude de la microcirculation d'un mélanome. Une étude histologique détaillée de la microcirculation a été réalisée par cette équipe en se basant sur une coloration PAS (Periodic Acid Schiff) marquant les polysaccharides des membranes basales des vaisseaux. Au départ, tout semblait indiquer une vascularisation classique. En effet, ces vaisseaux étaient munis d'une fine membrane basale, pouvaient être marqués par des anticorps dirigés contre différents marqueurs typiques de cellules endothéliales, et des globules rouges avaient pu être observés dans leur lumière. Cependant, par microscopie électronique, ils observèrent que ces canaux ne présentaient pas d'endothélium (Maniotis et al., 1999). Après investigations, ces auteurs ont pu démontrer que dans certains cancers agressifs, dont le mélanome, les cellules tumorales peuvent remplacer les cellules endothéliales pour former une lumière. Ce processus est encore mal compris et deux hypothèses majeures quant à l'origine de ce mécanisme s'affrontent. La première voudrait que les cellules tumorales participent activement à la formation d'une lumière

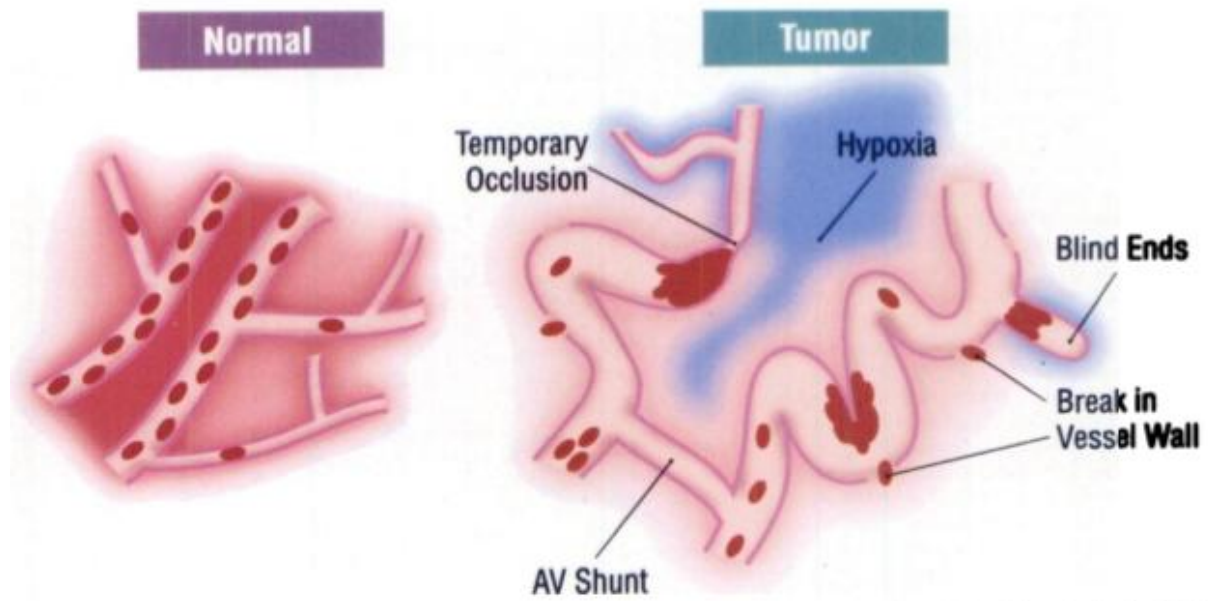


Figure I.7 : Différences entre le réseau vasculaire normal et tumoral. Les tissus normaux sont dotés d'un réseau vasculaire relativement uniforme et bien ordonné qui permet une bonne oxygénation des tissus. Les vaisseaux sanguins d'une tumeur sont tortueux et irréguliers. Ils sont caractérisés par la présence de « shunts » artérioveineux ainsi que des extrémités en cul de sac. Cela se traduit par un flux sanguin irrégulier et la présence de zones hypoxiques (Brown and Giaccia, 1998).

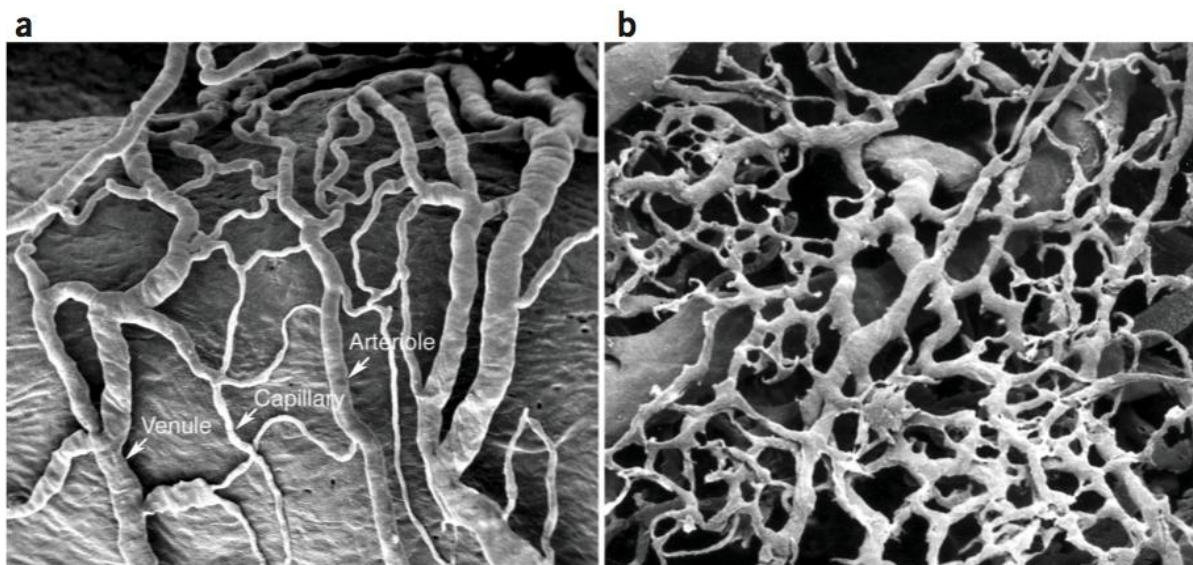


Figure I.8 : Microscopie électronique à balayage de vaisseaux sanguins normaux et tumoraux. (a) Le réseau vasculaire normal est simple, montrant une hiérarchie organisée en artérioles capillaires et veinules. (b) La microvasculature tumorale est désorganisée, les artérioles, capillaires et veinules ne sont pas identifiables (McDonald and Choyke, 2003).

INTRODUCTION

vasculaire tandis que la deuxième invoque plutôt la conséquence d'une régression vasculaire prenant place dans le processus de remodelage vasculaire (Plate et al., 2012). Par ce mécanisme, les cellules tumorales se dotent de structures vasculaires indépendamment du processus angiogénique (Figure I.5) (Hillen and Griffioen, 2007).

Les cellules tumorales peuvent aussi favoriser le recrutement de précurseurs endothéliaux appelés angioblastes. Cette mobilisation est médiée par des facteurs de croissance, des chémokines, des cytokines et des signaux pro-angiogéniques comme le VEGF-A et/ou l'angiopoïétine 1 sécrétés par les cellules tumorales (Plate et al., 2012). Les P-sélectines, les E-sélectines et les intégrines favorisent ensuite leur adhérence à la paroi ainsi que leur incorporation dans la microvasculature. Les angioblastes peuvent finalement s'y différencier en cellules endothéliales matures (Figure I.5) (Vajkoczy et al., 2003, Deb et al., 2004).

2.2.3 Architecture et fonctionnalité du réseau vasculaire tumoral

La vascularisation tumorale diffère fortement de celle des tissus sains. En effet, celle-ci se caractérise par un réseau typiquement aberrant. Cette particularité est due au déséquilibre de régulateurs angiogéniques comme le VEGF et les angiopoïétines. D'un point de vue structural, la vascularisation tumorale est très désordonnée. Au sein de la tumeur, des régions très denses en vaisseaux coexistent avec d'autres régions très pauvres (Goel et al., 2011). Ces vaisseaux sont à la fois tortueux, dilatés et possèdent des diamètres extrêmement variables. La vascularisation tumorale est également perturbée par des bourgeonnements précoces de capillaires, des branchements excessifs et aberrants, des extrémités en cul de sac et par la présence de « shunts » artérioveineux (Figures I.7 et I.8) (McDonald and Choyke, 2003, Hanahan and Weinberg, 2011, Brown and Giaccia, 1998). De plus, les jonctions interendothéliales sont aberrantes et leur membrane basale est quant à elle discontinue voire absente (Carmeliet and Jain, 2000).

Au niveau fonctionnel, l'architecture vasculaire tumorale entraîne un flux sanguin très chaotique (Hanahan and Weinberg, 2011, Brown and Giaccia, 1998). Les fluctuations en oxygène, nutriments et facteurs de croissance qui en résultent stimulent la sécrétion de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales dans un effort compensatoire. Cependant, cet excès de molécules proangiogéniques contribue à une amplification du phénomène, en rendant le réseau vasculaire de plus en plus chaotique (Carmeliet and Jain, 2000).

3) L'hypoxie

3.1 Relations entre cancer et hypoxie

Pour leur bon fonctionnement, les cellules humaines requièrent un approvisionnement continu et adéquat en oxygène. En effet, au sein des cellules, l'oxygène est utilisé comme accepteur terminal d'électron dans le processus de respiration mitochondriale. Celui-ci est impliqué dans la production d'ATP, molécule énergétique principale utilisée dans la plupart des réactions biochimiques endergoniques. En conditions physiologiques, la délivrance et la consommation d'oxygène sont des processus finement régulés. Cette régulation s'opère notamment par l'activité de facteurs inductibles par l'hypoxie (HIFs). Lorsque les cellules prolifèrent, la consommation en oxygène augmente et des régions hypoxiques où la teneur en oxygène devient très faible apparaissent. En réponse à ce phénomène, Hif devient actif : HIF est un facteur de transcription activant l'expression de gènes impliqués dans le processus angiogéniques tels que le VEGF. Une fois traduit sous forme de protéine, le VEGF sécrété va stimuler le processus d'angiogenèse et donc augmenter l'apport et la délivrance en oxygène (Semenza, 2012).

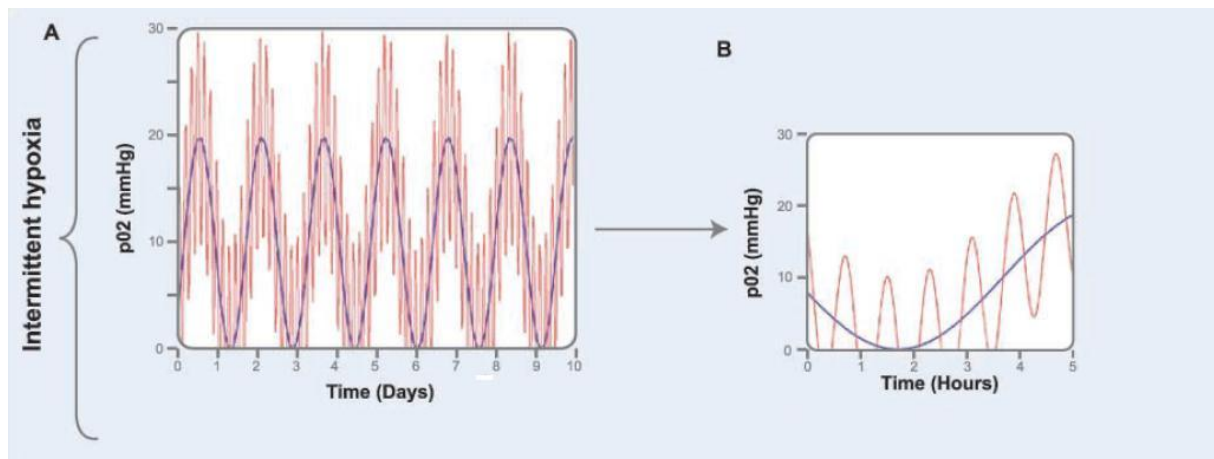


Figure I.9 : Périodicités de l'hypoxie cyclique au sein d'une tumeur. (A) Les fluctuations journalières de la pO₂ résultent du phénomène global d'angiogenèse et du remodelage de la vasculature tumorale. (B) Les fluctuations de la pO₂ au cours des heures découlent quant à elles de l'architecture non fonctionnelle du réseau tumoral (Dewhirst, 2007).

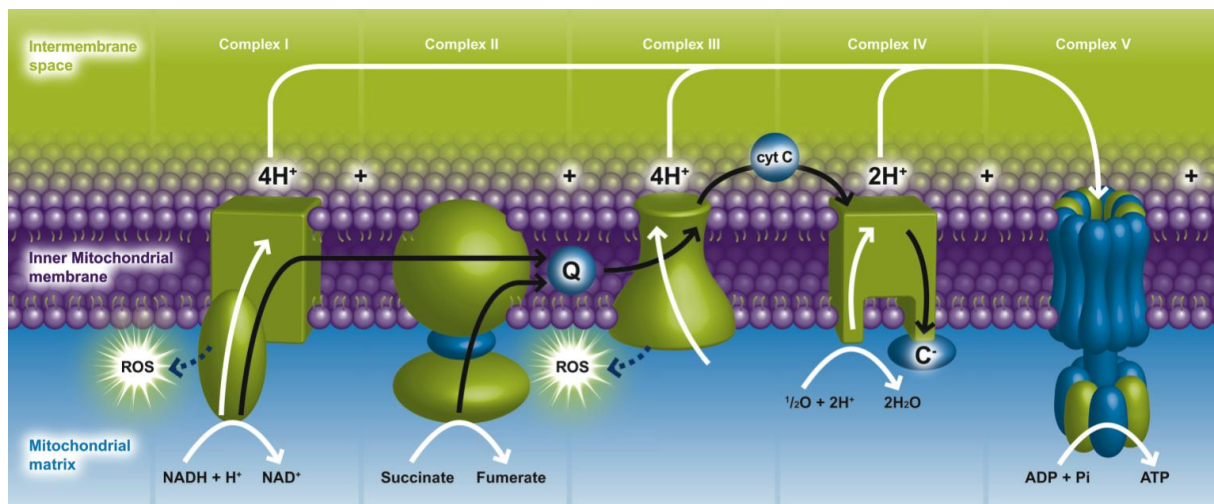


Figure I.10 : Processus des phosphorylations oxydatives. Les molécules de NADH et FADH₂ transfèrent des électrons à des transporteurs situés au niveau de la membrane mitochondriale interne et organisés en chaîne au sein de différents complexes (I à IV). Au bout de cette chaîne, les électrons sont transmis à l'oxygène qui réduit, formera de l'eau. L'énergie libérée par ce transport d'électrons est convertie en un gradient électrochimique par pompage de protons au travers de la membrane mitochondriale interne. Le potentiel électrochimique de ce gradient est ensuite utilisé par le complexe V (ATP synthase) afin de phosphoryler une molécule d'ADP en ATP. (<http://docs.abcam.com/pdf/metabolism/oxidative-phosphorylation.pdf>)

INTRODUCTION

L'hypoxie peut être définie comme la diminution du niveau d'oxygène au sein d'un tissu. Celle-ci constitue une caractéristique majeure du microenvironnement tumoral puisqu'approximativement 50 à 60% des tumeurs contiennent des régions hypoxiques associées à un mauvais pronostic (Vaupel et al., 2001, Vaupel, 2004). Cela peut notamment s'expliquer par le fait que l'hypoxie augmente l'agressivité et la résistance des cellules tumorales à la radiothérapie et favorise la survie des cellules cancéreuses dans leur microenvironnement hostile (Hockel et al., 1993, Hockel et al., 1996). Au sein des tumeurs, deux types d'hypoxies co-existent : l'hypoxie chronique et l'hypoxie cyclique (Bayer and Vaupel, 2012). L'hypoxie chronique, décrite pour la première fois au cours des années 50 par Thomlinson et Gray (Thomlinson and Gray, 1955), résulte d'une limitation de la diffusion de l'oxygène. Ainsi, lors de la croissance tumorale, certaines cellules se retrouvent trop loin des vaisseaux sanguins pour être correctement oxygénées. En effet, la distance de diffusion de l'oxygène est d'environ 150 μm . Les cellules localisées au delà de cette distance sont dès lors localisées dans une zone hypoxique où la tension en oxygène devient extrêmement faible (Brown and Giaccia, 1998). Le phénomène d'hypoxie cyclique fut quant à lui décrit pour la première fois en 1979 par Brown (Brown, 1979) et ensuite vérifié expérimentalement par Chaplin et al. (Chaplin et al., 1986). De manière générale, on observe des fluctuations de la pression en oxygène non seulement d'une tumeur à l'autre, mais également au sein même d'une tumeur (Toffoli and Michiels, 2008). Néanmoins, ce type d'hypoxie montre des patterns clairs de périodicité. L'hypoxie cyclique fait intervenir deux échelles de temps majeures. Il se produit en effet des fluctuations de la $p\text{O}_2$ dont la cyclicité se traduit au cours des heures (de un à trois cycles) tandis que d'autres se produisent au cours des jours. Les fluctuations de la $p\text{O}_2$ au cours des heures découlent de l'architecture non fonctionnelle du réseau tumoral, menant à des variations dans le flux de globules rouges et donc, à des fluctuations de l'oxygène microvasculaire. Les fluctuations journalières de la $p\text{O}_2$ résultent quant à elles du phénomène global d'angiogenèse et du remodelage de la vasculature tumorale. Ces fluctuations touchent donc essentiellement les cellules tumorales au contraire des fluctuations au cours des heures qui elles touchent à la fois les cellules tumorales et les cellules endothéliales (Figure I.9) (Dewhirst, 2007).

3.2 Effets cellulaires de l'hypoxie

L'homéostasie intracellulaire est une caractéristique majeure et indispensable au bon fonctionnement des différents processus se déroulant au sein des cellules. Le maintien de cette homéostasie requiert une quantité d'énergie très importante. Cette énergie est principalement stockée sous la forme de molécules d'ATP. Ainsi, une cellule au repos peut allouer jusqu'à 80% de son ATP pour le fonctionnement de pompes ioniques ATP-dépendantes telles que les ATPases membranaires Na^+/K^+ . La grande majorité de la production d'ATP a lieu au sein des mitochondries. A cet endroit, l'oxydation de divers métabolites par le cycle de Krebs libère des électrons qui seront transmis à des couples moléculaires transporteurs d'électrons : NAD^+/NADH et $\text{FAD}^+/\text{FADH}_2$, respectivement formes oxydées et réduites. Ces molécules transfèrent ensuite les électrons à d'autres transporteurs situés au niveau de la membrane mitochondriale interne et organisés en chaîne au sein de différents complexes (I à IV). Au bout de cette chaîne, les électrons sont finalement transmis à une molécule d'oxygène qui réduite, formera une molécule d'eau. L'énergie libérée par ce transport d'électron est convertie en un gradient électrochimique par pompage de protons au travers de la membrane mitochondriale interne. Le potentiel électrochimique de ce gradient est ensuite utilisé par l'ATP synthase (complexe V) pour phosphoryler des molécules d'ADP en ATP (Figure I.10).

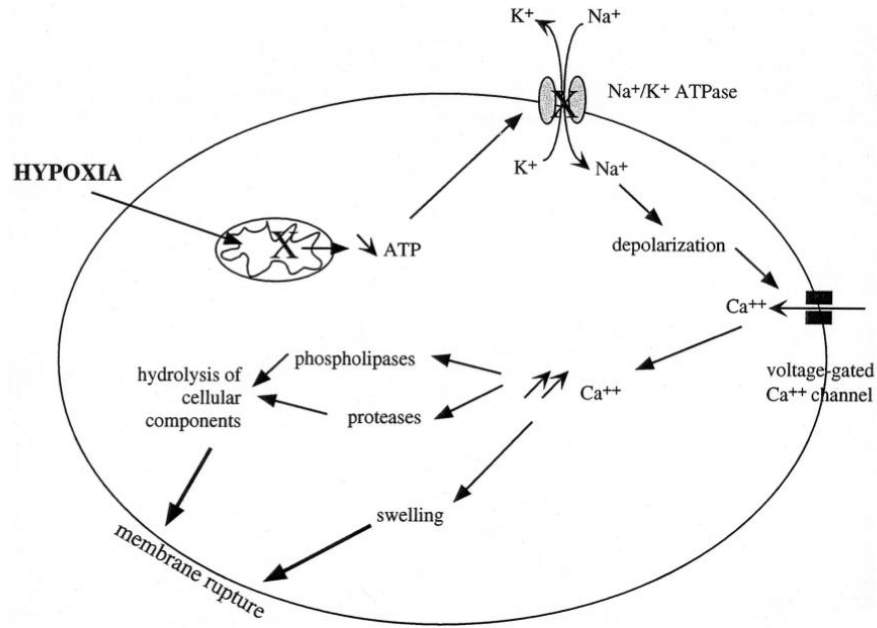


Figure I.11 : Représentation schématique de la cascade menant à la mort cellulaire lorsque les cellules sont exposées à une hypoxie sévère (Michiels, 2004).

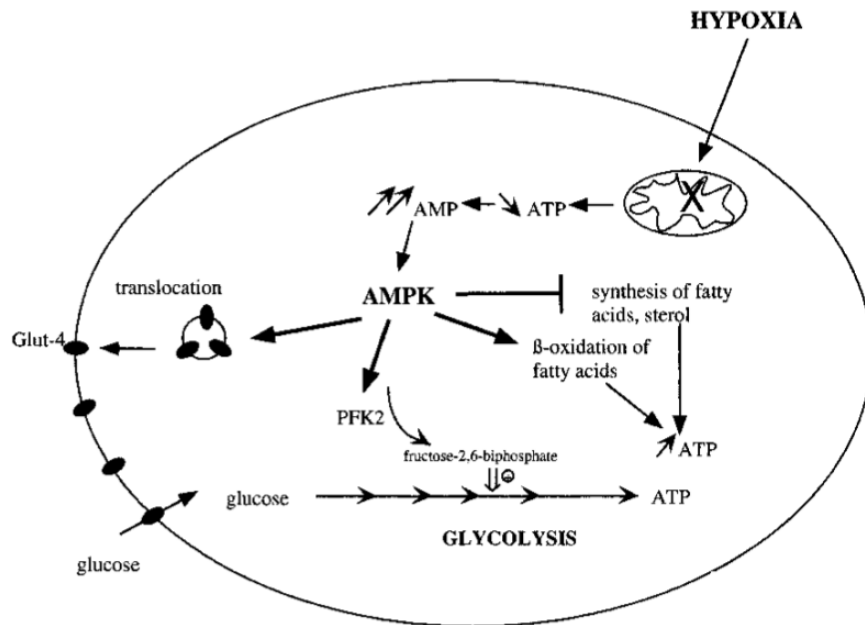


Figure I.12 : Représentation schématique de la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie (Michiels, 2004).

INTRODUCTION

Lorsque la pO_2 diminue et que l'environnement devient hypoxique, le processus de phosphorylations oxydatives est perturbé car l'oxygène n'est plus là pour jouer son rôle d'accepteur final d'électrons. Le gradient électrochimique de protons est alors fortement diminué, affectant la production mitochondriale de molécules d'ATP. Lorsque la quantité d'ATP intracellulaire décline, tous les processus énergétiques de la cellule sont perturbés. Les ATPases membranaires deviennent défectueuses, entraînant une dépolarisation membranaire. Celle-ci induit alors l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et donc une entrée massive de calcium dans la cellule. Or, le calcium constitue un des plus importants messagers secondaires intracellulaires. A haute concentration, il induit entre autre l'activation de phospholipases et de protéases. Ces événements résultent en une hydrolyse des composants cellulaires principaux, un gonflement de la cellule et éventuellement, une nécrose cellulaire (Figure I.11) (Michiels, 2004).

3.3 Adaptation cellulaire générale à l'hypoxie

Le principal problème à résoudre pour les cellules se trouvant dans des conditions hypoxiques est donc d'avoir une quantité suffisante d'ATP pour le maintien des processus cellulaires prioritaires tels que l'activité des pompes Na^+/K^+ . Il faut donc d'une part limiter les processus énergétiques moins indispensables et d'autre part, trouver des mécanismes alternatifs de production d'ATP. Une étude menée par Buttgerit et Brand a démontré que le processus de consommation d'ATP est organisé de manière hiérarchique, où la synthèse de protéines et d'acides nucléiques est la première à être inhibée lorsque l'apport énergétique devient limitant (Buttgerit and Brand, 1995). Cependant, l'inhibition de la synthèse de telles molécules et l'économie d'ATP qui en résulte ne suffisent pas pour assurer la survie de la cellule. Afin de synthétiser suffisamment d'ATP, le métabolisme switch vers deux processus cataboliques majeurs : la glycolyse anaérobie et la β -oxydation des acides gras. Ce switch est fortement médié par l'AMP-activated protein kinase (AMPK). En effet, l'AMPK est le senseur principal de la charge énergétique cellulaire par le biais de l'AMP et l'ADP qui l'activent et l'ATP qui l'inhibe. Lorsqu'elle est activée, cette enzyme redirige le métabolisme en activant les voies cataboliques et en éteignant les voies anaboliques. Bien que le rendement de la glycolyse anaérobie soit bien plus faible que celui de la glycolyse aérobie, l'action de l'AMPK permet une production suffisante d'ATP. Cela passe par une activation allostérique d'enzymes glycolytiques telles que la phosphofructokinase 2 et par la stimulation de la translocation de vésicules contenant le transporteur Glut-4 en membrane. Ces transporteurs de glucose permettent d'augmenter l'entrée cellulaire du glucose et fournissent ainsi plus de substrat pour la glycolyse (Figure I.12) (Michiels, 2004).

La plupart de ces mécanismes sont activés directement en réponse à l'hypoxie via l'activation de protéines déjà présentes. Leur induction continue ensuite à plus long terme grâce à la surexpression de gènes codant pour des facteurs clés de ces réponses. Cette adaptation au niveau moléculaire est orchestrée par une réponse transcriptionnelle médiée par de nombreux facteurs, dont ceux de la famille HIF.

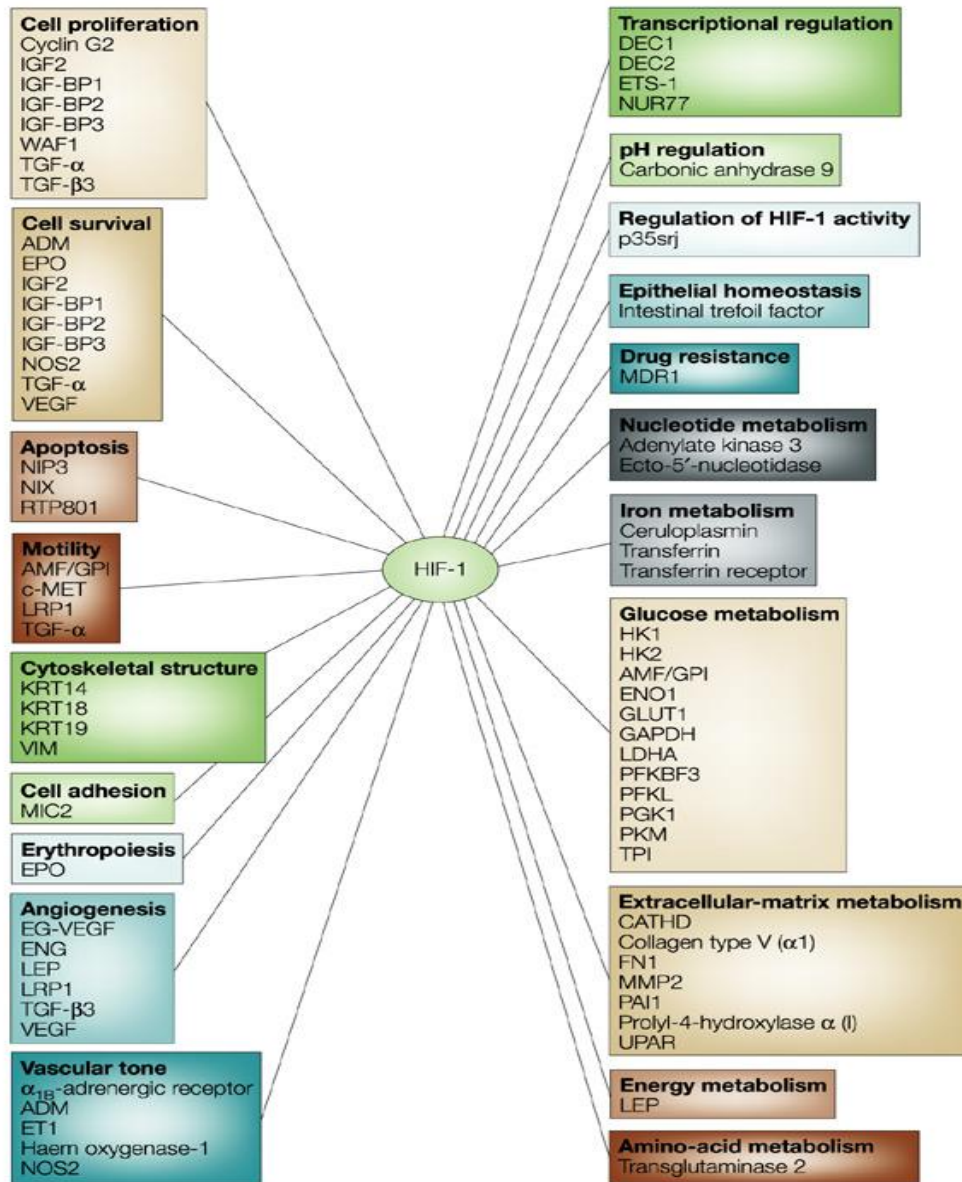


Figure I.13 : Gènes cibles de HIF-1. ADM, adrenomedullin; ALDA, aldolase A; ALDC, aldolase C; AMF, autocrine motility factor; CATHD, cathepsin D; EG-VEGF, endocrine-gland-derived VEGF; ENG, endoglin; ET1, endothelin-1; ENO1, enolase 1; EPO, erythropoietin; FN1, fibronectin 1; GLUT1, glucose transporter 1; GLUT3, glucose transporter 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; IGF2, insulin-like growth-factor 2; IGF-BP1, IGF-factor-binding-protein 1; IGF-BP2, IGF-factor-binding-protein 2; IGF-BP3, IGF-factor-binding-protein 3; KRT14, keratin 14; KRT18, keratin 18; KRT19, keratin 19; LDHA, lactate dehydrogenase A; LEP, leptin; LRP1, LDL-receptor-related protein 1; MDR1, multidrug resistance 1; MMP2, matrix metalloproteinase 2; NOS2, nitric oxide synthase 2; PFKBF3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3; PGK 1, phosphoglycerate kinase 1; PFKL, phosphofructokinase L; PAI1, plasminogen-activator inhibitor 1; PKM, pyruvate kinase M; TGF-alpha, transforming growth factor-alpha; TGF-beta3, transforming growth factor-beta3; TPI, triosephosphate isomerase; VEGF, vascular endothelial growth factor; UPAR, urokinase plasminogen activator receptor; VEGFR2, VEGF receptor-2; VIM, vimentin (Semenza, 2003).

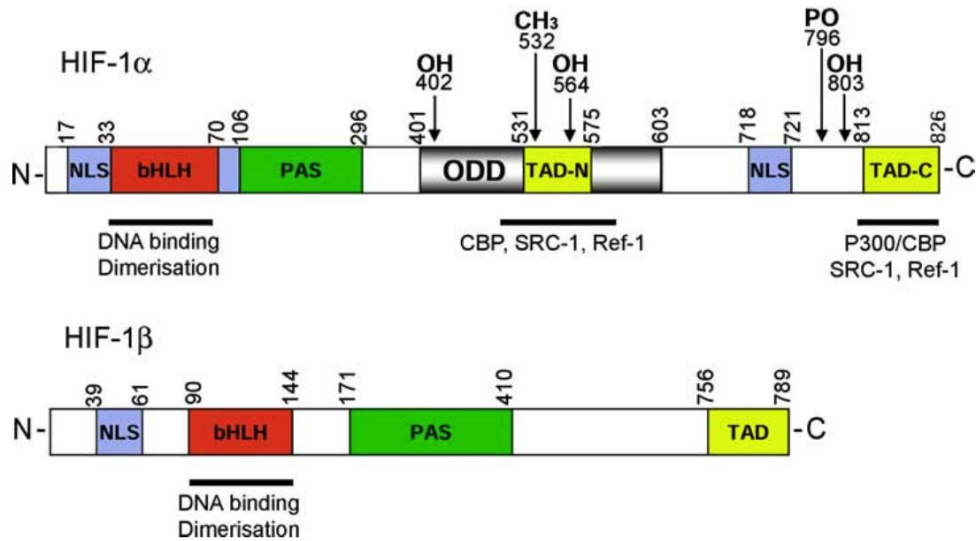


Figure I.14 : Structures de HIF1- α et HIF1- β (Dery et al., 2005).

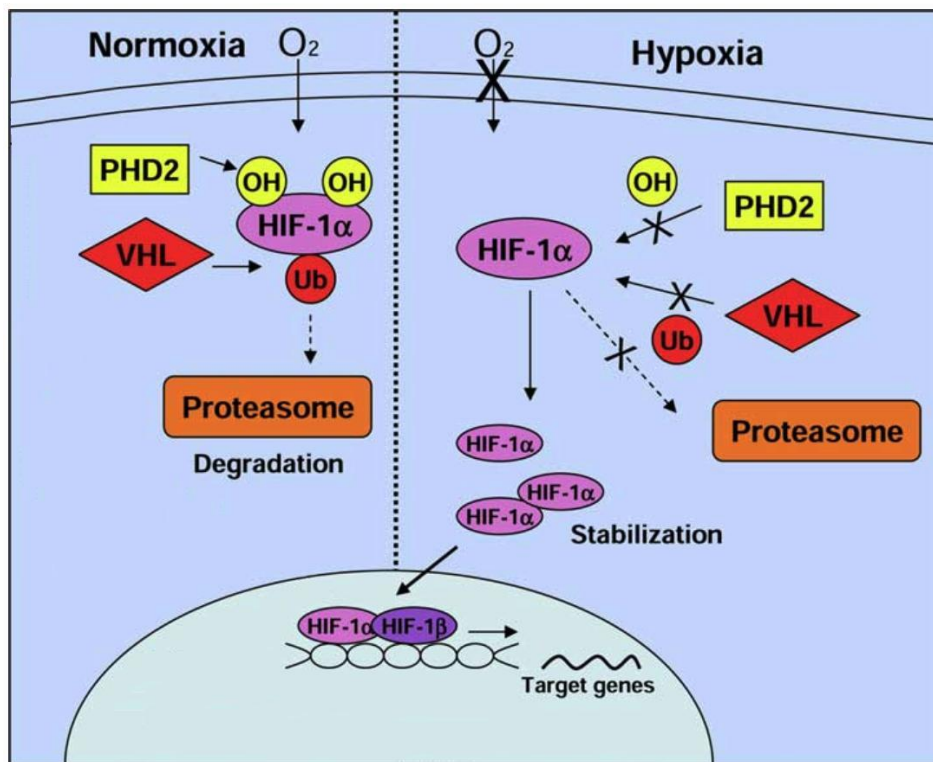


Figure I.15 : Régulation dépendante de l' O_2 de HIF-1. En présence d'oxygène, HIF-1 α est hydroxylé au niveau de deux résidus prolines par l'intermédiaire d'une protéine PHD2. Ces hydroxylations favorisent l'interaction de HIF-1 α avec la protéine VHL. Cela entraîne l'ubiquitination de HIF-1 α et promeut sa dégradation par le protéasome. En conditions hypoxiques, l'hydroxylation des prolines de HIF-1 α est bloquée. Cette sous-unité s'accumule alors et transloque dans le noyau où elle dimérise avec HIF-1 β pour former le complexe HIF-1. L'hétérodimère formé peut finalement induire l'expression des gènes cibles en se liant à des séquences HRE au niveau de l'ADN (Dery et al., 2005)

INTRODUCTION

3.4 Adaptation moléculaire à l'hypoxie

3.4.1 **Le facteur de transcription HIF-1 : structure, fonction et régulation**

Le facteur de transcription HIF-1 est un régulateur clé responsable de l'induction de gènes facilitant l'adaptation et la survie des cellules en condition d'hypoxie. Ce facteur fut découvert en 1992 dans le laboratoire de Semenza suite à l'identification d'une séquence HRE (hypoxia response element) dans le gène de l'érythropoïétine, une hormone stimulant la production des érythrocytes et dont la transcription est induite par l'hypoxie (Semenza, 2003). Depuis sa découverte, plus de 60 gènes cibles de HIF-1 ont été découverts. Ces gènes sont impliqués dans l'angiogenèse, la survie et la prolifération cellulaire, l'apoptose, le métabolisme du glucose et la migration cellulaire (Figure I.13) (Dery et al., 2005).

Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités nommées α et β . HIF-1 α , localisée sur le chromosome 14 (826 acides aminés ; 120kDa) est la sous-unité sensible à l'oxygène tandis que HIF-1 β , localisée sur le chromosome 1 (789 acides aminés ; 94kDa), est constitutivement exprimée dans les cellules sous toutes les conditions d'oxygène (Pereira et al., 2013). Ces sous-unités possèdent un domaine bHLH (basic-helix-loop helix) ainsi qu'un domaine PAS (PER-ARNT-SIM) au niveau de leur extrémité aminotermine (Figure I.14) (Ruas and Poellinger, 2005). Ces domaines sont nécessaires à la formation de l'hétérodimère entre la sous-unité α et la sous-unité β ainsi que pour la liaison à l'ADN. En normoxie, la transcription et la synthèse de HIF-1 α sont constitutives et non affectées par la présence de l'oxygène. Cependant, dans ces conditions, cette sous-unité est extrêmement labile et rapidement dégradée (temps de demie vie = 5 min). Ce processus est médié par l'hydroxylation de deux résidus proline du domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) par une protéine PHD2 (Prolyl hydroxylase domain protein 2). Ces hydroxylations favorisent l'interaction de HIF-1 α avec la protéine de Von Hippel-Lindau (pVHL). La liaison de cette protéine conduit à la formation d'un complexe activant l'ubiquitine ligase E3 qui entraîne finalement l'ubiquitination de la sous-unité HIF-1 α , marquage typiquement impliqué dans la dégradation protéique (Figure I.15) (Semenza, 2010, Semenza, 2012).

En conditions hypoxiques, HIF-1 α est stabilisé. En effet, l'hydroxylation des prolines de HIF-1 α est bloquée. Cette sous-unité s'accumule alors et par l'intermédiaire de séquences NLS, subit une translocation nucléaire où elle dimérise avec HIF-1 β pour former le complexe HIF-1. L'hétérodimère formé peut alors se lier à des séquences HRE de l'ADN. Des co-activateurs se lient au complexe HIF-1 et induisent l'expression des gènes cibles (Figure I.15) (Dery et al., 2005).

D'autres mécanismes régulent l'activation de HIF-1 α . Parmi ceux-ci, la voie des MAP kinases est impliquée dans un mécanisme aboutissant à la phosphorylation de cette sous-unité. La phosphorylation ne module pas la stabilité de la protéine et n'affecte pas non plus sa capacité de lier l'ADN. En réalité, cette phosphorylation participe plutôt à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Ke and Costa, 2006). Cette phosphorylation est à l'origine de différences phénotypiques induites par l'hypoxie chronique et l'hypoxie cyclique.

3.4.2 **La régulation de HIF-1 α en hypoxie cyclique.**

La régulation de HIF-1 α en hypoxie cyclique est tout à fait particulière. L'expression protéique de cette sous-unité a été étudiée au cours différentes cinétiques impliquant des cycles d'hypoxie/réoxygénation. Ainsi, Yuan et al. ont démontré une stabilisation de HIF-1 α

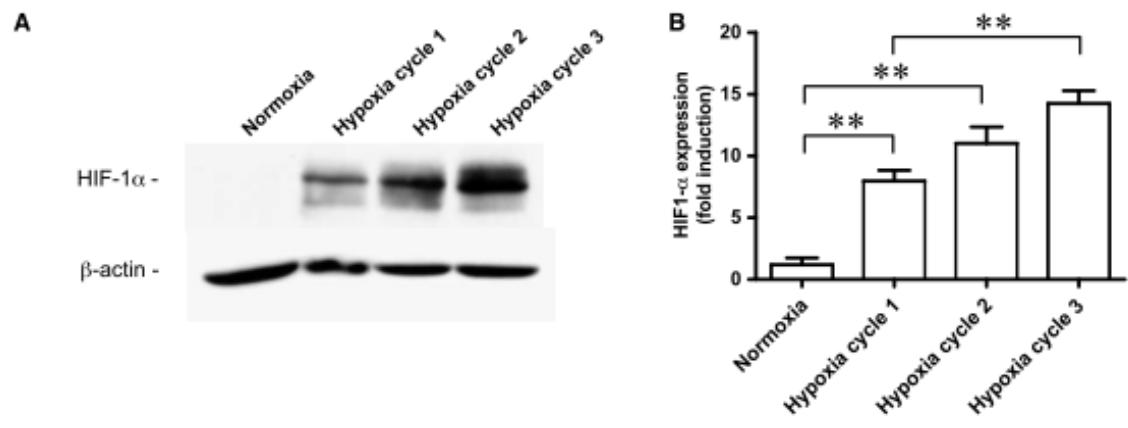


Figure I.16 : Corrélation entre le nombre de cycle d'hypoxie et l'accumulation intracellulaire de HIF-1 α . (A) Immunoblots montrant l'accumulation de HIF-1 α après la fin de chaque cycle d'hypoxie dans des cellules endothéliales. (B) Fold d'induction de l'accumulation de la protéine HIF-1 α pendant chaque cycle consécutif d'hypoxie (Martinive et al., 2006).

INTRODUCTION

lors d'une hypoxie cyclique impliquant des cycles de 30 secondes d'hypoxie suivis par 4 minutes de réoxygénation. De plus, l'augmentation de l'abondance de HIF-1 α était dépendante du nombre de cycles (Yuan et al., 2005). Martinive et al. répétèrent l'expérience selon une cinétique impliquant plusieurs cycles d'une heure d'hypoxie suivie de 30 minutes de réoxygénation. Les résultats obtenus par quantification de western blot montrèrent à nouveau une corrélation entre les niveaux d'expression de HIF-1 α et l'augmentation du nombre de cycles et ce, malgré la dégradation protéique complète au cours des périodes de réoxygénation (Figure I.16) (Martinive et al., 2006). Un an plus tard, Toffoli et al., apportèrent la preuve de l'activité de ce facteur dans ces conditions (Toffoli et al., 2007).

3.5 Réponses phénotypiques induites par HIF-1

Contrairement aux adaptations cellulaires rapides, l'activation de HIF-1 par l'hypoxie permet une adaptation des cellules à plus long terme. Parmi ces adaptations, notons l'érythropoïèse, l'activation de signaux de survie cellulaire et l'induction de l'angiogenèse.

L'hypoxie chronique, via l'activation de HIF-1, est connue pour induire l'expression de l'érythropoïétine. Cette protéine est impliquée dans la croissance naturelle des globules rouges. En favorisant l'érythropoïèse, l'hypoxie chronique augmente donc la capacité du transport de l'oxygène vers les tissus tumoraux. L'hypoxie et HIF-1 stimulent également la production de facteurs de croissance tels que l'IGF2 et le TGF- α . La liaison de ces facteurs à leurs récepteurs respectifs active des voies de signalisation menant à la prolifération et la survie cellulaire, et stimule également l'expression de HIF-1 α lui-même. L'activité transcriptionnelle de HIF-1 induit également l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse. Parmi ceux-ci, l'expression et la sécrétion du VEGF permet de recruter, de faire migrer, et de favoriser la prolifération des cellules endothéliales. L'induction du VEGF permet ainsi de densifier le réseau vasculaire tumoral pour un meilleur approvisionnement en oxygène (Giaccia et al., 2004, Lee et al., 2004).

Contrairement à l'hypoxie chronique qui touche essentiellement les cellules tumorales, l'hypoxie cyclique atteint également les cellules endothéliales du réseau sanguin tumoral. En 2006, Martinive et al. ont étudié l'effet de l'hypoxie cyclique combinée à un traitement par radiothérapie sur les cellules endothéliales. Les résultats obtenus montrent que les cellules doublement exposées aux radiations et à l'hypoxie cyclique possèdent des caractéristiques de migration et d'association en structures tubulaires environ 3 fois plus élevées que des cellules incubées en normoxie sans radiothérapie (Martinive et al., 2006). Plus tard, Toffoli et al. démontrèrent que l'hypoxie cyclique seule était capable de favoriser ces deux phénomènes (Toffoli et al., 2009). L'hypoxie cyclique peut ainsi favoriser l'angiogenèse par modification de l'expression génique des cellules tumorales, mais également en influençant directement le comportement des cellules endothéliales.

4) Le microenvironnement tumoral

Comme nous l'avons vu, les cellules tumorales sont définies par diverses caractéristiques telles que la capacité à développer une prolifération incontrôlée, une résistance à la mort cellulaire ou encore un phénotype invasif. Aujourd'hui, il apparaît de plus en plus clairement que les cellules tumorales ne constituent que la partie émergée de l'iceberg. En effet, d'autres types cellulaires côtoient les cellules néoplasiques au sein de la tumeur. Ainsi, on trouve également la présence de fibroblastes, des cellules immunitaires, mais également de cellules

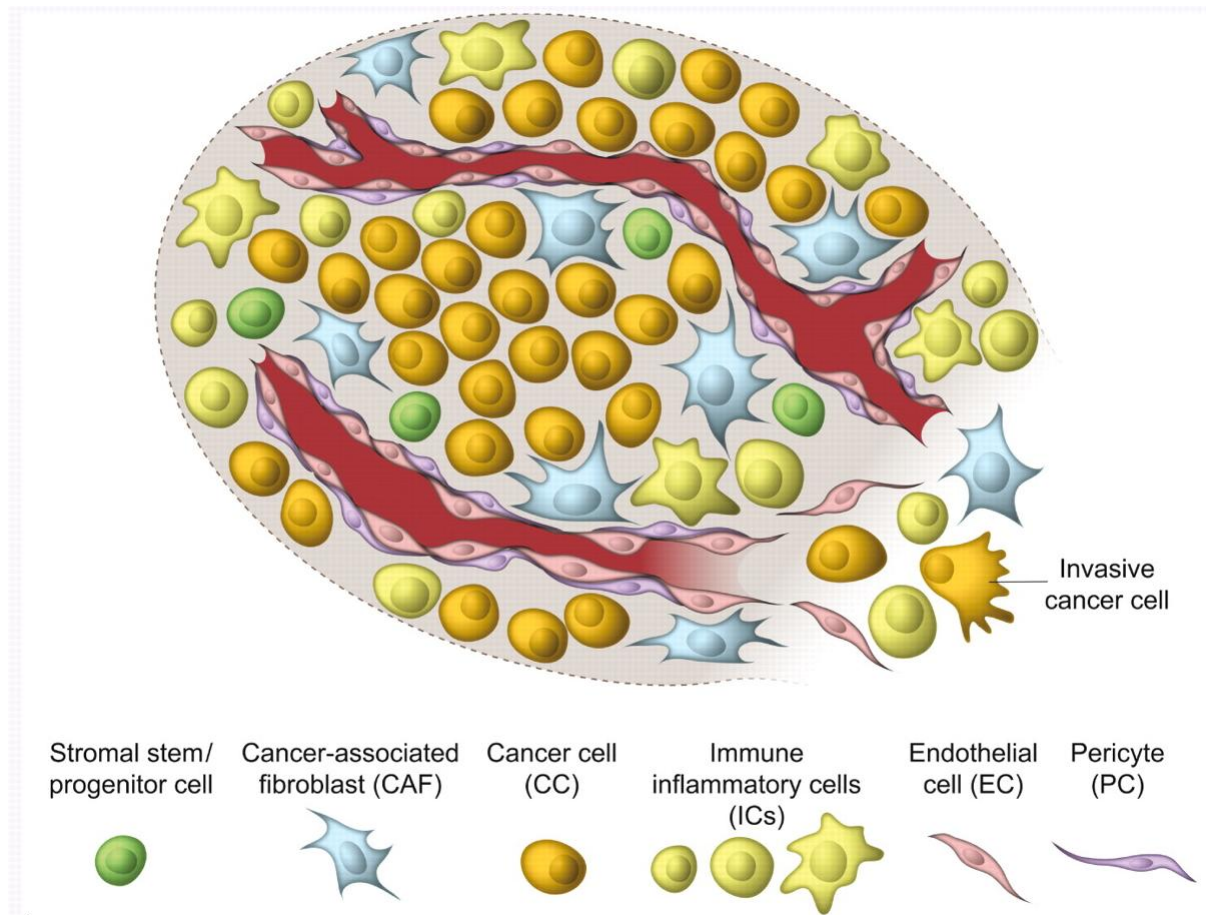


Figure I.17 : Représentation schématique du microenvironnement tumoral (Sherman et al., 2012).

INTRODUCTION

endothéliales, de péricytes, de cellules souches et de cellules musculaires lisses (Murdoch and Lewis, 2005, Lorusso and Ruegg, 2008). Cet ensemble de cellules, ajouté à la matrice extracellulaire les entourant, est généralement repris sous le terme de microenvironnement tumoral. Les interactions au sein de celui-ci entre les différents types cellulaires et avec la matrice extracellulaire jouent un rôle certain dans la progression tumorale. Une des caractéristiques majeures du microenvironnement tumoral implique un état inflammatoire chronique qui est d'ailleurs repris comme une caractéristique émergente du cancer. Cet état inflammatoire est médié par les cellules du système immunitaire. Parmi celles-ci, certaines d'entre elles seront détournées pour la promotion tumorale (Figure I.17) (Hanahan and Weinberg, 2011)

4.1 L'inflammation à l'origine du cancer

L'idée d'une association entre le développement du cancer et l'inflammation chronique est depuis longtemps déjà postulée. En effet, dès 1863, Rudolf Virchow établit un lien entre inflammation chronique et cancer lorsqu'il observa un important infiltrat leucocytaire dans une tumeur (Balkwill and Mantovani, 2001). A l'époque, il interpréta ce phénomène comme une tentative avortée du système immunitaire à rejeter la tumeur. Ce n'est qu'un siècle plus tard qu'on découvrit que ces cellules immunitaires, et en particulier les phagocytes, jouaient un rôle actif dans le processus de carcinogenèse. Aujourd'hui, de nombreuses maladies inflammatoires chroniques sont associées à un risque de carcinogenèse. Au niveau de l'intestin, la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont connues comme étant associées au développement de cancers intestinaux. Il en va de même pour le syndrome de Barrett associé au cancer de l'œsophage, pour les virus de l'hépatite B et C associés au cancer hépatique, pour *Helicobacter pylori* associé au cancer de l'estomac, ainsi que pour l'HPV (human papillomavirus) dans le cadre des carcinomes utérins. D'autres évidences de cette association proviennent de l'utilisation de médicament anti inflammatoires non-stéroïdiens utilisés de manière préventive dans le cadre de la polypose adénomateuse familiale. Ainsi, le cancer et l'inflammation chronique sont reliés à la fois par l'épidémiologie, l'histopathologie et l'efficacité des prophylaxies anti-inflammatoires (Rakoff-Nahoum, 2006).

4.2 L'inflammation dans la progression tumorale

4.2.1 **Les acteurs moléculaires**

De nombreux facteurs endogènes ont été identifiés dans le contexte de l'inflammation reliée au cancer. Parmi ceux-ci, les facteurs de transcription NF- κ B et STAT3, et les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , IL-6 et IL-23 jouent un rôle majeur.

Il a été montré que le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans de nombreux processus cellulaires normaux tels que les réponses inflammatoires et immunitaires. Divers stimuli peuvent induire l'activité de NF- κ B, tels que le TNF- α , les lipopolisaccharides bactériens, les radiations ionisantes et les ROS (Reactive Oxygen Species) (Osborn et al., 1989, Kida et al., 2005, Qin et al., 2005). La plupart des activateurs de NF- κ B induisent la dégradation de son inhibiteur majeur, l'I κ B, par activation d'une kinase phosphorylant cet inhibiteur. NF- κ B est suspecté de jouer un rôle majeur dans le processus global de tumorigenèse. En effet, ce facteur de transcription contrôle l'expression de gènes capables d'inhiber le processus de mort cellulaire. Cette fonction anti-apoptotique est principalement due à l'induction par NF- κ B de l'expression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques. Parmi ces protéines, on retrouve des membres de la famille des IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) tels que xIAP et c-FLIP ou encore des membres de la famille Bcl-2 incluant Bcl-2 lui-même et Bcl-xL. En

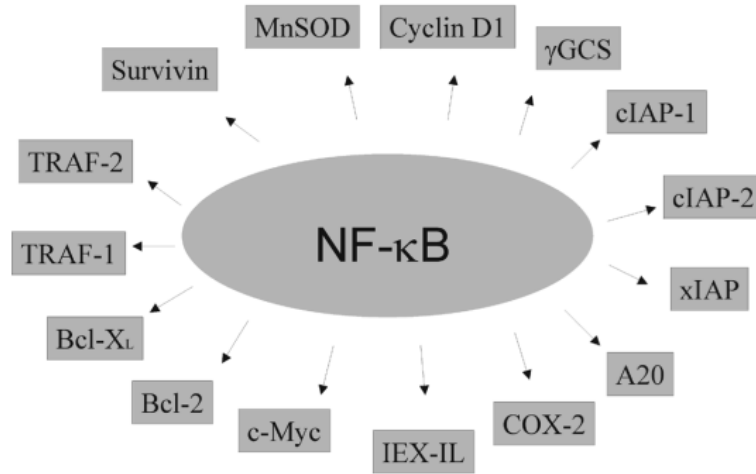


Figure I.18 : Induction par NF-κB de gènes anti-apoptotiques et de gènes favorisant la survie cellulaire (Shishodia and Aggarwal, 2002).

INTRODUCTION

plus de cette fonction anti-apoptotique, NF- κ B peut initier les processus de croissance et de survie cellulaire. En effet, NF- κ B contrôle certains des gènes régulateurs clés du cycle cellulaire incluant majoritairement des cyclines (cyclines D1, D2 et D3), des kinases dépendantes des cyclines (CDK2, CDK4 et CDK6), ou encore d'autres gènes tels que c-myc (Figure I.18) (Shishodia and Aggarwal, 2002). NF- κ B est aussi impliqué dans les processus angiogéniques et métastatiques en contrôlant l'expression de facteurs clés comme le VEGF, l'IL-6, l'IL-8, CCL2, les MMPs et VCAM-1, ICAM-1, CXCR4 respectivement (Fan et al., 2013).

Comme NF- κ B, les protéines de la famille STAT, et en particulier STAT3, semblent jouer un rôle crucial dans le développement tumoral en induisant et en maintenant un microenvironnement inflammatoire procarcinogène. Bien que l'activateur majeur de STAT3 soit l'IL-6, ce facteur de transcription peut être activé par une grande variété de cytokines, de facteurs de croissance ou d'oncogènes. Outre ses implications physiologiques, STAT3 constitue un point de convergence pour de nombreuses voies de signalisation oncogéniques. L'activation de STAT3 conduit à l'inhibition de la mort cellulaire en activant l'expression de gènes du cycle cellulaire et de gènes « pro-survies » tels que c-Myc, cdc25A, la survivine ou encore Bcl-xL. De plus, STAT3 induit l'évasion de la tumeur face au système immunitaire en inhibant l'expression de molécules immunostimulantes de types Th1 (IL-12 et IFN γ) et en promouvant l'expression de facteurs immunosuppresseurs, menant à l'inhibition des cellules dendritiques. Certaines thérapies basées sur l'inactivation de STAT3 semblent prometteuses. Par exemple, l'inactivation de ce facteur de transcription dans les cellules épithéliales de l'intestin diminue la progression du cancer associée à la colite de manière significative. Le knockdown spécifique de STAT3 dans les kératinocytes protège également du cancer de la peau induit par le DMBA (7,12-Dimethylbenzanthracène) (Sellier et al., 2013).

Les mécanismes inflammatoires de défense contre les infections bactériennes et virales contribuent également au processus carcinogène. En effet, un des mécanismes effecteurs majeurs par lequel l'hôte combat cette infection est la production de radicaux libres tels que les intermédiaires dérivés de l'oxygène (ROS) et les intermédiaires réactifs dérivés de l'azote (RNI). Ces ROI et ces RNI induisent respectivement des dommages oxydatifs et des nitrations au niveau des bases de l'ADN, augmentant ainsi le risque de mutation de l'ADN (Hussain et al., 2003). Certains de ces dérivés peuvent également activer NF- κ B et ainsi amplifier le processus carcinogène.

4.2.2 Voies de signalisation du TNF- α

Le TNF- α est synthétisé par les cellules immunitaires sous la forme d'une protéine transmembranaire de 34kDa. Il existe pourtant deux formes homotrimériques : une exprimée en membrane des cellules les produisant et une autre soluble, formée par l'extrémité C-terminale de la version membranaire après clivage de celle-ci par des enzymes de conversion. Les réponses cellulaires au TNF- α sont médiées par deux récepteurs TNFR1 et TNFR2 aussi appelés CD120a et CD120b. L'expression de chaque récepteur est fortement régulée à la surface des cellules. La liaison du TNF- α à ses récepteurs peut activer des voies de signalisation menant à trois réponses cellulaires majeures : la survie et prolifération cellulaire, la transcription de gènes proinflammatoires et la mort cellulaire (Waters et al., 2013).

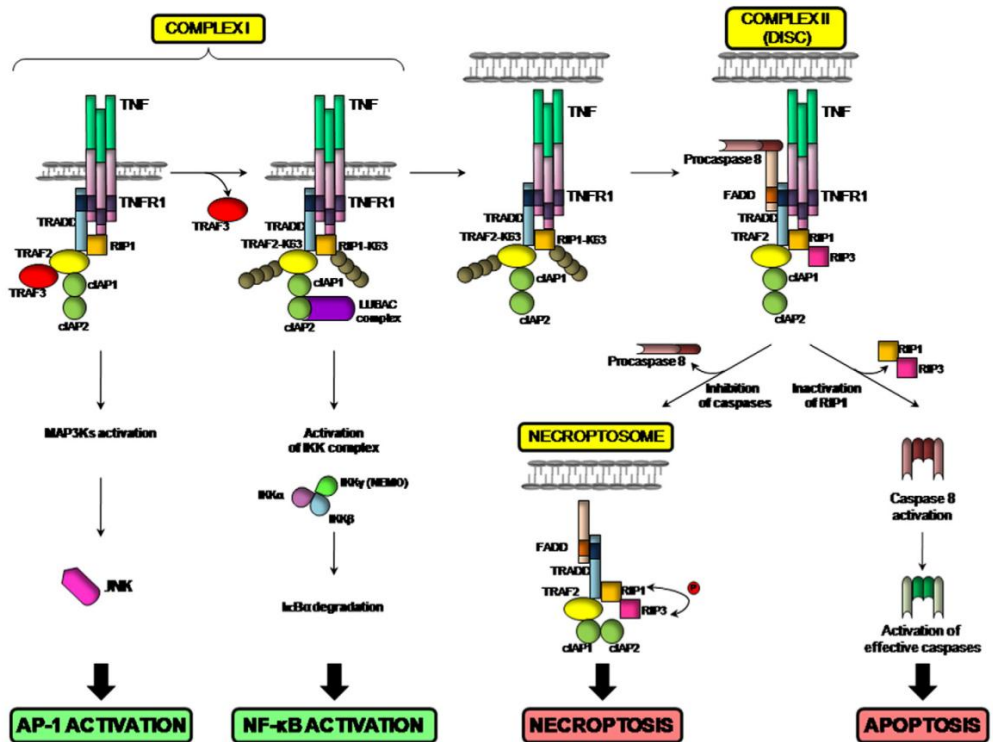


Figure I.19 : Voies de signalisation induites par la liaison du TNF- α au récepteur TNFR1 (Cabal-Hierro and Lazo, 2012).

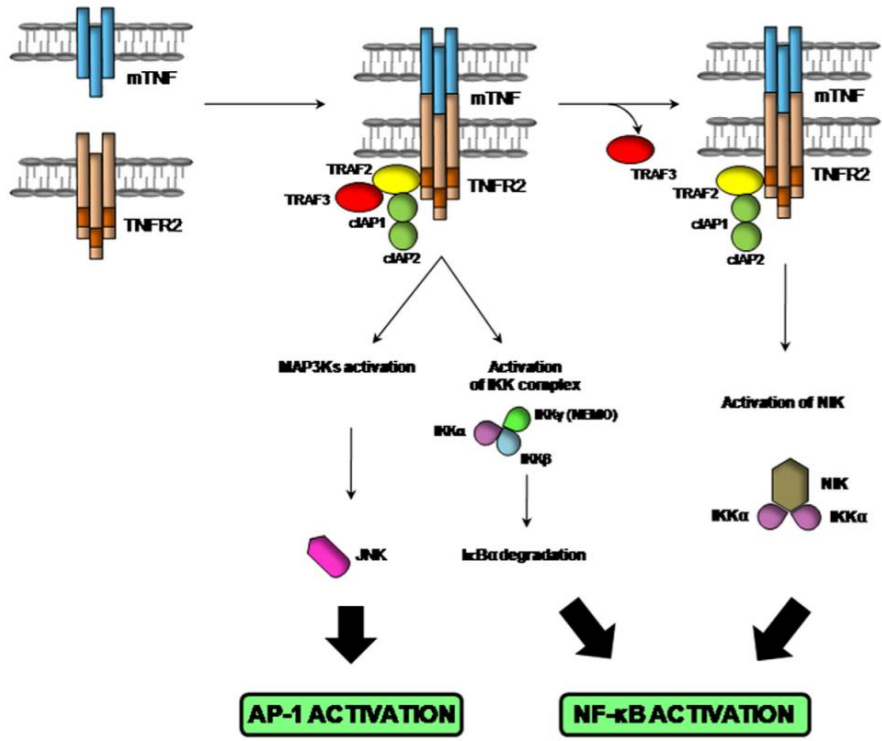


Figure I.20 : Voies de signalisation induites par la liaison du TNF- α au récepteur TNFR2 (Cabal-Hierro and Lazo, 2012).

INTRODUCTION

a) Voies de signalisation TNFR1

La liaison du TNF- α au récepteur TNFR1 entraîne la trimérisation du récepteur et le recrutement d'une protéine TRADD (TNFR-associated death domain). L'interaction entre le récepteur et cette protéine adaptatrice est réalisée par l'intermédiaire d'un domaine de mort. D'autres protéines viennent ensuite se greffer parmi lesquelles une sérine thréonine kinase appelée RIP1 (receptor interacting protein) et une E3 ubiquitine ligase appelée TRAF2 (TNF receptor-associated factor) (Hsu et al., 1996, Takeuchi et al., 1996). Associées à d'autres protéines, TNFR1, TRADD, RIP1 et TRAF2 forment le complexe 1. Ce complexe induit des voies de signalisation menant à la transcription des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 par activation de la voie des MAPK et dégradation d'I κ B respectivement (Figure I.19). Ces voies induisent l'expression de gènes pro-inflammatoires, anti-apoptotiques, et mitogènes (Waters et al., 2013).

Il peut également arriver que la liaison du TNF- α à TNFR1 provoque l'internalisation du récepteur. Cette endocytose induit un changement de conformation du récepteur. Dans ces conditions, un autre complexe moléculaire se forme. Celui-ci, communément repris sous le terme de DISC (death inducing signalling complex), inclus les protéines TRADD, FADD ainsi que la pro-caspase 8. L'activation autocatalytique de la procaspase 8 liée à ce complexe libère la caspase 8 activée, qui initie l'apoptose par clivage et activation de la pro-caspase 3 en caspase 3 active (Cabal-Hierro and Lazo, 2012). Cette caspase effectrice est impliquée dans le clivage de l'ADN. Pour ce faire, cette caspase catalyse le clivage protéolytique d'un inhibiteur de DNase nommé iCAD (inhibitor of caspases activated DNase). Cet inhibiteur ne peut donc plus inactiver la DNase CAD qui va finalement cliver les molécules d'ADN (Degen et al., 2000). Dans le cas où la caspase 8 est délétée ou inhibée, le complexe DISC devient incapable de déclencher ce processus apoptotique. Dans ces conditions, l'activation de TNFR1 peut mener à une voie de nécroptose (Figure I.19) (Cabal-Hierro and Lazo, 2012).

b) Voie de signalisation TNFR2

Les voies de signalisation initiées par TNFR2 sont beaucoup moins décrites que celles initiées par TNFR1. Cependant, on sait aujourd'hui que le récepteur TNFR2 est capable d'activer Etk (endothelial/epithelial tyrosine kinase), une kinase cytosolique impliquée dans l'adhérence, la migration, la prolifération et la survie cellulaire (Bradley, 2008). Ainsi, l'activation d'Etk dans les cellules endothéliales induit l'activation d'une voie angiogénique impliquant PI3K et Akt. Par ailleurs, dans le contexte des carcinomes rénaux, le complexe TNFR2-Etk-VEGFR2 activé dans les cellules tumorales induit l'entrée de ces cellules dans le cycle cellulaire (Waters et al., 2013). Comme dans le cas de TNFR1, la liaison du TNF- α à TNFR2 peut induire l'activation de NF- κ B. Cela peut se produire suite à l'activation de NIK (NF- κ B-inducing kinase) d'une part, ou via la dégradation d'I κ B α d'autre part. Elle peut aussi mener à l'activation de la voie des MAPK et induire ainsi l'activation d'AP-1 (Figure I.20) (Cabal-Hierro and Lazo, 2012).

c) Répartition et régulation des récepteurs au TNF- α

L'expression des récepteurs au TNF- α est fortement régulée au sein des différents types cellulaires. Cette régulation s'opère tant au niveau physiologique que pathologique. La grande majorité des lignées cellulaires expriment à la fois TNFR1 et TNFR2. Cependant, certaines cellules comme les cellules hématopoïétiques expriment préférentiellement TNFR2 (Santee and Owen-Schaub, 1996). Certains stimuli tels que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-10 sont également connus pour réduire l'expression de TNFR1 et, au contraire, induire celle de TNFR2 (Kalthoff et al., 1993, Winzen et al., 1992, Winzen et al., 1993). L'étude de carcinomes rénaux a démontré que la présence d'autres facteurs environnementaux pouvait

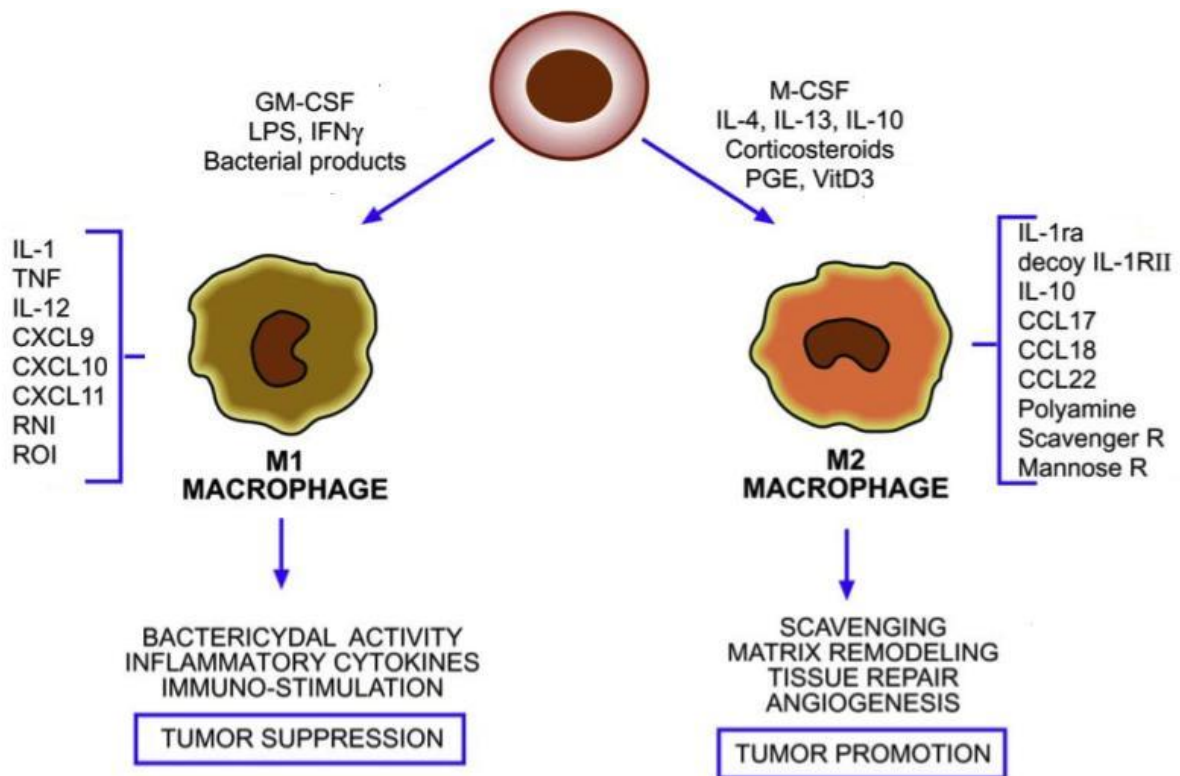


Figure I.21 : Polarisation des macrophages et fonctions associées. En réponse à des stimuli environnementaux tels que le GM-CSF, les LPS et l'IFN γ , les monocytes se différencient en macrophages M1 impliqués dans la défense contre les bactéries, l'élimination des tumeurs, et l'induction de la réponse immunitaire. En présence d'autres stimuli tels que l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13, les monocytes se différencient en macrophages M2 impliqués dans la réparation tissulaire, la progression tumorale et la diminution des réponses immunitaires Th1 et adaptatives (Sica et al., 2006).

INTRODUCTION

aussi moduler l'expression de ces récepteurs. En effet, en conditions physiologiques normales, les cellules épithéliales des tubes rénaux sont totalement dépourvues de TNFR2. En revanche, suite à une ischémie ou à une inflammation, l'expression de TNFR1 décline fortement et l'expression du récepteur TNFR2, jusqu'ici absente, peut être détectée. Le niveau de TNFR2 soluble plasmatique est d'ailleurs corrélé avec la malignité de la tumeur (Elsasser-Beile et al., 1998).

Ainsi, en fonction du contexte cellulaire et des conditions du microenvironnement, la signalisation du TNF- α peut mener à divers processus tels que la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, la mort cellulaire, l'angiogenèse et l'inflammation. Le déclenchement de ces réponses cellulaires variées reflète l'existence d'un réseau de régulation complexe situé en aval des différents récepteurs (Cabal-Hierro and Lazo, 2012).

4.3 Rôle des macrophages

4.3.1 **Polarité et rôles physiologiques**

Les macrophages sont des acteurs essentiels de l'immunité innée et jouent un rôle central dans l'inflammation et la défense de l'hôte face aux infections (Sica and Mantovani, 2012). Ces cellules dérivent des monocytes circulants (Steinman and Idoyaga, 2010). Après leur extravasation dans le tissu conjonctif, les monocytes deviennent des macrophages indifférenciés aussi appelés M0. En fonction de différents signaux locaux présents dans leur environnement, ces macrophages M0 peuvent se polariser en deux phénotypes majeurs: les macrophages M1 dits classiques et les macrophages M2 activés de manière alternative, classification basée sur la polarisation lymphocytaire Th1/Th2 (Solinas et al., 2009).

En réponse à des signaux de danger tels que les lipopolysaccharides bactériens ou l'interféron gamma, les macrophages adoptent un phénotype M1 décrit comme attirant et activant les cellules de l'immunité adaptative (Heusinkveld and van der Burg, 2011). Les macrophages M1 sont caractérisés par une augmentation du métabolisme de l'arginine, se traduisant par une haute expression de la synthase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS). Le phénotype M1 est également associé à une capacité accrue à présenter les antigènes, à la production de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-12, l'IL-23 et le TNF- α , de chémokines CXCL9 et CXCL10, ainsi qu'à la formation d'intermédiaires toxiques tels que les ROI et le monoxyde d'azote (NO) (Mantovani et al., 2004). Ces caractéristiques contribuent au déclenchement de la réponse Th1, impliquée dans la phagocytose de bactéries ou de cellules indésirables telles que les cellules tumorales (Figure I.21) (Mantovani et al., 2002, Heusinkveld and van der Burg, 2011, Sica and Mantovani, 2012). La présence dans l'environnement des cellules d'autres stimuli comme l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et le TGF β induit une polarisation M2 des macrophages. Ces macrophages M2 sont caractérisés par l'induction des voies de l'arginase, se traduisant par la production d'ornithine et de polyamines. Les macrophages M2 sont typiquement caractérisés par un faible niveau d'expression d'IL-12, et une forte expression des cytokines IL-10, IL-1 β , IL-1ra, IL-R2. D'autres molécules importantes sont fortement exprimées dans ce type de macrophage. Parmi celles-ci, notons les chémokines CCL22 et CCL24, les récepteurs au mannose et au galactose, le VEGF, et de nombreuses MMPs (Gordon and Martinez, 2010, Mantovani and Sica, 2010, Yue et al., 2012). Ces macrophages jouent un rôle très important dans l'élimination des parasites, mais également dans des processus physiologiques comme la réparation tissulaire où ils induisent la polarisation des lymphocytes T vers un phénotype Th2 et tamponnent les réponses immunitaires (Figure I.21) (Kreider et al., 2007). Cependant, ces classifications M1 et M2 sont une extrême simplification des types de macrophages qui peuvent être détectés. Les macrophages

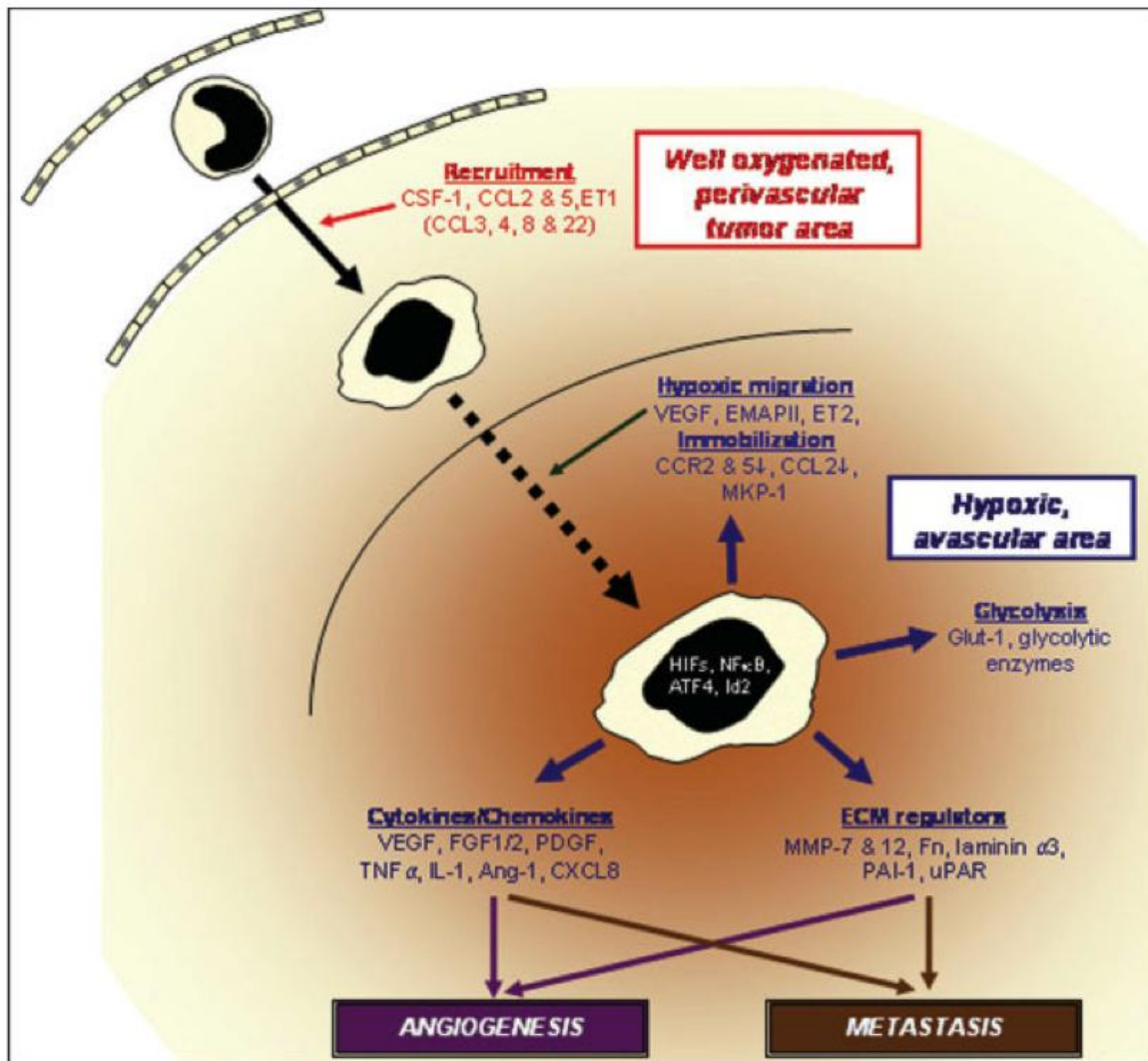


Figure I.22 : Migration et expression génique des TAMs dans les régions hypoxiques d'une tumeur. Les TAMs s'accumulent dans les régions hypoxiques en réponse à des chémoattractants dont la sécrétion est induite par l'hypoxie (VEGF, EMAPII, endothéline 2). Une fois dans la région hypoxique, l'activation de HIF-1 et d'NF-κB dans les TAMs provoque l'expression de facteurs pro-angiogéniques qui favorisent l'angiogénèse tumorale et la formation de métastases (Murdoch and Lewis, 2005).

INTRODUCTION

constituent en effet une population extrêmement hétérogène présentant une forte plasticité. En réalité, ces classifications M1 et M2 constituent les extrémités d'un continuum d'états fonctionnels. Ces différents états permettent aux macrophages de produire une réponse adaptée en fonction des signaux perçus dans leur microenvironnement (Mantovani et al., 2002, Heusinkveld and van der Burg, 2011).

4.3.2 Macrophages associés aux tumeurs : TAMs

Depuis longtemps les macrophages sont connus pour jouer un rôle important dans la progression tumorale. En effet, les macrophages peuvent représenter jusqu'à 70% de la masse tumorale (Murdoch and Lewis, 2005). De nombreuses études ont fait état d'une corrélation étroite entre le nombre et/ou la densité des macrophages tumoraux (TAMs) avec un mauvais pronostic (Yue et al., 2012, Steidl et al., 2010, Bingle et al., 2002).

a) Recrutement dans la tumeur

Les cellules du microenvironnement tumoral et les cellules tumorales elles-mêmes induisent le recrutement des monocytes et macrophages par sécrétion de molécules chémoattractantes appelées chémokines. Bien qu'il existe de nombreuses chémokines impliquées dans ce recrutement, CCL2 et CCL5 sont les acteurs principaux. Les monocytes, via les récepteurs CCR2 et CCR5 associés, migrent alors par chimotaxie en suivant ce gradient (Bosco et al., 2008). Certaines cytokines comme le VEGF, PDGF et M-CSF sont également connues pour favoriser le recrutement des macrophages (Figure I.22) (Solinas et al., 2009).

Il apparaît que les TAMs sont préférentiellement localisés au sein des régions hypoxiques de la tumeur. En tant que cellules spécialisées dans le processus de la phagocytose, il est légitime de penser que les TAMs puissent être attirés par les débris de la nécrose survenant dans ces régions (Murdoch and Lewis, 2005). Ce phénomène peut également être expliqué par des changements d'expression génique induits par l'hypoxie, principalement médiés par le facteur de transcription HIF-1 décrit précédemment. Cela se traduit notamment par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence au niveau des cellules endothéliales, favorisant ainsi l'immobilisation des monocytes circulants et leur extravasation en dehors des vaisseaux sanguins. L'hypoxie augmente également l'expression de molécules chémoattractantes comme le VEGF, l'endothéline 2, l'endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAPII) l'angiopoïétine 2 et CXCL12 contribuant ainsi à la migration des macrophages vers les régions hypoxiques de la tumeur (Bosco et al., 2008, Murdoch and Lewis, 2005). En plus de recruter les macrophages, l'hypoxie est également capable de séquestrer ces cellules. En effet, l'hypoxie inhibe l'expression de CCL2, principal médiateur de la migration chimotactique, ainsi que CCR2, le récepteur des macrophages qui lui est associé (Figure I.22) (Mantovani et al., 2004). Par ailleurs, l'hypoxie induit aussi l'inhibition d'une phosphorylation médiée par des acteurs la voie des MAPK kinases. Cette phosphorylation est décrite comme indispensable pour le processus migratoire monocyttaire induit par les chémokines et les cytokines (Bosco et al., 2008, Murdoch and Lewis, 2005).

b) Domestication des macrophages par la tumeur

Une fois recrutés au sein de la tumeur, les macrophages sont exposés à toute une série de signaux environnementaux produits à la fois par les cellules tumorales et les cellules stromales. Ces signaux induisent une polarisation « M2-like » des macrophages et ceux-ci deviennent alors des TAMs (tumor associated macrophages). Parmi ces signaux, les plus étudiés sont sans doute les cytokines IL-10 et M-CSF. L'IL-10 est également connue pour empêcher l'expression de MHCII à la surface des macrophages et inhiber leur différenciation en cellules dendritiques hautement spécialisées dans la présentation d'antigènes. L'expression

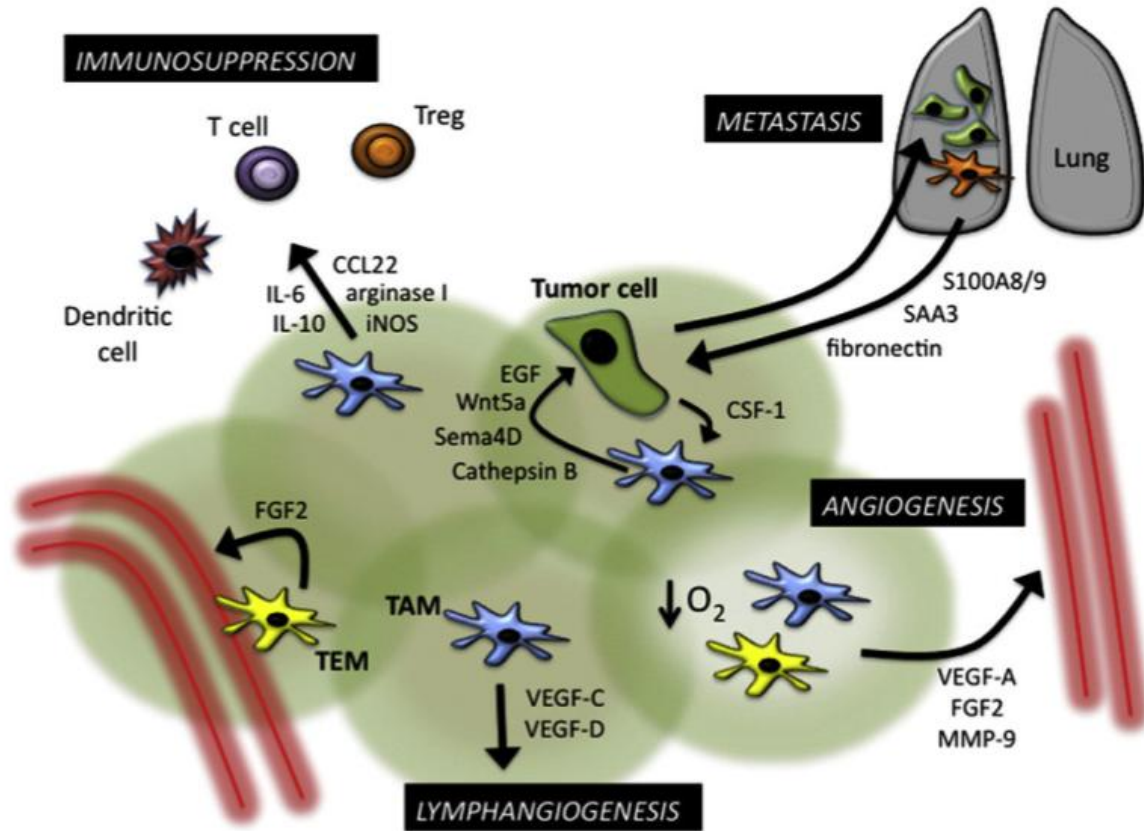


Figure I.23 : Rôles des TAMs dans la progression tumorale. Les macrophages tumoraux peuvent contribuer à la progression tumorale par différents mécanismes. Ils peuvent induire l'angiogenèse tumorale (et la lymphangiogenèse), l'immunosuppression et l'apparition de métastases (Coffelt et al., 2009).

INTRODUCTION

et la sécrétion de chémokines importantes telles que CCL2, CCL17 et CCL22 participent également à l'émergence d'un phénotype M2 chez les TAMs (Mantovani and Sica, 2010, Solinas et al., 2010). Un autre mécanisme d'activation de la polarisation M2 peut également être induit par la libération d'IL-4 et IL-13 par les lymphocytes Th2 présents au site tumoral. Ces macrophages sont caractérisés par une forte expression d'IL-6, IL-10, TGF- β , ARG1, et du récepteur au mannose (CD206) d'une part et une faible expression d'IL-12 et d'autre part (Sica and Bronte, 2007). Une fois domestiqués par la tumeur, les TAMs vont contribuer de différentes manières à la croissance et la malignité de celle-ci.

TAMs et angiogenèse

Les macrophages associés aux tumeurs jouent un rôle prédominant dans les processus de régulation de l'angiogenèse. En effet, les TAMs expriment et sécrètent une série de facteurs de croissance et de cytokines induisant le remodelage et l'élaboration du réseau vasculaire. Les plus importants sont le VEGF, le PDGF, le bFGF, l'IL-8 et le TGF- β (Yue et al., 2012). Les TAMs sécrètent également des molécules impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire indispensable au processus angiogénique. Parmi celles-ci, notons l'urokinase-type plasminogen activator (uPA) et son récepteur (uPAR), la plasmine mais également COX-2 ainsi que les membres de la famille des metalloprotéinases matricielles (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12) (Mantovani et al., 2002). Cette destruction de la matrice extracellulaire libère des molécules angiogènes liées telles que l'héparane sulfate des protéoglycans et la fibronectine. En plus de réorganiser la matrice extracellulaire, les TAMs sécrètent un large spectre de chémokines attirant les cellules endothéliales telles que CXCL12, CCL2, CXCL1, CXCL13 et CCL5 (Solinas et al., 2009). L'interleukine 8 sécrétée par les TAMs stimulerait la prolifération des cellules endothéliales recrutées et régulerait cette néovascularisation (Kitadai, 2010).

TAMs, invasion et métastases

Les TAMs sont connus pour jouer un rôle majeur dans l'invasion de nouveaux tissus par les cellules tumorales et dans le processus métastatique. Cette idée émergea dès 1982, lorsque Gorelik et al. démontrèrent que la présence de macrophages augmentait la formation de nodules tumoraux pulmonaires après une injection intraveineuse de cellules tumorales murines (Gorelik et al., 1982). Sur base de cette observation, d'autres études ont eu pour objectif d'inhiber l'infiltration des TAMs dans le stroma de la tumeur. En utilisant divers anticorps neutralisant les chémokines impliquées dans le recrutement des TAMs, Rolny et al. ont montré une réduction de la fréquence d'apparition générale de métastases (Rolny et al., 2008). En fait, l'extravasation des cellules tumorales est initiée par une signalisation réciproque entre les TAMs et les cellules tumorales. En effet, Condeelis et al. ont montré que la sécrétion d'EGF par les TAMs et de CSF-1 par les cellules tumorales stimulait à la fois le comportement migratoire des TAMs et des cellules tumorales (Figure I.23) (Condeelis and Segall, 2003). D'autres études confirmèrent l'importance de cette signalisation en montrant que l'inhibition du signalement EGF ou la réduction du nombre de macrophages à la surface abluminale des vaisseaux sanguins corrélait avec une forte réduction du nombre de cellules tumorales entrant dans le flux sanguin (Coffelt et al., 2009). L'étude de carcinomes pulmonaires a également montré un rôle prédominant pour le TGF- β . Cette cytokine sécrétée par les TAMs induit la production de l'angiopoïétine 4 qui, en plus de promouvoir l'angiogenèse, augmente la perméabilité des vaisseaux contribuant ainsi à faciliter l'invasion et la migration des cellules tumorales vers des sites secondaires (Solinas et al., 2010). D'autres voies métastatiques impliquant les TAMs peuvent prédominer dans certains types de

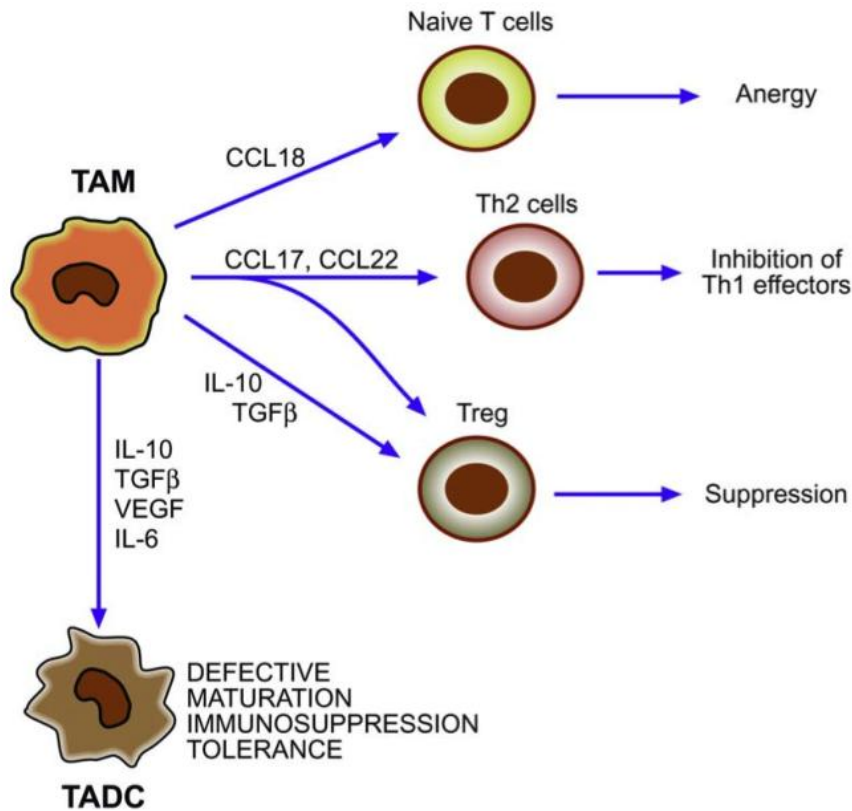


Figure I.24 : Effets immuno-suppresseurs des TAMs sur l'immunité adaptative. Les TAMs libèrent une série de cytokines comme l'IL-10, le TGF- β le VEGF et l'IL-6 qui inhibent la maturation des cellules dendritiques associées à la tumeur (TADC). Les macrophages sécrètent également des chémokines dont CCL17 et CCL22 qui, avec l'IL-10 et le TGF- β , induisent le développement d'une réponse Th2 et le recrutement de cellules T régulatrices. La sécrétion de CCL18 par les macrophages permet également le recrutement de cellules T naïves induisant une anergie des lymphocytes vis-à-vis des cellules tumorales (Sica et al., 2006).

INTRODUCTION

tumeur pour initier le comportement métastatique des cellules tumorales. Dans les cancers du sein et des ovaires, il a été montré que le TNF- α sécrété par les TAMs augmentait le caractère invasif des cellules tumorales. Cette cytokine induit l'expression l'extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), facteur agissant de manière paracrine sur les macrophages pour stimuler la production des métalloprotéinases matricielles 2 et 9 (Coffelt et al., 2009). Par ailleurs, Giavazzi et al. ont également démontré que la production d'IL-1 β stimulait le développement de mélanomes murins (Giavazzi et al., 1990). D'autres molécules sécrétées par les TAMs comme la cathepsine B, Wnt5a et la semaphorine 4D augmentent encore le caractère invasif de la tumeur (Figure I.23) (Coffelt et al., 2009).

TAMs et immunosuppression

Un autre moyen par lequel les TAMs peuvent aider la croissance tumorale est leur capacité à moduler et rediriger la réponse immunitaire de l'hôte. En situation normale, les macrophages sont capables de présenter des antigènes tumoraux aux cellules T et d'activer des cellules cytotoxiques de l'immunité innée telles que les natural killer (NK) (Lewis and Pollard, 2006). Sous l'influence de facteurs délivrés par le microenvironnement tumoral, les TAMs expriment et sécrètent la prostaglandine PGE₂, et des cytokines comme l'IL10 et de TGF- β . L'IL-10 provoque la différenciation des monocytes en macrophages plutôt qu'en cellules dendritiques. Cette cytokine, de manière autocrine, induit également une diminution de l'expression et de la libération d'IL-12 par les TAMs. Cette diminution de l'IL-12 dans l'environnement empêche la différenciation des cellules T naïves et la production d'interféron gamma qui lui est associée, et contribue à activer les cellules T régulatrices, impliquées dans la suppression de la réponse Th1 cytotoxique (Mantovani et al., 2002). Les TAMs sécrètent également des chémokines impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires, parmi lesquelles CCL2, CCL17 CCL18 et CCL22. La chémokine CCL18, aussi sécrétée par les cellules dendritiques immatures, attire les cellules T naïves. L'attraction de ces cellules T naïves dans un environnement dominé par les macrophages M2 et les cellules dendritiques immatures conduit à la tolérance des lymphocytes vis-à-vis des cellules tumorales, aussi connue sous le terme d'anergie (Figure I.24) (Sica et al., 2006). De plus, les métalloprotéinases matricielles exprimées par les TAMs sont connues pour cliver le ligand Fas impliqué dans le processus de mort cellulaire. Ces MMPs contribuent ainsi à la résistance des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques, et à leur lyse cellulaire par les natural killer et les cellules T cytotoxiques qui pourraient être présents dans le microenvironnement (Yue et al., 2012). Finalement, l'activation transcriptionnelle de NF- κ B et STAT3 dans les TAMs contribue à renforcer la suppression et la tolérance immunitaire déjà engagées (Coffelt et al., 2009). Ainsi, par tous ces mécanismes, les TAMs contribuent à la croissance, la malignité, l'agressivité et la résistance des tumeurs.

5) Objectifs

Aujourd'hui, le microenvironnement tumoral est considéré comme jouant un rôle considérable dans la progression des tumeurs. Parmi les différents types cellulaires prenant part au microenvironnement tumoral, les macrophages tumoraux sont connus pour acquérir un phénotype M2 décrit pour favoriser la progression de cette maladie.

Les mécanismes sous-jacents de cette polarisation ne sont pas totalement élucidés, bien que la sécrétion de divers facteurs par les cellules tumorales et stromales soit impliquée. Nous avons émis une première hypothèse selon laquelle l'hypoxie et l'inflammation inhérentes au microenvironnement tumoral peuvent avoir un rôle direct dans l'induction de la polarisation de type M2. Sur base de la littérature, nous avons également émis une seconde hypothèse selon laquelle l'hypoxie chronique et l'hypoxie cyclique induiraient des changements phénotypiques bien distincts. L'objectif de ce travail consiste donc à mener une étude ciblée des effets combinés de l'hypoxie (chronique ou cyclique) et de l'inflammation mimée par le TNF- α sur la polarisation des macrophages.

Dans un premier temps, notre travail a consisté à caractériser les macrophages exposés aux différents types d'hypoxies et au TNF- α . Pour ce faire, nous avons étudié l'expression de marqueurs typiques de macrophages M1 et M2 ainsi que d'autres marqueurs impliqués dans l'inflammation et l'angiogénèse par RT-qPCR. Nous avons ensuite tenté de valider certains de ces marqueurs en étudiant leur sécrétion par ELISA. Dans un second temps, nous avons étudié l'effet des milieux conditionnés de ces macrophages sur la migration et la viabilité de cellules endothéliales immortalisées. Ces deux processus sont intimement liés au mécanisme angiogénique aidant la progression de la tumeur. Ces tests de prolifération et de migration ont finalement été répétés sur des cellules tumorales afin d'étudier le potentiel mitogène et métastatique de ces milieux conditionnés.

II. MATERIEL ET METHODES

Tableau II.1 : Culture des cellules EAhy926 – Matériel

Boîtes de culture de 75 cm ² (Costar, Corning, USA)	
Milieu de culture	Milieu DHG-L1 : DMEM (Dulbecco's modified eagle medium : Gibco, UK) supplémenté avec 18 mM de NaHCO ₃ (Merck, Germany) 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, UK)
PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (BioWhittaker, Lonza, Belgium)	Tampon phosphate 10 mM pH 7,4 150 mM NaCl
Trypsine-EDTA	Solution de trypsine (0,5 g/l) et EDTA (0,2 g/l) (Gibco, UK)
Tubes de 10 ml (Sterilin, UK)	
Centrifugeuse (Centrifuge 5702, Eppendorf, Germany)	

Tableau II.2 : Culture des cellules A549 – Matériel

Boîtes de culture de 75 cm ² (Costar, Corning, USA)	
Milieu de culture	Milieu MEM (Minimal Essential Medium : Gibco, UK) 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, UK)
PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (BioWhittaker, Lonza, Belgium)	Tampon phosphate 10 mM pH 7,4 150 mM NaCl
Trypsine-EDTA	Solution de trypsine (0,5 g/l) et EDTA (0,2 g/l) (Gibco, UK)
Tubes de 10 ml (Sterilin, UK)	
Centrifugeuse (Centrifuge 5702, Eppendorf, Germany)	

Tableau II.3 Culture des cellules THP1 – Matériel

Boîtes de culture de 75 cm ² (Costar, Corning, USA)	
Milieu de culture	Milieu RPMI base : RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium : Gibco, UK) supplémenté avec 5 ml d'HEPES 1M (Gibco, UK), 5 ml de pyruvate, 100 mM (Gibco, UK), 5 ml de glucose (Gibco, UK) et 500 µl de β-mercaptoéthanol (Gibco, UK) 10% de sérum HIS décomplémenté (Heat Inactivated Serum)
Comptage automatisé	Cell counter (Invitrogen, USA) Bleu de trypan (Invitrogen, USA) Plaques de comptage (Invitrogen, USA)
Tubes de 10 ml (Sterilin, UK)	
Centrifugeuse (Centrifuge 5702, Eppendorf, Germany)	

1) Cultures cellulaires

1.1 Les cellules EAhy926

Les cellules EAhy926 furent créées en 1983 par C.J. Edgell et al. (Edgell et al., 1983). Cette souche résulte d'une fusion entre des cellules HUVEC (Umbilical Vein Endothelial Cells) et des cellules A549. Ces cellules adhérentes sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75) dans du milieu DHGL1 (DMEM high glucose low NaHCO₃) enrichi avec 10 % de sérum bovin fœtal. Elles sont repiquées tous les deux jours (sauf le week end, 3 jours) (Tableau II.1). Pour ce faire, les T75 sont décantées puis rincées 2 fois à l'aide de 5 ml de PBS stérile. Une fois le PBS décanté 1,5 ml de trypsine-EDTA est ajouté afin de détacher les cellules. Pour permettre l'activité de la trypsine, les boîtes T75 sont incubées 2 minutes à 37°C dans une étuve sèche. Au terme des 2 minutes, on vérifie au microscope que les cellules n'adhèrent plus au support. On ajoute ensuite 7,5 ml de milieu pour inactiver la trypsine. En effet, le sérum contient des inhibiteurs de protéases. La suspension cellulaire est alors centrifugée 5 minutes à 1000 rpm. Au terme de la centrifugation, le surnageant est décanté et le culot cellulaire est finalement resuspendu dans 4 ml (semaine) ou 6 ml (week-end) de milieu. 2 ml de cette nouvelle suspension cellulaire sont introduits dans de nouvelles T75. Du milieu frais est finalement ajouté pour atteindre un volume final de 15 ml (semaine) ou 17 ml (week-end) par nouvelle boîte T75. Ces boîtes sont conservées à une température de 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

1.2 Les cellules A549

Les cellules A549 ont été isolées en 1972 par D.J. Giard et al. à partir d'un adénocarcinome de poumon d'un patient de 58 ans. Ces cellules sont cultivées dans du milieu MEM (Minimal Essential Medium) contenant 10 % de sérum bovin fœtal (Tableau II.2). Le protocole de repiquage est similaire à celui des cellules EAhy926. Les cellules sont repiquées le lundi et le vendredi à une dilution de 1/9 le lundi et de 1/5 le vendredi.

1.3 Les cellules THP1

Les cellules THP1 sont une lignée cellulaire monocyttaire dérivant d'un patient d'un an atteint de leucémie monocyttaire. Cette lignée peut fournir une culture continue et est cultivée en suspension dans du RPMI base medium + 10 % de sérum bovin fœtal décomplémenté (Tableau II.3). Ce milieu est composé de milieu RPMI 1640 + L glutamine supplémenté avec 5 ml d'HEPES 1 M, 5 ml de pyruvate (100 mM), 5 ml de glucose et 500 µl de β-mercaptoethanol. Pour le repiquage de ces cellules, la première étape consiste à récupérer dans un tube de 50 ml, les cellules en suspension des boîtes T75 dans lesquelles celles-ci sont cultivées. La suspension cellulaire récoltée est ensuite centrifugée 7 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est alors décanté et le culot resuspendu dans 10 ml de milieu complet. Un petit volume de cette suspension est ensuite aliquoté dans un eppendorf pour le comptage des cellules. Pour le comptage, 10 µl de bleu de trypan sont mélangés à 10 µl de suspension cellulaire. 10 µl de ce mélange sont ensuite déposés sur une plaque de comptage qui est introduite dans le cell counter pour réaliser un comptage automatisé. Les monocytes sont alors repiqués en T75 à une densité de 3,6.10⁶ cellules dans un volume total de 15 ml tous les deux jours (semaine), et 3.10⁶ cellules dans un volume total de 20 ml pour 3 jours (week-end). Comme les cellules EAhy926 et A549, les THP1 sont conservés à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Tableau II.4 : Différenciation des monocytes THP1 en macrophages M0 – Matériel

Boîtes de culture de 75 cm ² (Costar, Corning, USA)	
Milieu de culture complet	Milieu RPMI base : RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium : Gibco, UK) supplémenté avec 5 ml d'HEPES 1M (Gibco, UK), 5 ml de pyruvate, 100 mM (Gibco, UK), 5 ml de glucose (Gibco, UK) et 500 µl de β-mercaptoéthanol (Gibco, UK) 10% de sérum HIS décomplémenté (Heat Inactivated Serum)
PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (BioWhittaker, Lonza, Belgium)	Tampon phosphate 10 mM pH 7,4 150 mM NaCl
PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) (Sigma, France)	

Tableau II.5 : Incubation en hypoxie et en présence de TNF-α – Matériel

Plaques 6 puits (Costar, Corning, USA)	
Milieu CO ₂ -indépendant	Milieu CO ₂ -indépendant (Gibco, UK) supplémenté avec 36 mg de L-glutamine (Sigma, USA) et 3,75 g de glucose pour 500 ml de milieu (Gibco, UK)
TNF-α 0,1 ng/ml (concentration stock 10 ug/ml) (R&D Systems, USA)	

N	6h							
Hch	6h							
Hcy	1h	30 min	1h	30 min	1h	30 min	1h	30 min

Figure II.1 : Cinétiques des incubations en normoxie (N), hypoxie chronique (Hch) et hypoxie cyclique (Hcy)

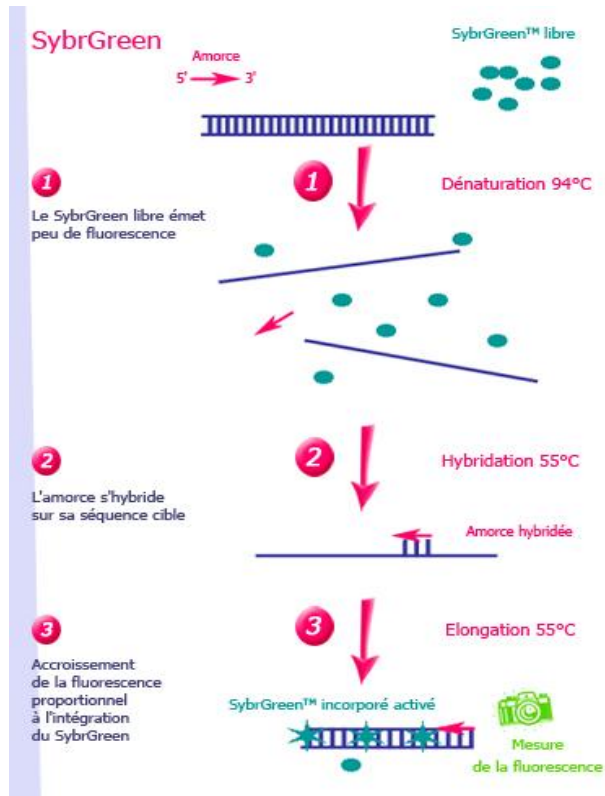


Figure II.2 : Principe de la PCR en temps réel basée sur l'incorporation du SybrGreen. L'ADNc est d'abord dénaturé par la chaleur à une température de 94°C. Lorsque les brins complémentaires sont dissociés, on diminue la température à 55°C et les amorces s'hybrident à l'ADN simple brin. La polymérase thermorésistante peut alors pratiquer l'élongation de l'amorce. Au cours de l'élongation, le SybrGreen est intégré et il en résulte une augmentation de la fluorescence. La réaction est répétée jusqu'à ce que le seuil de fluorescence soit atteint. (www.ilm.pf/PCRtempsreel)

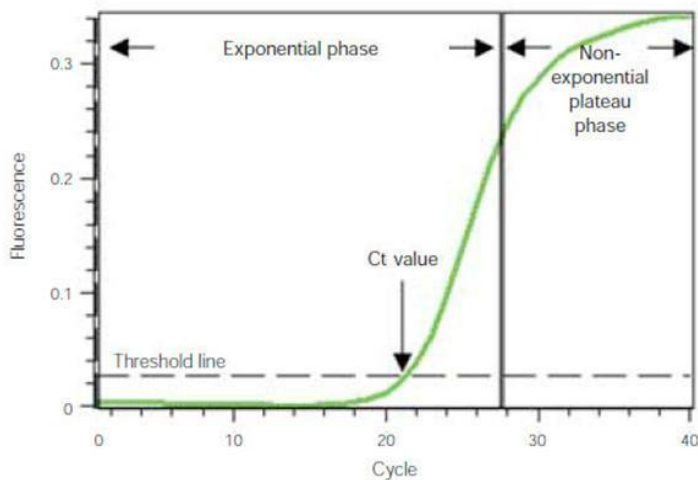


Figure II.3 : Evolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycles au cours d'une PCR en temps réel. (www.bio-rad.com/en-be/applications-technologies/qpcr-real-time-pcr)

2) Différenciation des monocytes THP1 en macrophages M0

La différenciation des monocytes THP1 en macrophages M0 est obtenue selon un protocole en deux étapes. D'abord, les monocytes sont cultivés 24h dans du milieu RPMI base contenant 10 % de sérum décomplémenté en présence d'une concentration de 150 nM de PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) (Tableau II.4). Au terme de ces 24h, le milieu contenant le PMA est décanté et les monocytes sont cultivés dans du milieu sans PMA pour une nouvelle période de 24h. Après ces 48h de culture, les monocytes THP1 sont désormais différenciés en macrophages M0, ce qui s'observe aisément car les macrophages deviennent adhérents.

3) Incubation en hypoxie et en présence de TNF- α

Les incubations sont réalisées dans du milieu CO₂-indépendant sans sérum, supplémenté avec 0.5 mM de L-glutamine et 3,75g de glucose pour 500 ml de milieu (Tableau II.5). Les cellules sont exposées à 6 conditions distinctes : normoxie (N), hypoxie chronique (Hch) et hypoxie cyclique (Hcy) en présence ou non d'une concentration de 0,1 ng/ml de TNF- α (Figure II.1). La normoxie se déroule dans une atmosphère classique contenant 20 % d'oxygène. En hypoxie chronique, les cellules sont incubées dans une atmosphère contenant 1% d'oxygène pour une période continue de 6h. Enfin, en hypoxie cyclique, les cellules sont exposées à 4 cycles répétés d'hypoxie (1h, 1 % O₂)/réoxygénation (30 min, 20 % O₂). Au terme des incubations, les surnageants sont récoltés en tubes de 10 ml et centrifugés 5 minutes à 1000 rpm. Après centrifugation, le milieu est transféré dans de nouveaux tubes de 10 ml et ceux-ci sont congelés à -70°C.

4) RT-qPCR

4.1 Principe

La PCR en temps réel, aussi appelée PCR quantitative, est une technique qui permet de quantifier l'abondance d'ARNm. Elle permet ainsi de comparer l'expression de gènes en fonction de différentes conditions d'incubation des cellules. Les substrats de cette réaction sont des ADNc issus d'une rétrotranscription d'extraits d'ARN totaux. Ces ARN totaux sont extraits en présence de DNase dans le but s'assurer l'élimination totale de l'ADN génomique. Comme son nom l'indique, cette technique est basée sur une réaction d'amplification d'ADN en chaîne catalysée par une polymérase thermorésistante. L'amplification de l'ADNc est d'abord exponentielle en raison de la présence en excès des réactifs (amorces et nucléotides) avant d'atteindre un plateau résultant de la compétition entre la renaturation des simples brins d'ADN et la liaison des amorces aux simples brins (Figure II.2). Les produits issus de la RT-qPCR sont détectés grâce au SYBR Green. Il s'agit d'une sonde fluorescente non-spécifique qui s'intercale avec n'importe quel ADN double brin. Une valeur seuil arbitraire est établie et le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence dépasse ce seuil correspond à la valeur Ct (cycle threshold) (Figure II.3). L'abondance de l'ADNc, et donc de l'ARNm dont il est issu, est donc inversement proportionnelle à la valeur de Ct obtenue.

4.2 Méthode

4.2.1 Extraction des ARN totaux avec le système QIAcube

Les macrophages M0 sont cultivés en plaques 6 puits à une densité de 800.000 cellules par puits. Le milieu RPMI base est ensuite remplacé par 3 ml de milieu CO₂-indépendant

Tableau II.6 : Extraction automatisée de l'ARN – Matériel

Racloirs (TPP, Switzerland)	
QIAcube (Qiagen, Netherlands)	
Tubes 2 ml spéciaux QIAcube	
Tubes 1,5 ml spéciaux QIAcube (Qiagen, Netherlands)	
Tips spéciaux QIAcube 1000 µl (Qiagen, Netherlands)	
RNeasy Minikit (Qiagen, Netherlands)	Shaker, portoir, adaptateurs, colonnes d'extraction Solutions : Eau RNase Free, buffer RPE, buffer RW1, buffer RLT
DNase (Qiagen, Netherlands)	
Buffer RDD (Qiagen, Netherlands)	
Ethanol 70% (Merck, Germany)	

Tableau II.7 : Dosage des ARN totaux – Matériel

Eau RNase-Free (Qiagen, Netherlands)
Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Tableau II.8 : Rétrotranscription de l'ARNm en ADNc – Matériel

Blocs chauffants (Techne Dri-Block DB 2D, UK)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany)

MATERIEL ET METHODES

supplémenté en glutamine et en glucose contenant ou non 0,1 ng/ml de TNF- α . Les cellules sont ensuite incubées en N, Hch ou en Hcy. Après l'incubation, le milieu CO₂-indépendant est décanté et conservé à -70°C dans des tubes de 10 ml pour l'étude des effets des milieux conditionnés de macrophages. 350 μ l de tampon de lyse du kit d'extraction ARN « Qiagen RNeasy Mini Kit » sont ajoutés et les cellules sont raclées à l'aide d'un racloir. Les lysats sont collectés en tubes de 2 ml spéciaux pour QIAcube, vortexés et congelés à -70°C.

Avant l'extraction des ARN, les lysats cellulaires doivent être dégelés à température ambiante puis vortexés. Il faut également charger la machine QIAcube (Tableau II.6). En premier lieu, il faut veiller à utiliser le shaker numéro 2. Il faut ensuite placer des tips spéciaux à l'endroit prévu et préparer les adaptateurs. Chaque adaptateur se voit ainsi attribué une colonne et un eppendorf de 1,5 ml qui contiendra le futur extrait d'ARN. Il est impératif de ne pas toucher l'extrémité des colonnes pour éviter une contamination par des RNases qui dégraderaient l'ARN. Les adaptateurs sont ensuite positionnés sur le rotor. Les tubes de 2 ml qui contiennent les lysats sont quant à eux placés sur le shaker dans l'ordre correspondant à l'ordre des adaptateurs. On charge ensuite la machine avec les différentes solutions (eau RNase-free, éthanol 70%, buffer RPE et buffer RW1). En fonction du nombre d'échantillons, le volume adéquat de DNase est préparé dans un eppendorf et déposé en position A. La programmation du QIAcube se fait en choisissant le mode RNeasy Mini Kit en choisissant le mode « DNase digest » (volume d'éluion de 30 μ l). Le QIAcube est finalement fermé et l'extraction lancée pour une durée variable en fonction du nombre d'échantillons (12 maximum). Lorsque l'extraction est terminée, les tubes de 1,5 ml contenant les extraits ARN peuvent être utilisés directement ou être conservés à -70°C.

4.2.2 Dosage des ARN totaux

Une fois extraits, les ARN totaux sont dosés à l'aide d'un nanodrop (Tableau II.7). Les ARN sont vortexés, spinnés, et maintenus sur glace. En premier lieu, il est nécessaire d'initialiser le nanodrop en ajoutant 1,5 μ l d'eau RNase free sur la lentille. Cette opération est répétée une seconde fois pour réaliser un blanc. Finalement, 1,5 μ l de chaque échantillon est déposé sur la lentille du nanodrop afin de connaître leur concentration respective en ARN. La lentille est lavée entre chaque mesure à l'aide d'eau distillé.

4.2.3 Rétro-transcription

La rétrotranscription des ARNm (contenus dans les ARN totaux) en ADNc est réalisée à l'aide du « Kit Roche » (Tableau II.8). Pour chaque échantillon, un volume correspondant à 2 μ g d'ARN est déposé dans un eppendorf. Le volume est porté à 12 μ l à l'aide d'eau RNase-free pour atteindre un volume total de 12 μ l et 1 μ l d'oligo dT est ensuite ajouté. Ce mix est incubé 10 minutes à 65°C dans le but de dénaturer les structures secondaires potentielles des ARN et ensuite immédiatement mis sur glace et spinné. 7 μ l de mix de réaction sont ensuite ajoutés (4 μ l Buffer RT ; 0,5 μ l transcript RT ; 0,5 μ l RNAsin ; 2 μ l dNTP mix). Après avoir vortexé et spinné les échantillons, ceux-ci sont incubés pendant 30 minutes à 55°C afin de permettre la réaction de polymérisation. L'inactivation de la reverse transcriptase est ensuite réalisée grâce à une incubation de 5 minutes à 85°C. Les échantillons sont finalement stockés à -20°C.

Tableau II.9 : Real-time PCR – Matériel

Amorces forward et reverse (Applied Biosystems, Life Technologies, USA & IDT, Belgium) (Tableau II.10)
SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, USA)
Plaque 96 puits (Applied Biosystems, Life Technologies, USA)
Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Life Technologies, USA)
7900HT Fast Real-time PCR (Applied Biosystems, Life Technologies, USA)

Tableau II.10 : Séquence des amorces utilisées

Gènes cibles	Séquence des amorces reverse forward et reverse
RPS9	F : CTGGATGAGGGCAAGATGAAG
	R : GTCTGCAGGCGTCTCTCTAAGAA
CCL18	F : AAGCCAGGTGTCATCCTCCTAAC
	R : TGATGTATTTCTGGACCCACTTCTT
CCL22	F : CACTTCTACTGGACCTCAGAC
	R : AGTAGGCTCTTCATTGGCTCA
CD206	F : GCTAAACCTACTCATGAATTA
	R : GAAGACGGTTTAGAAGGGTCC
COX-2	F : ATTAGCCTGAATGTGCCATAAGACT
	R : ACCCACAGTGCTTGACACAGAAT
CXCL10	F : AAGTGGCATTCAAGGAGTACC
	R : ATGCAGGTACAGCGTACAGT
Fibronectine	F : TGTGGTTGCCTTGCACGAT
	R : GCTTGTGGGTGTGACCTGAGT
IL-1 β	F : GCCCTAAACAGATGAAGTGCTC
	R : GAGATTCGTAGCTGGATGCC
IL-1R2	F : ATGTGTTGTCCATAATACCCTGAGTTT
	R : CACCGTCTGTGCATCCATATTC
IL-6	F : CCTGAACCTTCCAAAGATGGC
	R : CACCAGGCAAGTCTCCTCATT
IL-8	F : TCTGTGTGAAGGTGCAGTTTT
	R : GGGGTGGAAAGGTTTGGAGTA
IL-10	F : TTCCCTGTGAAAACAAGAGCAA
	R : GTAGATGCCTTTCTCTTGGAGCTTA
MMP-9	F : CCTTCCTTATCGCCGACAAGT
	R : ACCGACGCGCCTGTGTAC
MMP-12	F : GGATGCACATTTTCGATGAGGAC
	R : GTGAACAGCAGTGAGGAACA
TNF- α	F : CTGCACTTTGGAGTGATCGG
	R : TCAGTTGAGGGTTTGCTAC
VEGF-A	F : TGCCCACTGAGGAGTCCAA
	R : TTTGTTGTGTAGGAAGCTCAT

Tableau II.11 : Test de migration cellulaire – Matériel

Plaques 6 puits (Costar, Corning, USA)	
Racloir taillé en pointe (TPP, Switzerland)	
Ethanol (Merck, Germany)	
PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (BioWhittaker, Lonza, Belgium)	Tampon phosphate 10 mM pH 7,4 150 mM NaCl
Microscope à contraste de phase (Leitz, Germany) couplé à un appareil photo (DFC290, Leica, Germany)	

4.2.4 PCR en temps réel

L'abondance relative des transcrits en ARNm est déterminée grâce à une machine de PCR en temps réel. Les ADNc retrotranscrits à partir des ARNm sont d'abord décongelés à température ambiante puis dilués 100x, 50x ou 10x à l'aide d'eau distillée sur base d'expériences précédentes. Des mix contenant 2,5 µl d'amorces « reverse » et « forward » 3 µM, 2,5 µl d'eau distillée ainsi que 12,5 µl de SYBR Green sont ensuite ajoutés dans les différents puits d'une plaque 96 puits (Tableaux II.9 et II.10). 5 µl d'ADNc dilués sont ajoutés dans les puits. Chaque échantillon est analysé en double. Un gène de ménage (HKG), RPS9, est utilisé pour normaliser les résultats obtenus. Pour chaque gène étudié, 2 blancs sont réalisés en ajoutant 5 µl d'eau distillée en lieu et place des 5 µl d'ADNc dans les mix correspondants. Une fois la plaque remplie, celle-ci est scellée et centrifugée 1 minute à 1000 rpm puis introduite dans la machine en ajoutant un caoutchouc par-dessus. La PCR est ensuite lancée. La première étape consiste en une dénaturation de l'ADN par la chaleur (95°C) pendant 10 minutes. Commencent ensuite 40 cycles de dénaturation (15 secondes à 95°C)/hybridation et élongation des amorces (1 minute à 65°C). L'abondance relative des transcrits en ARNm peut finalement être obtenue sur base des valeurs de Ct indiquées pour chaque échantillon et chaque gène. Ces valeurs de Ct sont normalisées par soustraction du Ct du gène de ménage, ne variant pas d'une condition à l'autre :

$$\Delta Ct = Ct \text{ du gène d'intérêt} - Ct \text{ du gène de ménage}$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ du gène dans une condition} - \Delta Ct \text{ du gène dans la condition contrôle (normoxie seule)}$$

$$2^{-\Delta \Delta Ct} = \text{niveau d'induction ou de répression du gène par rapport à la condition contrôle (normoxie seule)}$$

5) Test de migration cellulaire

5.1 Principe

La technique du scratch assay implique la création d'un « scratch » dans une monocouche cellulaire. Des cellules de part et d'autres de la zone de scratch vont alors migrer à l'intérieur de celui-ci. La migration peut être suivie en prenant de photographies au début et à des intervalles réguliers pendant la migration et en comparant ces images pour quantifier le taux de migration des cellules. L'utilisation d'inhibiteurs de prolifération comme la mitomycine c permet de vérifier que les cellules présentes dans le scratch sont effectivement issues d'un phénomène de migration et non de prolifération.

5.2 Méthode

Des scratches assay sont réalisés à la fois sur les cellules EAhy926 et les A549. Ces cellules sont ensemencées en plaques 6 puits à une densité de $1,7 \cdot 10^6$ cellules EAhy926 et $9 \cdot 10^5$ cellules A549 par puits. 24h après l'ensemencement, 3 scratches par puits sont réalisés à l'aide d'un racloir taillé en pointe préalablement stérilisé par trempage dans de l'éthanol et rinçage dans du PBS (Tableau II.11). Les puits sont ensuite rincés deux fois au PBS afin de retirer les cellules décrochées suite aux scratches. 3 ml des différents milieux conditionnés de macrophages M0 sont ensuite ajoutés dans les différents puits. 3 ml de milieu CO₂-indépendant frais sont également ajouté aux contrôles positifs et négatifs de migration. Le contrôle négatif est réalisé en incubant les cellules en normoxie tandis que des cellules incubées en hypoxie cyclique constituent le contrôle positif de migration comme décrit par

Tableau II.12 : Test de viabilité cellulaire – Matériel

Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)
Colorant MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5diphényltétrazolium) (Sigma, USA)
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline) (BioWhittaker, Lonza, Belgium)
Agitateur Innova 2000 platform shaker (New Brunswick Scientific, Germany)
Spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, GE HealthCare, UK)

Toffoli et al. en 2009 (Toffoli et al., 2009). Les incubations se déroulent pendant une période totale de 22h et des photos sont prises aux temps 0h, 6h, 10h et 22h grâce à un microscope optique inverse couplé à une caméra.

6) Test de viabilité cellulaire

6.1 Principe

Les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5diphényltétrazolium). Ce composé est clivé en son dérivé (Formazan) par une enzyme de la membrane mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Le Formazan forme des cristaux violets insolubles en milieu aqueux. Après avoir aspiré le milieu de culture, il suffit donc de dissoudre les cellules, leur mitochondries et donc les précipités de Formazan violets dans du tampon de lyse et de lire l'absorbance à 570 nm pour connaître la quantité relative de cellules actives métaboliquement. En présence de composés toxiques, le nombre de cellules capables d'effectuer la réaction diminue. Au contraire, en présence de substances protectrices ou mitogènes, ce nombre augmente. Il est donc possible de déterminer une corrélation entre le nombre de cellules vivantes et la quantité de MTT métabolisé.

6.2 Densités cellulaires

Les cellules EAhy926 sontensemencées en plaques 24 puits à raison de 6.10^4 cellules par puits dans du milieu DHGL-1 contenant 10% de sérum bovin fœtal. Les cellules A549 sontensemencées en plaques 24 puits à raison 4.10^4 de cellules par puits dans du milieu MEM contenant 10% de sérum bovin fœtal.

6.3 Méthode

24h après l'ensemencement, le milieu est retiré et les cellules sont incubées en présence d'un ml des différents milieux conditionnés de macrophages M0, et ce durant 24h, 40h, et 48h. Des contrôles sont réalisés pour chaque cinétique en incubant les cellules en présence de milieu CO₂-indépendant frais. Au terme des incubations, 1 ml de solution de coloration MTT est ajouté dans chaque puits (Tableau II.12). Les cellules sont ensuite incubées pendant 2h à 37°C. A la fin de cette incubation, les surnageants sont décantés et les cellules sont lysées à l'aide de 500 µl de solution de lyse. Les cellules sont incubées 1h à 37°C sous agitation légère (65 rpm). 3 blancs sont réalisés sur chaque plaque par ajout de 500 µl de solution de lyse dans 3 puits vides et l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

7) Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Folin-Lowry

7.1 Principe

La méthode de Folin-Lowry est une méthode de dosage colorimétrique des protéines. Ce dosage est basé sur la réduction du réactif principal par les acides aminés aromatiques en un composé bleu. La lyse cellulaire au NaOH est la seule compatible avec ce type de dosage. Le NaOH (0,5 N) permet de dénaturer les protéines et d'exposer ainsi leurs résidus aux anions phosphomolybdate et phosphotungstate contenus dans le réactif de Folin.

Cette méthode est utilisée afin de normaliser les résultats des dosages ELISA. Au terme des incubations et après avoir récolté les surnageants, chaque puits est rincé deux fois à l'aide de 2

Tableau II.13 : Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Folin-Lowry – Matériel

Tubes à Bradford (Kartel, Italy)	
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,5 pH 7,4 (Merck, Germany)
NaOH 0,5 N et 2 N (Merck, Germany)	
BSA (Bovine Serum Albumin) (Thermo Scientific, USA)	Concentration stock : 2 ug/ μl (à diluer 2,5x) 100 ug/ml : 19 μl BSA diluée + 37,5 μl NaOH 2 N + 93,5 μl H_2O 200 ug/ml : 37,5 μl BSA diluée + 37,5 μl NaOH 2 N + 75 μl H_2O 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 75 μl BSA diluée + 37,5 μl NaOH 2N + 37,5 μl H_2O
Solution A	1 ml Na_2CO_3 2% (Merck, Germany) 10 μl tartrate de sodium et potassium 2% (Merck, Germany) 10 μl CuSO_4 1% (UCB, Belgium)
Réactif de Folin (Merck, Germany) dilué 2x dans de l'eau	
Spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, GE HealthCare, UK)	

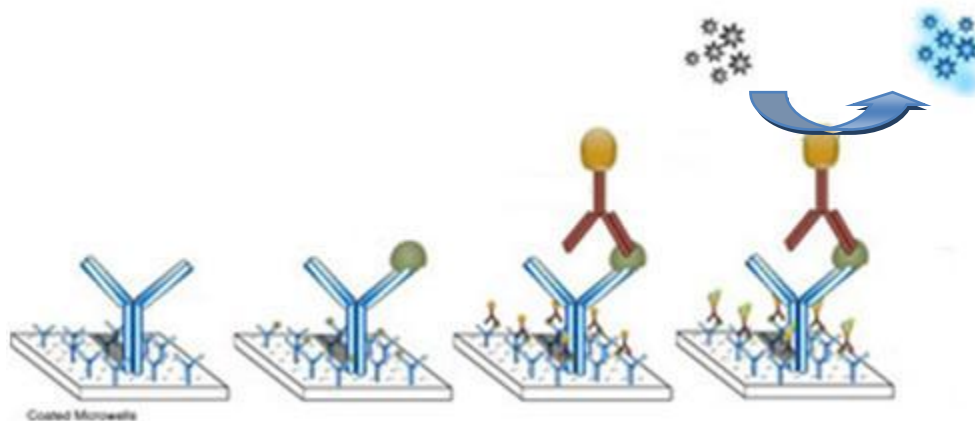


Figure II.4 : Principe de l'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). Les puits sont coatés avec des anticorps de capture qui vont lier l'antigène duquel ils sont spécifiques. Un complexe constitué d'un anticorps spécifique pour l'antigène et couplé à une peroxydase est ajouté. En ajoutant le substrat de la peroxydase, celui-ci sera converti par cette dernière en un composé coloré dont l'absorbance sera proportionnelle à la quantité d'antigène liée à l'étape initiale. (www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-Principle)

MATERIEL ET METHODES

ml de PBS (Tableau II.13). Le PBS est ensuite décanté en utilisant une pompe à vide. 800 µl de NaOH 0,5N sont ensuite ajoutés à chaque puits. Le tout est mis sous agitation durant une période de 30 minutes afin de favoriser la lyse cellulaire et la dénaturation des protéines. Les lysats cellulaires sont récupérés en eppendorfs et peuvent être congelés à -20°C ou utilisés immédiatement.

7.2 Méthode

Le dosage est effectué en tubes à Bradford. Différentes concentrations de BSA (100 ; 200 ; 400 µg/ml) sont dosées en double afin d'obtenir une droite d'étalonnage permettant d'obtenir la concentration en fonction de l'absorbance. Un blanc est aussi réalisé en double à l'aide de NaOH 0,5 N. Les échantillons sont quant à eux dosés en simple. 150 µl de NaOH 0,5 N (blanc), de BSA diluée (laisser agir 30 min dans le NaOH 2 N) ou d'échantillon à doser sont déposés dans les différents tubes à Bradford. Ensuite, 750 µl de solution A sont ajoutés. On laisse agir au minimum 10 minutes. Au terme de ces 10 minutes, 75 µl de réactif de Folin dilué 2x sont ajoutés à chaque tube de minute en minute, tube après tube. La lecture au spectrophotomètre ($\lambda = 740$ nm) est finalement réalisée au terme de 30 minutes d'incubation après l'ajout du réactif et toujours de minute en minute. La concentration de chaque échantillon est finalement établie sur base de l'équation dérivée de la courbe d'étalonnage obtenue avec la BSA ($y = ax + b$).

8) Mesure de la sécrétion d'IL-8

8.1 Principe de l'ELISA

L'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est une méthode immuno-enzymatique permettant la détection d'un antigène dans un surnageant ou un lysat cellulaire. Elle se réalise dans des puits dans lesquels sont « coatés » des anticorps dits « de capture » (Figure II.4). Lorsque l'échantillon est ajouté dans le puits, l'antigène présent se lie à l'anticorps de capture. Les antigènes non-spécifiques de l'anticorps de capture sont éliminés par plusieurs lavages. Un complexe constitué d'un anticorps polyclonal spécifique pour l'antigène et couplé à une peroxydase est ensuite ajouté. L'étape suivante consiste à ajouter le substrat de la peroxydase (peroxyde d'hydrogène et tetramethylbenzidine) qui sera converti par cette dernière en un composé coloré dont l'intensité sera proportionnelle à la quantité d'antigène liée à l'étape initiale. La réaction colorimétrique est finalement arrêtée en utilisant de l'acide sulfurique et l'absorbance du produit de la réaction est mesurée par spectrophotométrie.

8.2 Méthode

8.2.1 Préparation des surnageants pour mesurer la sécrétion d'IL-8

Les monocytes THP1 sont ensemencés en plaques 6 puits à raison de 800.000 cellules par puits en présence de PMA. 24h plus tard, le milieu est remplacé par du milieu sans PMA. 48h après l'ensemencement, le milieu de culture est remplacé par 3 ml de milieu CO₂-indépendant complétement en glutamine et en glucose. Les monocytes, devenus macrophages M0, sont alors incubés pour une période de 6h suivie de 4h de réoxygénation en N, Hch ou Hcy en présence ou non de TNF- α . Au terme de ces 10h d'incubation, les surnageants sont récoltés dans des tubes de 10 ml. Suite à la légère évaporation du milieu occasionnée lors des incubations, certains surnageants sont plus concentrés que d'autres. Les surnageants sont donc

Tableau II.14 : Mesure de la sécrétion protéique d'IL-8 – Matériel

Tubes à Bradford (Kartel, Italy)	
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,5 pH 7,4 (Merck, Germany)
NaOH 0,5 N et 2 N (Merck, Germany)	
Milieu CO_2 -indépendant	Milieu CO_2 -indépendant (Gibco, UK) supplémenté avec 36 mg de L-glutamine (Sigma, USA) et 3,75 g de glucose pour 500 ml de milieu
Balance (BP 211D, Sertorius, Germany)	
Centrifugeuse 4°C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Germany)	
Kit ELISA IL-8 (D8000C, R&D Systems, Minneapolis, USA)	
Spectrophotomètre (Microplate Spectrophotometer xMark, Bio-rad, USA)	

MATERIEL ET METHODES

pesés et portés à volume identique par ajout de milieu CO₂-indépendant (toujours complétement en glutamine et en glucose). Les cellules sont quant à elles rincées à l'aide de 3ml de PBS avant d'être lysées par ajout de NaOH 0,5 N. Ces lysats seront utilisés pour déterminer la concentration en protéines par un dosage de Folin. La valeur obtenue servira à normaliser la quantité d'IL-8 sécrétée par puits par la quantité de cellules présentes dans ce puits.

8.2.2 Dosage ELISA

L'utilisation d'un kit ELISA nous permet de déterminer les concentrations respectives en IL-8 les différents milieux conditionnés de macrophages (Tableau II.14). Avant toute chose, il est nécessaire de réaliser des dilutions sériées du standard IL-8 (2000 pg/ml). Pour ce faire, on ajoute 500 µl de « calibrator diluent » dans 6 eppendorfs. 500 µl de solution standard stock sont ensuite ajoutés dans un 1^{er} eppendorf. Après avoir bien mélangé ce dernier, 500 µl de ce mélange diluent/standard sont introduits dans un second eppendorf et l'opération est répétée jusqu'à obtention de 6 concentrations d'IL-8 (1000, 500, 250, 125, 62.5 et 31,25 pg/ml) en plus de la concentration stock (2000 pg/ml) et en oubliant pas une concentration nulle (0 pg/ml, uniquement du diluent) qui constitue le blanc. Ces différentes dilutions permettront d'obtenir une droite d'étalonnage d'équation $y = ax + b$ (où x représente la concentration (pg/ml) et y représente l'absorbance).

La première étape de l'ELISA consiste à ajouter 100 µl « d'assay diluent » dans chaque puits coaté avec des anticorps dirigés contre l'IL-8. On ajoute ensuite 50 µl des 8 standards, de contrôle (milieu CO₂-indépendant), ou d'échantillon par puits. On réalise quelques « up and down » afin de bien homogénéiser le tout. La plaque est ensuite scellée à l'aide d'un autocollant et incubée 2h à température ambiante. Au terme des 2h, les puits sont rincés 4 fois à l'aide de 300 µl de « wash buffer ». 100 µl de conjugué IL-8 (anticorps polyclonal anti IL-8 couplé à une peroxydase) sont ensuite ajoutés dans tous les puits et la plaque est incubée une heure à température ambiante. Une fois cette incubation terminée, 4 nouveaux lavages sont réalisés afin d'enlever l'excès de conjugué non fixé. 200 µl de solution substrat (substrat de la peroxydase) sont ensuite ajoutés dans chaque puits et le tout est incubé 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Pour terminer, 50 µl de solution stop sont introduits dans tous les puits afin de stopper la réaction et la densité optique des puits est lue à 450 nm corrigée à 540 nm. Ainsi, à partir des mesures d'absorbance, il est possible de connaître la concentration en IL-8 des différents puits. Pour chaque puits, la concentration en IL-8 est normalisée par rapport à la concentration en protéines du lysat obtenu lors du dosage de Folin. Cette normalisation permet de mesurer une sécrétion de manière indépendante au nombre de cellules entre chaque puits. Les résultats sont exprimés en picogrammes d'IL-8/µg de protéines.

III. RESULTATS

Marqueurs	N	Hch	Hcy	N + TNF- α	Hch + TNF- α	Hcy + TNF- α
Marqueurs M1						
TNF-α	1	0,86	0,90	1,10	0,93	1,54
IL-1β	1	1,09	0,95	1,35	1,15	1,27
CXCL10	1	0,57	0,24	1,34	0,49	0,33
Marqueurs M2						
CCL18	1	1,07	1,22	1,23	1,45	1,73
Fibronectine	1	0,89	0,89	0,99	1,08	0,93
CD206	1	0,89	0,54	0,83	0,79	0,64
MMP-9	1	1,07	0,85	1,01	1,16	0,86
Marqueurs angiogéniques						
IL-8	1	2,21	4,30	1,26	2,19	6,34
VEGF-A	1	4,16	1,11	0,78	4,16	1,08

Figure III.1 : Effets de l'hypoxie chronique ou cyclique en présence ou non de TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs de macrophages M1, M2 et angiogéniques en absence de glucose. Les macrophages M0 ont été incubés pendant 6h en N, Hch et Hcy dans du milieu CO₂- indépendant sans glucose, et contenant ou non d'une concentration de 0,1 ng/ml de TNF- α . Au terme des incubations, l'ARN total a été extrait et l'ARNm rétrotranscrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée et les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec les valeurs de Ct du gène de ménage (RPS9). Les résultats sont exprimés sous forme de « fold change » par rapport à la condition contrôle (N). Cette mise au point a été réalisée en simple (n=1).

1^{ère} partie : Caractérisation de macrophages M0 incubés en N, Hch et Hcy en présence ou non d'une concentration de 0,1 ng/ml de TNF- α

▪ *Etude des variations d'expression en ARNm*

1) Mises au point

Lors de notre première expérience, nous avons choisi d'étudier les variations d'expression en ARNm de marqueurs de macrophages M1, M2 et angiogéniques en réponse à l'Hch, l'Hcy et la présence de TNF- α , en absence de glucose et pour une cinétique de 6h+0hR (Figure III.1) Sur base de la littérature, nous avons choisi d'étudier 3 marqueurs de macrophages M1 : TNF- α , IL-1 β et CXCL10. Dans ces conditions, nous avons pu observer que l'expression du TNF- α était augmentée en Hcy en présence de cette même cytokine. Nous avons aussi constaté qu'une diminution de l'expression de CXCL10 pouvait être induite à la fois par l'Hch et l'Hcy, alors qu'au contraire, la présence de TNF- α augmentait son expression. En nous intéressant aux variations d'expression en ARNm de marqueurs de macrophages M2, nous avons observé que l'Hch, l'Hcy et la présence de TNF- α étaient responsables de l'augmentation de l'expression de CCL18, alors que ces facteurs induisent l'effet contraire sur l'expression de CD206. L'expression de MMP-9 est quant à elle réduite en Hcy. Finalement, nous avons choisi d'étudier les variations d'expression de deux marqueurs de l'angiogenèse à savoir l'IL-8 et le VEGF-A. Nous avons pu observer une augmentation de l'IL-8 en Hch et plus encore en Hcy, ainsi que l'induction de l'expression du VEGF-A par l'Hch.

Nous avons également suivi l'expression de ces différents marqueurs au niveau ARNm en incubant les macrophages M0 selon différentes cinétiques. En effet, en plus de la cinétique 6h+0hR, nous avons testé les cinétiques suivantes : 6h+16hR, 6h+24hR, 6h+40hR (données non-montrées). De plus, la cinétique de 6h+16hR fut étudiée selon 3 modes opératoires différents : nous avons en effet testé cette cinétique en remplaçant ou non le milieu CO₂-indépendant par du milieu CO₂-indépendant frais au terme des 6h d'incubations en N, Hch ou Hcy et, dans le cas où nous avons choisi de remplacer le milieu, nous avons inclus ou non une concentration de 0,1ng/ml TNF- α dans ce milieu frais (données non-montrées). Toutes ces expériences ont été réalisées en simple (n=1).

Sur base des résultats obtenus lors de ces différentes expérimentations, il nous a cependant semblé plus judicieux de conserver la cinétique initiale de 6h+0hR. En concertation avec les autres chercheurs et en fonction des résultats obtenus par ceux-ci, nous avons également choisi d'ajouter 3,75g de glucose dans le milieu CO₂-indépendant pour la suite de notre travail. Ce glucose permet de soutenir la glycolyse activée par l'hypoxie et ainsi de préserver la viabilité et la fonctionnalité des macrophages.

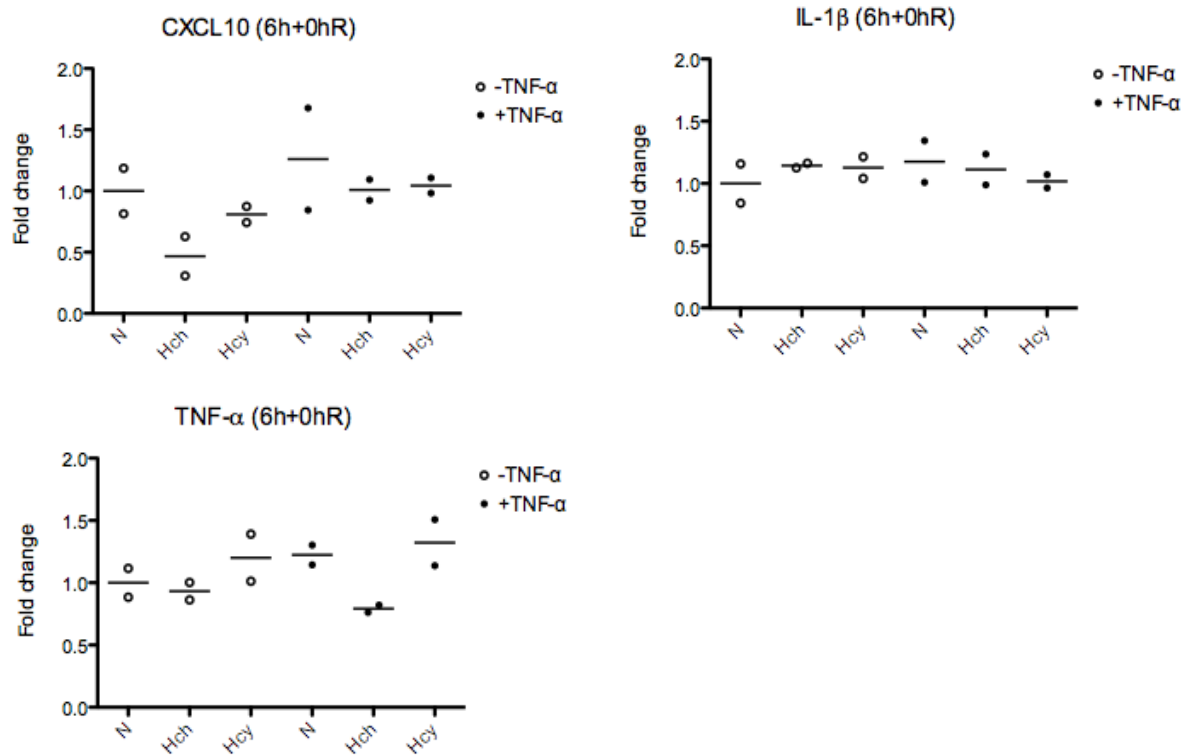


Figure III.2 : Effets de l'hypoxie chronique ou cyclique en présence ou non de TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs de macrophages M1. Les macrophages M0 ont été incubés pendant 6h en N, Hch et Hcy dans du milieu CO₂-indépendant contenant 3,75g de glucose et contenant ou non une concentration de 0,1 ng/ml de TNF- α . Au terme des incubations, l'ARN total a été extrait et l'ARNm rétrotranscrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée et les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec les valeurs de Ct du gène de ménage (RPS9). Les résultats sont exprimés sous forme de « fold change » par rapport à la condition contrôle (N). L'expérience a été réalisée en double (n=2).

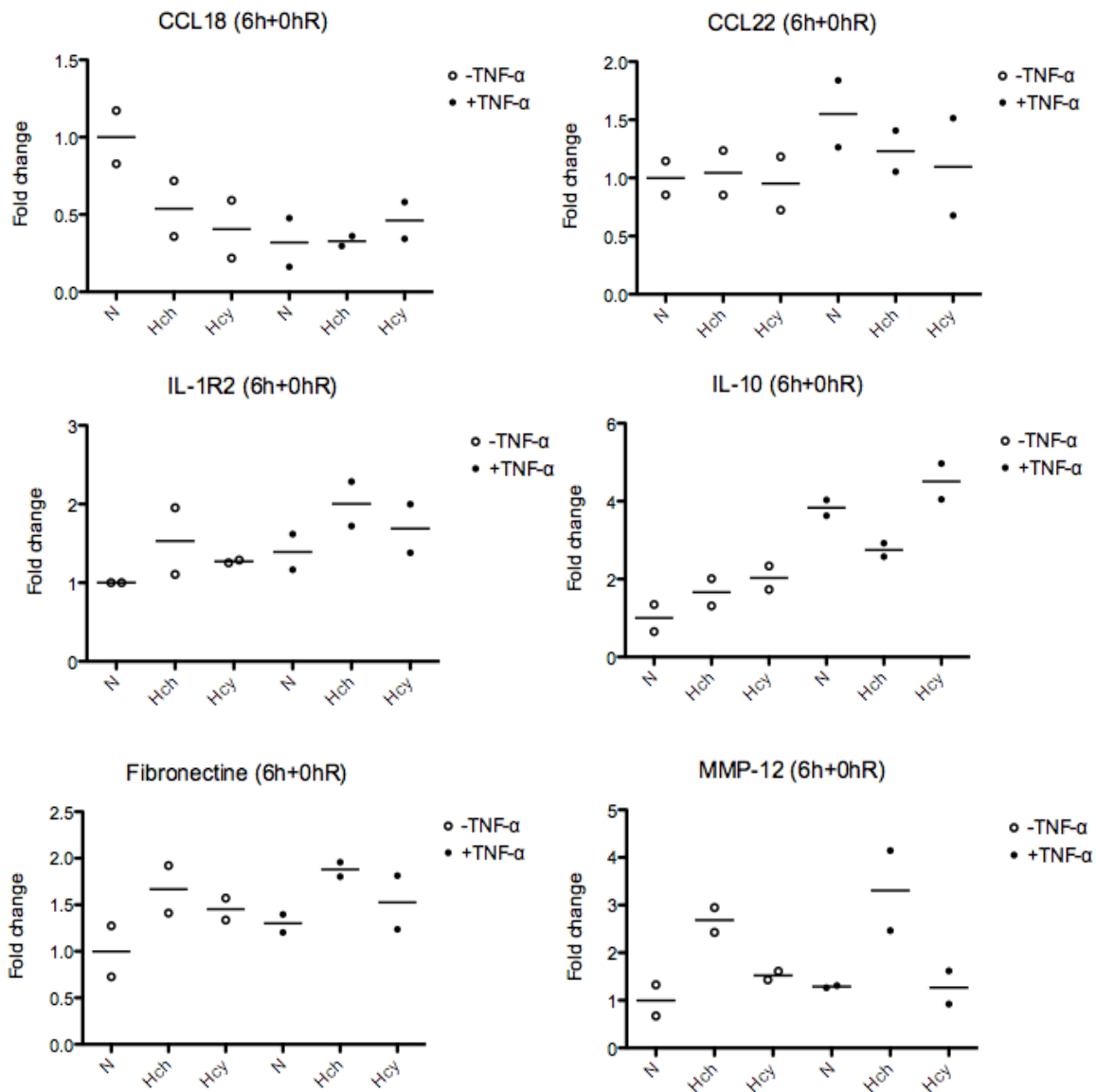


Figure III.3 : Effets de l'hypoxie chronique ou cyclique en présence ou non de TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs de macrophages M2. Les macrophages M0 ont été incubés pendant 6h en N, Hch et Hcy dans du milieu CO₂-indépendant contenant 3,75g de glucose et contenant ou non une concentration de 0,1 ng/ml de TNF- α . Au terme des incubations, l'ARN total a été extrait et l'ARNm rétrotranscrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée et les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec les valeurs de Ct du gène de ménage (RPS9). Les résultats sont exprimés sous forme de « fold change » par rapport à la condition contrôle (N). L'expérience a été réalisée en double (n=2).

2) Effets de l'hypoxie cyclique et du TNF- α en présence de 3,75g de glucose et selon une cinétique de 6h+0hR

2.1 Objectif :

Déterminer si l'Hcy et/ou la présence de TNF- α peut induire une polarisation M1 ou M2 de macrophages M0.

2.2 Effets de l'hypoxie cyclique et du TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs de macrophages M1

L'expression de transcrits codant pour des marqueurs de macrophages M1 a été étudiée en N, Hch ou Hcy en présence ou non de TNF- α selon une cinétique de 6h+0hR (Figure III.2). Sur base de la littérature, nous avons choisi d'étudier les variations d'expression de CXCL10, IL-1 β et TNF- α . En absence de TNF- α , l'expression de CXCL10 est diminuée en Hcy et plus encore en Hch. Quelque soit la PO₂, l'ajout de TNF- α dans le milieu augmente légèrement l'expression de CXCL10 pour chaque condition par rapport à sa condition d'oxygène sans TNF- α correspondante. L'expression de l'IL-1 β dans les macrophages M0 n'est pratiquement pas affectée par l'Hch, l'Hcy ou la présence de TNF- α . Le dernier marqueur M1 étudié, le TNF- α , voit son expression légèrement augmentée en Hcy en absence de cette même cytokine dans le milieu tandis que l'Hch induit une diminution minimale de l'expression de ce marqueur. Cette diminution est plus marquée en présence de TNF- α dans le milieu.

De manière générale, l'expression des marqueurs de macrophages M1 varie très peu en fonction des différentes conditions d'oxygène ou d'inflammation. De plus, ces variations sont très hétérogènes. En effet, si l'on s'intéresse à l'Hcy, on remarque que l'expression d'IL-1 β n'est pas affectée, alors que celle de CXCL10 est légèrement atténuée au contraire de celle du TNF- α qui augmente légèrement.

2.3 Effets de l'hypoxie cyclique et du TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs de macrophages M2

De manière similaire, nous avons étudié les variations d'expression de marqueurs de macrophages M2 en incubant des macrophages M0 en N, Hch ou Hcy en présence ou non de TNF- α selon une cinétique de 6h+0hR (Figure III.3). Nous avons pour cela sélectionné 6 marqueurs M2 : CCL18, CC22, IL-1R2, IL-10, la fibronectine ainsi que MMP-12. L'expression de CCL18 est diminuée lorsque les macrophages sont incubés en Hch, et plus encore en Hcy. La présence de TNF- α dans le milieu diminue également l'expression de CCL18 en normoxie. De plus, la présence de cette cytokine semble annihiler les effets des différentes conditions d'oxygène observés en son absence. L'hypoxie chronique induit l'induction d'IL-1R2, de la fibronectine et de MMP-12 en présence et en absence de TNF- α . L'hypoxie cyclique quant à elle induit l'expression de l'IL-10 indépendamment de la présence de TNF- α . La présence de cette cytokine induit par contre une augmentation de l'expression de l'IL-10 pour chaque PO₂ considérée ainsi que l'expression de CCL22 lorsque les macrophages sont incubés en normoxie.

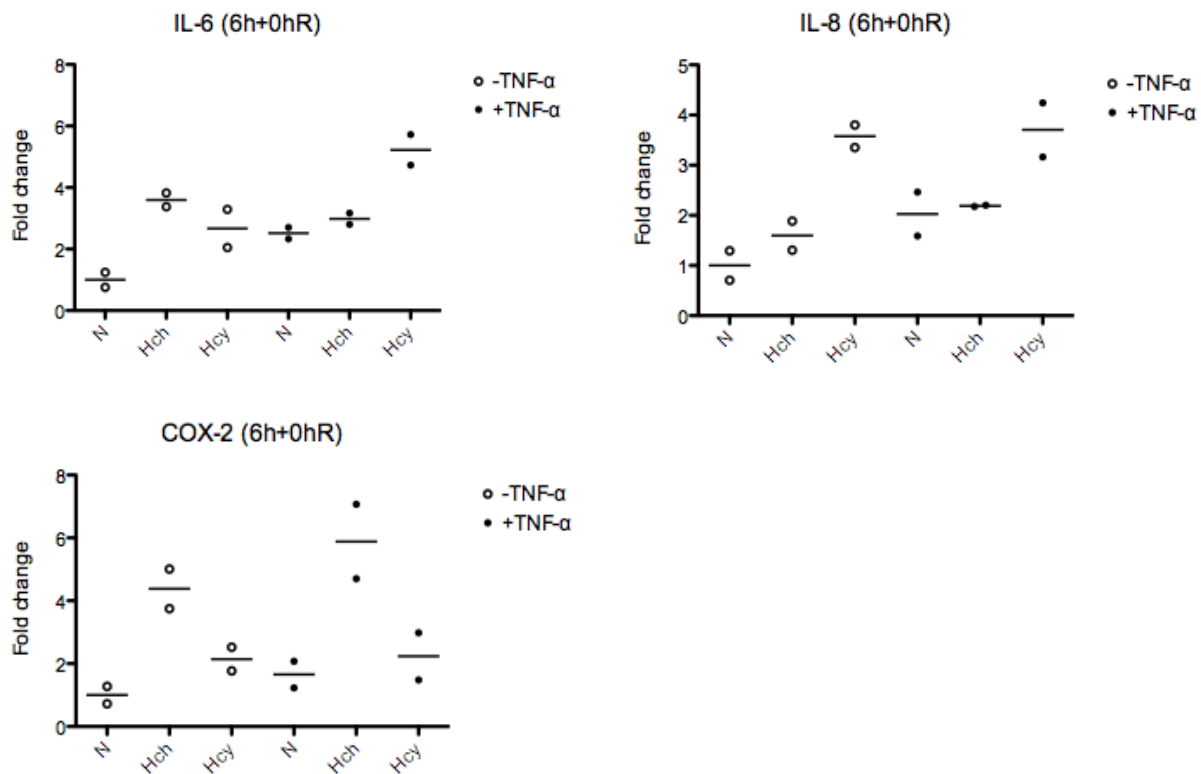


Figure III.4 : Effets de l'hypoxie chronique ou cyclique en présence ou non de TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs impliqués dans l'inflammation et l'angiogenèse. Les macrophages M0 ont été incubés pendant 6h en N, Hch et Hcy en présence ou non d'une concentration de 0,1 ng/ml de TNF- α . Au terme des incubations, l'ARN total a été extrait et l'ARNm rétrotranscrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée et les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec les valeurs de Ct du gène de ménage (RPS9). Les résultats sont exprimés sous forme de « fold change » par rapport à la condition contrôle (N). L'expérience a été réalisée en double (n=2).

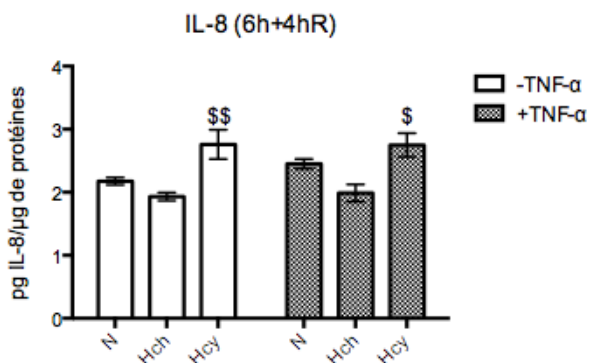


Figure III.5 : Effets de l'hypoxie chronique ou cyclique en présence ou non de TNF- α sur la sécrétion d'IL-8 à 6h+4hR. Les macrophages M0 ont été incubés pour une période de 6h suivie de 4h de réoxygénation en N, Hch ou Hcy en présence ou non d'une concentration physiologique de TNF- α . Au terme de ces 10h d'incubation, les surnageants ont été récoltés, pesés, et portés à volume identique. La sécrétion de l'IL-8 par les cellules a été mesurée à l'aide d'un ELISA spécifique pour l'IL-8 en réalisant 3 expériences indépendantes (n=3). La concentration en IL-8 a ensuite été normalisée par rapport à la concentration en protéines du puits correspondant. Les résultats sont exprimés en picogrammes d'IL-8/ μ g de protéines en tant que moyenne \pm 1 écart-type. Une analyse statistique a été réalisée en effectuant une ANOVA 2.

\$ Hcy vs Hch correspondant

\$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01

RESULTATS

Comme pour les marqueurs M1, les variations d'expression des marqueurs M2 sont très hétérogènes d'un marqueur à l'autre. En absence de TNF- α , l'Hch et l'Hcy peuvent tantôt induire (IL-1R2, IL-10, fibronectine) tantôt réduire (CCL18) l'expression des transcrits des marqueurs M2. L'effet du TNF- α est également très variable d'un marqueur à l'autre ainsi que d'une condition à l'autre.

2.4 Effet de l'hypoxie cyclique et du TNF- α sur l'expression en ARNm de marqueurs inflammatoires et angiogéniques

Nous avons également étudié l'expression génique de marqueurs inflammatoires et angiogéniques en N, Hch, et Hcy, toujours en présence ou non de TNF- α (Figure III.4). Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'expression de gènes tels que l'IL-6, l'IL-8 ainsi que COX-2. L'expression de l'IL-6 est augmentée à la fois par l'Hch et l'Hcy. La présence de TNF- α contribue également à augmenter l'expression de cette cytokine. L'expression de l'IL-8 quant à elle est fortement augmentée lorsque les macrophages sont incubés en Hcy, aussi bien en présence qu'en absence de TNF- α dans le milieu. L'Hch induit des effets similaires sur l'expression génique de COX-2.

L'Hch et l'Hcy induisent donc l'expression de ces trois gènes. L'effet de l'Hcy a plus marqué sur l'expression de l'IL-8 tandis que l'Hch a plus d'effet sur l'expression de COX-2. Les variations d'expression protéiques de l'IL-6 et de l'IL-8 ont ainsi été étudiées dans la suite de notre travail.

▪ *Etude de l'expression protéique de l'IL-8, l'IL-6 et l'IL-10*

Sur base des résultats obtenus en real-time PCR montrant une augmentation de l'expression d'IL-8 en Hcy en présence ou non de TNF- α par rapport à la normoxie en présence ou non de TNF- α à 6h+0hR, nous nous sommes intéressés à la sécrétion de cette cytokine par les macrophages (Figure III.5). Pour la mesure de la sécrétion de l'IL-8, nous avons choisi une cinétique de 6h+4hR afin de laisser le temps aux cellules de traduire et de sécréter cette cytokine. La sécrétion a été mesurée à l'aide d'un ELISA spécifique. Pour chaque puits, la concentration en IL-8 a été normalisée par rapport à la concentration en protéines, cette normalisation permet de mesurer une sécrétion de manière indépendante du nombre de cellules entre chaque puits. L'incubation des macrophages M0 en Hcy en présence ou non de TNF- α induit une augmentation de la sécrétion d'IL-8 à 6h+4hR par rapport aux incubations en N. Au contraire, lorsqu'ils sont incubés en Hch en présence ou non de TNF- α , la sécrétion d'IL-8 diminue légèrement par rapport à la sécrétion des macrophages incubés en N en présence ou non TNF- α .

Toujours sur base des résultats obtenus en real-time PCR, nous avons également tenté de mesurer la sécrétion d'IL-6 et d'IL-10 à l'aide d'ELISA spécifiques pour ces deux cytokines. Cependant, aucune sécrétion n'a pu être détectée. Il faut remarquer que les Ct obtenus pour l'ARNm de ces deux cytokines étaient nettement plus élevés que ceux obtenus pour l'IL-8. La sécrétion d'IL-6 et d'IL-10 pourrait donc se situer sous le seuil de détection de l'ELISA utilisé.

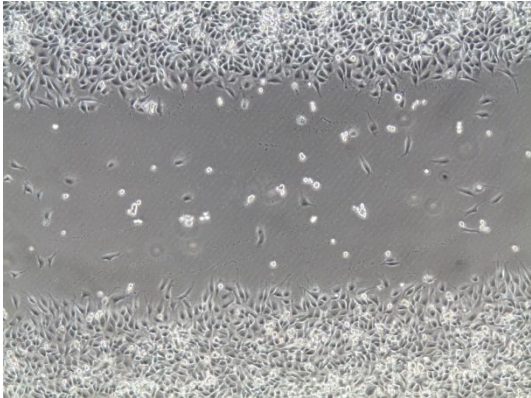
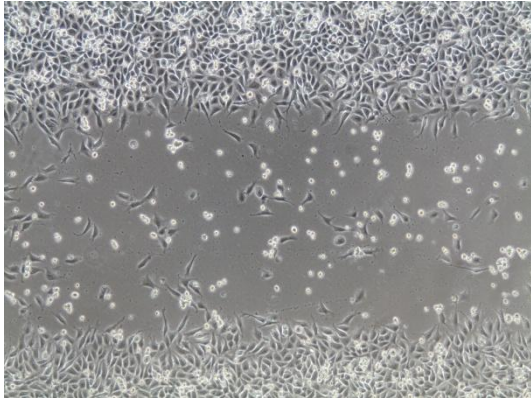
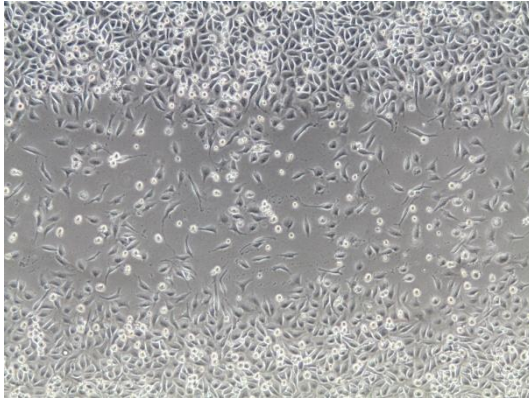
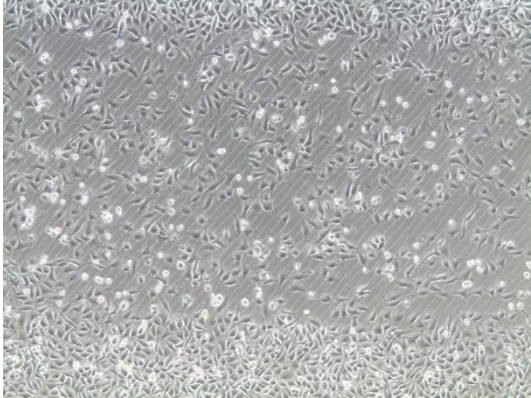

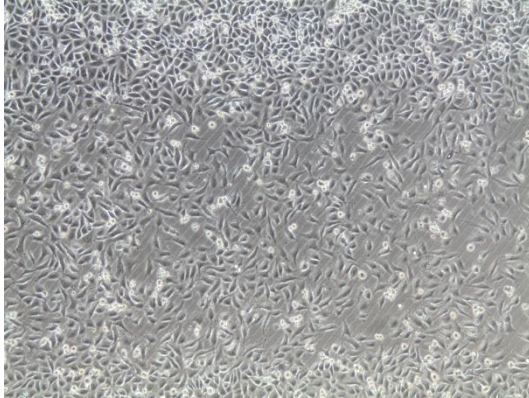
Contrôles de migration	Cellules EAhy926 après 6h de migration	Cellules EAhy926 après 10h de migration	Cellules EAhy926 après 22h de migration
CTL - : incubation en normoxie dans du milieu CO ₂ -indépendant			
CTL + : incubation en hypoxie cyclique dans du milieu CO ₂ -indépendant			

Figure III.6 : Contrôles négatif et positif de migration des cellules EAhy926 après 6h, 10h et 22h de migration. Des scratches ont été réalisés dans une monocouche confluente de cellules EAhy926. Les cellules ont ensuite été rincées 2x à l'aide de PBS avant d'être incubées pour une durée totale de 22h dans du milieu CO₂-indépendant en N (contrôle négatif) et en Hcy (contrôle positif). Des photos ont été prises après 6h, 10h et 22h de migration.

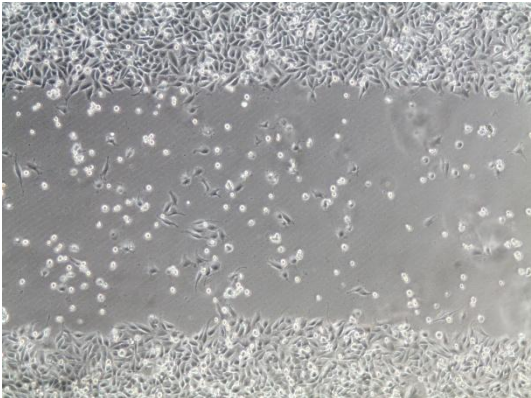
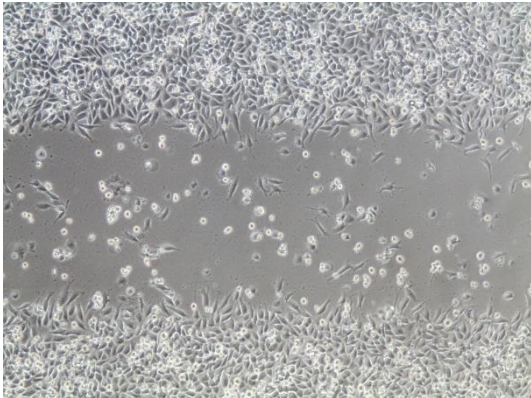
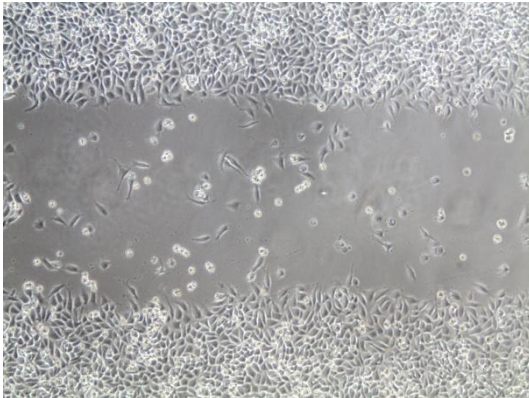
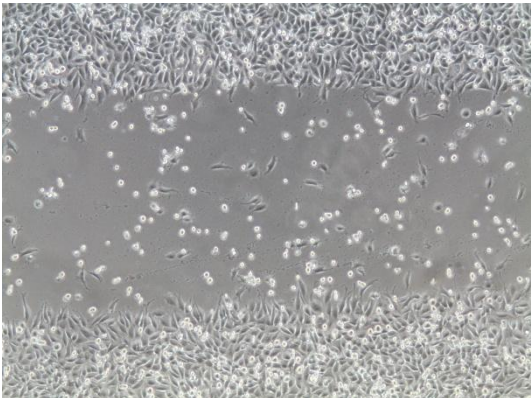
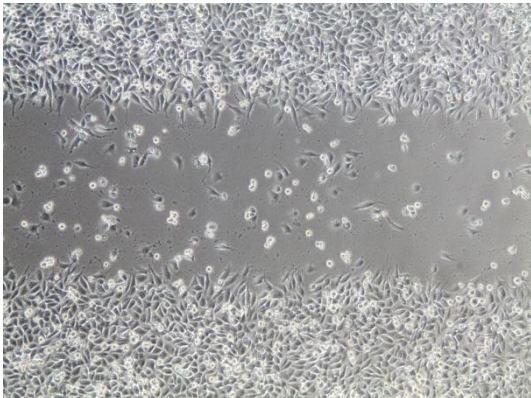
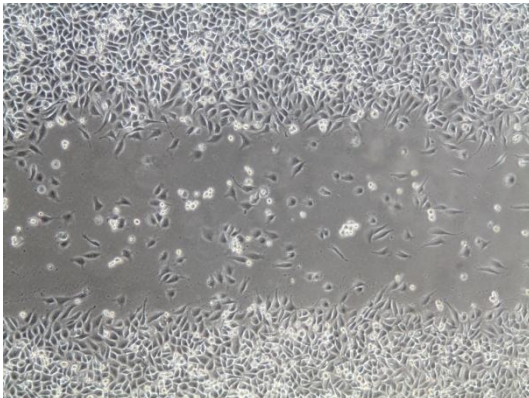
Après 6h de migration	Cellules EAhy926 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en normoxie	Cellules EAhy926 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie chronique	Cellules EAhy926 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie cyclique
Milieux conditionnés sans TNF-α			
Milieux conditionnés contenant 0,1ng/ml de TNF-α			

Figure III.7 : Effet des milieux conditionnés de macrophages M0 sur la migration des cellules EAhy926 après 6h de migration. Des scratches ont été réalisés dans une monocouche confluente de cellules EAhy926. Les cellules ont ensuite été rincées 2x à l'aide de PBS avant d'être incubées en N en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0 pour une durée totale de 22h. Des photos ont été prises après 6h, 10h et 22h de migration.

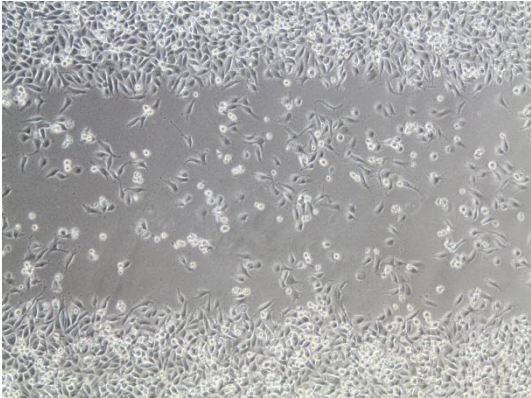
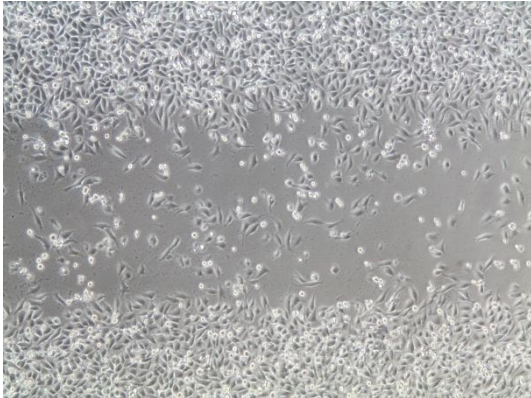
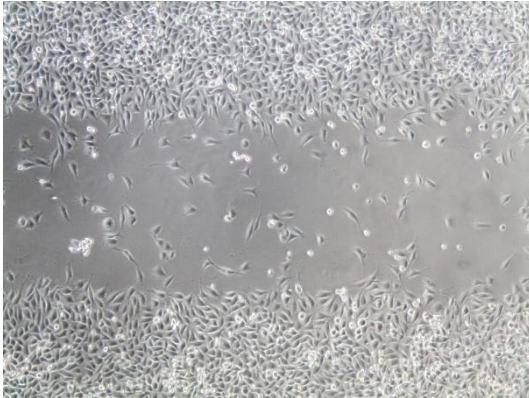
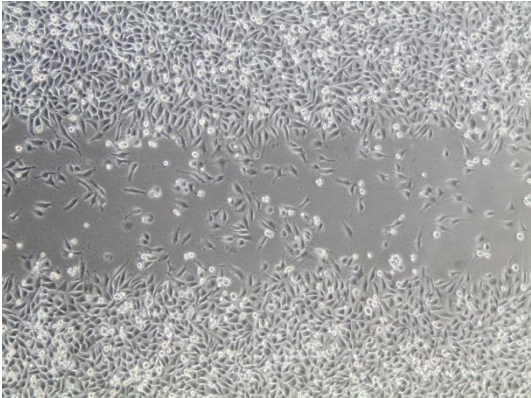
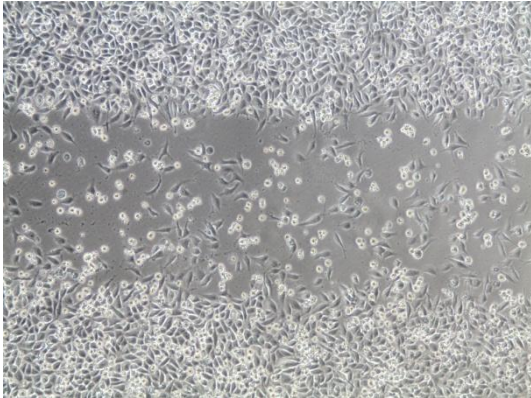
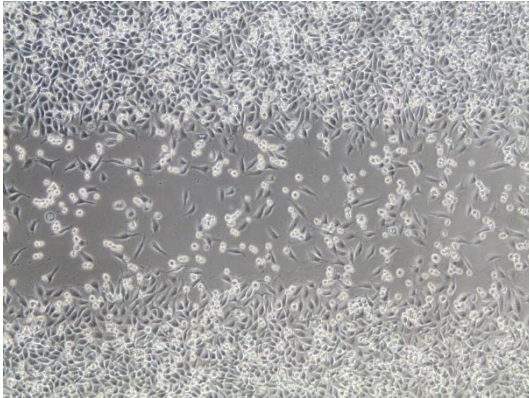
Après 10h de migration	Cellules EAhy926 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en normoxie	Cellules EAhy926 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie chronique	Cellules EAhy926 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie cyclique
Milieux conditionnés sans TNF-α			
Milieux conditionnés contenant 0,1ng/ml de TNF-α			

Figure III.8 : Effet des milieux conditionnés de macrophages M0 sur la migration des cellules EAhy926 après 10h de migration. Des scratches ont été réalisés dans une monocouche confluente de cellules EAhy926. Les cellules ont ensuite été rincées 2x à l'aide de PBS avant d'être incubées en N en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0 pour une durée totale de 22h. Des photos ont été prises après 6h, 10h et 22h de migration.

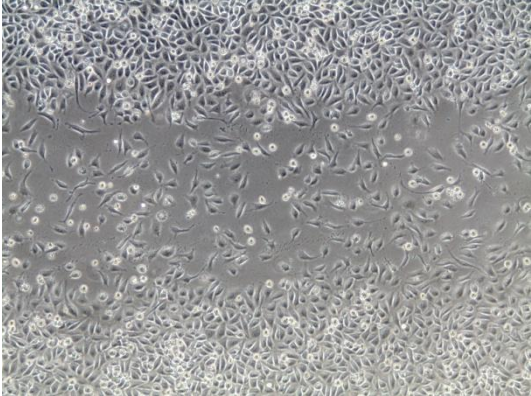
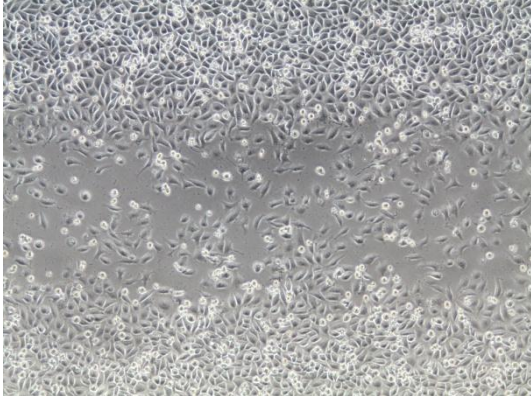
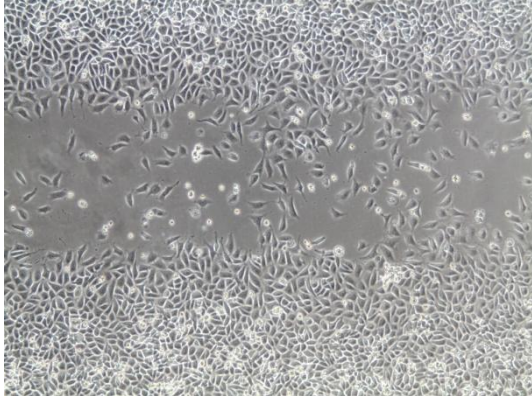
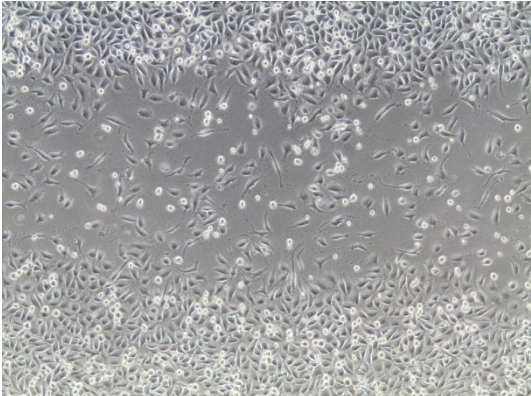
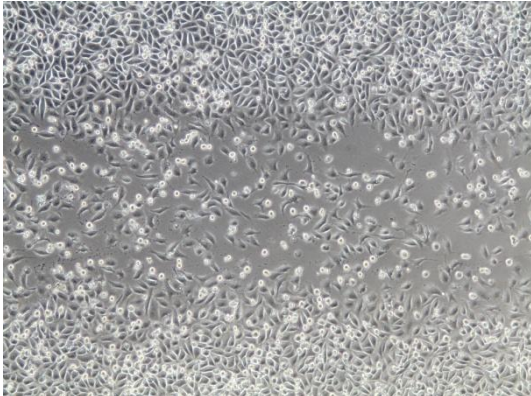
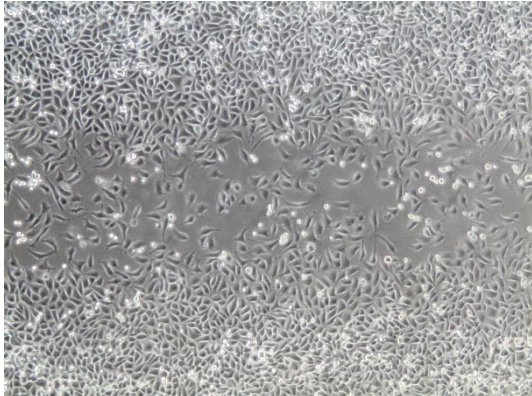
Après 22h de migration	Cellules EAhy926 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en normoxie	Cellules EAhy926 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie chronique	Cellules EAhy926 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie cyclique
Milieux conditionnés sans TNF-α			
Milieux conditionnés contenant 0,1ng/ml de TNF-α			

Figure III.9 : Effet des milieux conditionnés de macrophages M0 sur la migration des cellules EAhy926 après 22h de migration. Des scratches ont été réalisés dans une monocouche confluente de cellules EAhy926. Les cellules ont ensuite été rincées 2x à l'aide de PBS avant d'être incubées en N en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0 pour une durée totale de 22h. Des photos ont été prises après 6h, 10h et 22h de migration.

2^e partie : Etude de l'effet des milieux conditionnés de macrophages M0 sur le comportement migratoire et sur la viabilité des cellules endothéliales (EAhy926) et tumorales (A549)

▪ Etude de la migration cellulaire

1) Etude de la migration des cellules EAhy926

Comme nous l'avons vu, la migration de cellules endothéliales est impliquée dans de nombreux mécanismes angiogéniques impliqués dans la croissance tumorale. Au sein des tumeurs, la migration de ces cellules peut être induite par la libération de chémokines par les cellules stromales ou tumorales mais également par des facteurs physiques tels que l'hypoxie cyclique comme l'ont démontré Toffoli et al. (Toffoli et al., 2009).

Lors de notre travail, nous avons voulu étudier le comportement migratoire de cellules endothéliales EAhy926 incubées en présence de milieux conditionnés de macrophages M0. Pour ce faire, nous avons d'abord produit et récolté les différents milieux conditionnés. Ceux-ci furent obtenus en incubant des macrophages M0 en N, Hch ou en Hcy en présence ou non d'une concentration de 0,1 ng/ml de TNF- α , conditions pouvant être retrouvées au sein du microenvironnement tumoral. Après avoirensemencé les cellules en plaques 6 puits, nous avons réalisé des scratch dans la monocouche confluyente de cellules endothéliales EAhy926. Nous avons ensuite incubé ces cellules en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0. La migration des cellules endothéliales a été suivie pendant 6h, 10h et 22h. 3 « scratches » par puits et par condition ont été réalisés pour évaluer la reproductibilité (non montré).

La figure III.6 montre les contrôles négatif et positif de migration, après 6h, 10h et 22h de migration. En vue de réaliser un contrôle négatif, les cellules EAhy926 ont été incubées en normoxie et mises en présence de milieu CO₂-indépendant classique (c'est-à-dire non-conditionné). Sur base des résultats obtenus par Toffoli et al., des cellules EAhy926 ont été incubées en hypoxie cyclique en guise de contrôle positif. Après 6h, nous observons une faible migration des cellules incubées en normoxie (contrôle négatif) en comparaison à celles incubées en hypoxie cyclique (contrôle positif). Bien que s'accroissant légèrement avec le temps, la migration du contrôle négatif reste bien moindre que celle du contrôle positif pour les temps 10h et 22h.

La figure III.7 montre la migration des cellules EAhy926 incubées en présence des milieux conditionnés de macrophages M0 6h après avoir la réalisation des scratches. Aucune différence significative ne peut être observée tant entre les différents milieux conditionnés que par rapport au contrôle négatif. Après 10h d'incubation (Figure III.8), la migration s'est légèrement accentuée mais nous ne pouvons pas déceler un effet évident des différents milieux conditionnés. Malgré tout, la migration des cellules incubées 10h en présence de milieu conditionné de macrophages M0 incubés 6h+4hR en hypoxie cyclique et en absence de TNF- α semble légèrement atténuée. Le même constat peut être établi après 22h de migration (Figure III.9).

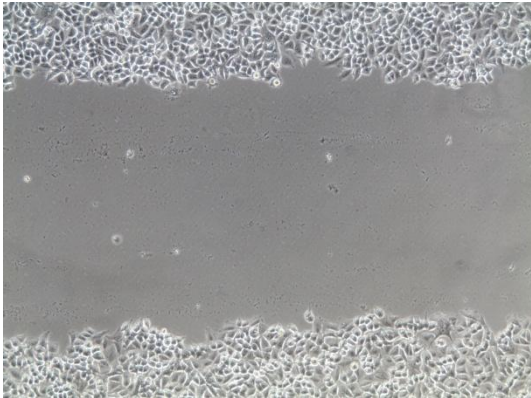
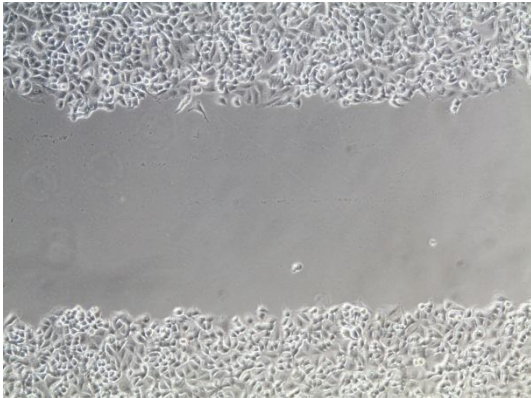
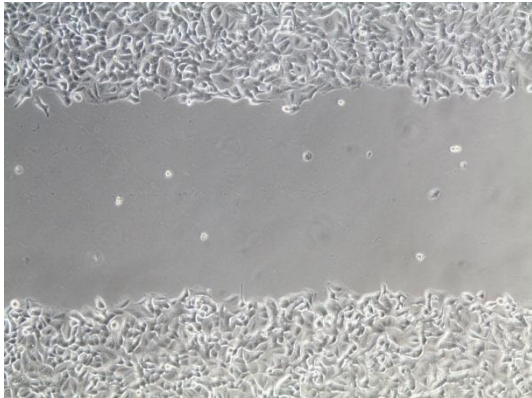
Contrôle de migration	Cellules A549 après 6h de migration	Cellules A549 après 10h de migration	Cellules A549 après 22h de migration
CTL - : incubation en normoxie dans du milieu CO ₂ -indépendant			

Figure III.10 : Contrôles négatif de migration des cellules A549 après 6h, 10h et 22h de migration. Des scratches ont été réalisés dans une monocouche confluente de cellules A549. Les cellules ont ensuite été rincées 2x à l'aide de PBS avant d'être incubées pour une durée totale de 22h dans du milieu CO₂-indépendant en N.

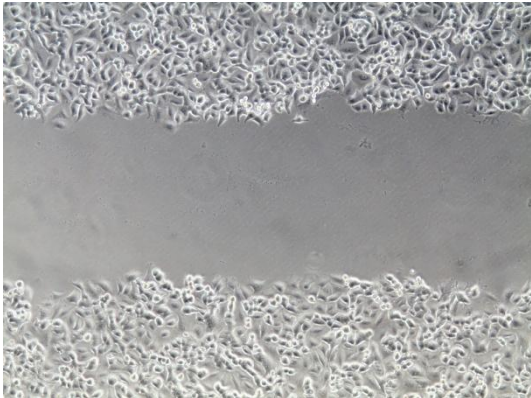
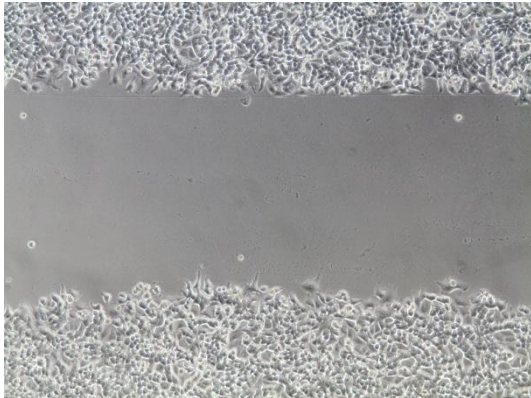
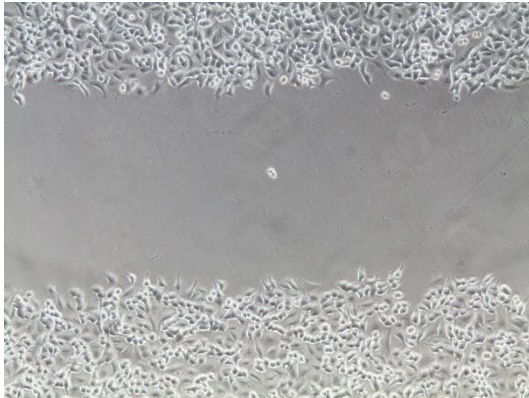
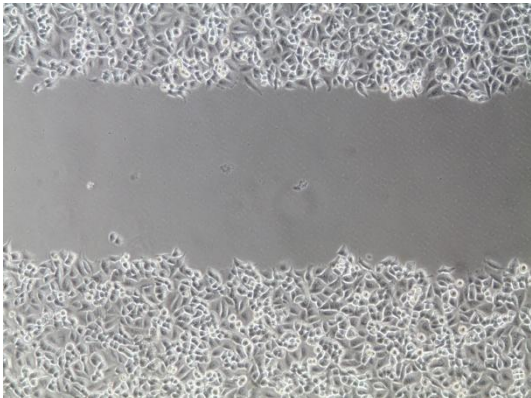
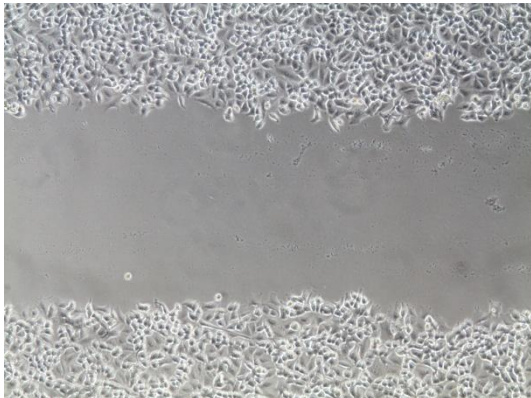
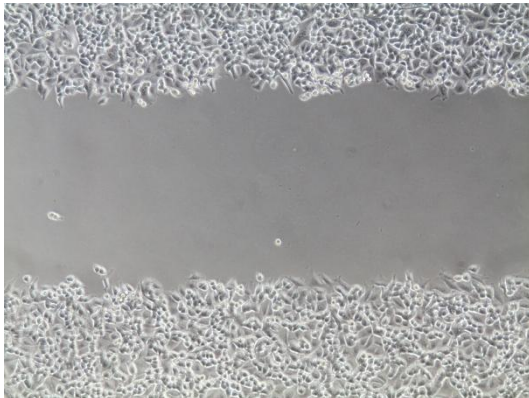
Après 6h de migration	Cellules A549 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en normoxie	Cellules A549 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie chronique	Cellules A549 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie cyclique
Milieux conditionnés sans TNF-α			
Milieux conditionnés contenant 0,1ng/ml de TNF-α			

Figure III.11 : Effet des milieux conditionnés de macrophages M0 sur la migration des cellules A549 après 6h de migration. Des scratches ont été réalisés dans une monocouche confluente de cellules EAhy926. Les cellules ont ensuite été rincées 2x à l'aide de PBS avant d'être incubées en N en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0 pour une durée totale de 22h. Des photos ont été prises après 6h, 10h et 22h de

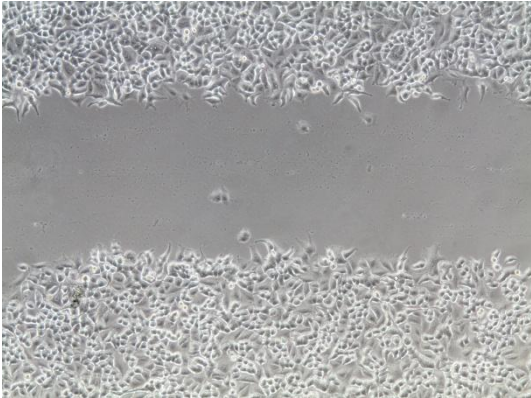
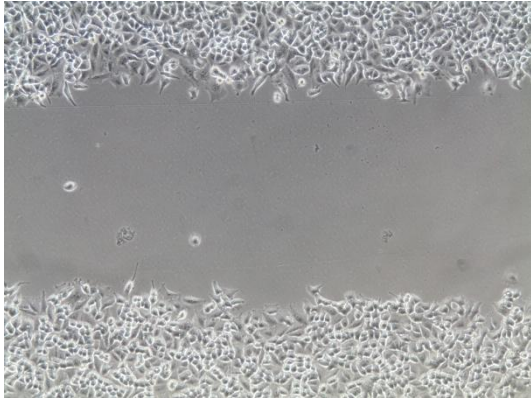
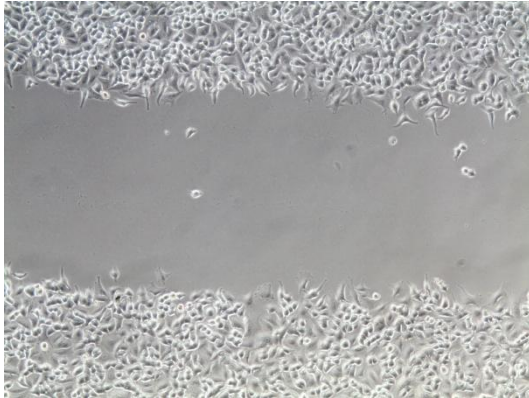
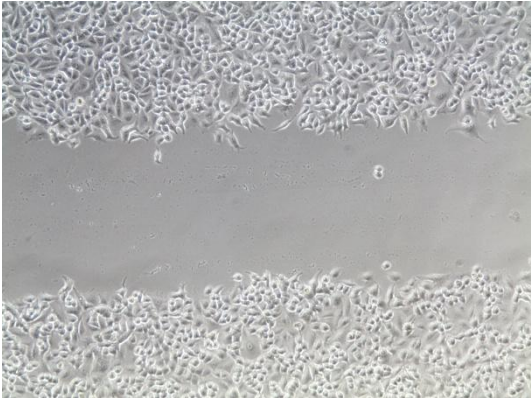
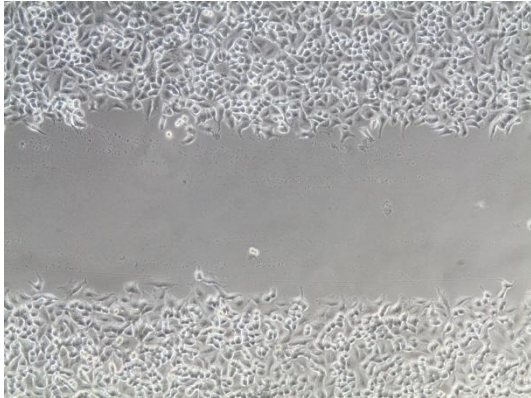
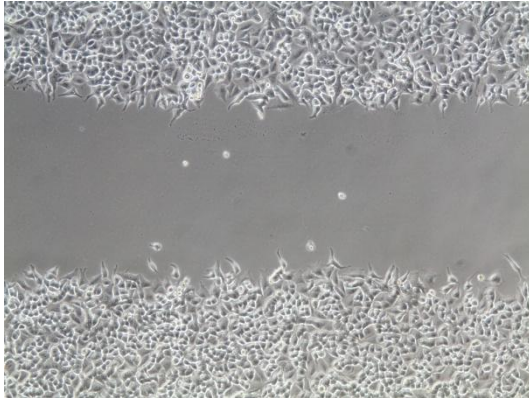
Après 10h de migration	Cellules A549 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en normoxie	Cellules A549 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie chronique	Cellules A549 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie cyclique
Milieux conditionnés sans TNF-α			
Milieux conditionnés contenant 0,1ng/ml de TNF-α			

Figure III.12 : Effet des milieux conditionnés de macrophages M0 sur la migration des cellules A549 après 10h de migration. Des scratches ont été réalisés dans une monocouche confluente de cellules EAhy926. Les cellules ont ensuite été rincées 2x à l'aide de PBS avant d'être incubées en N en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0 pour une durée totale de 22h. Des photos ont été prises après 6h, 10h et 22h de migration.

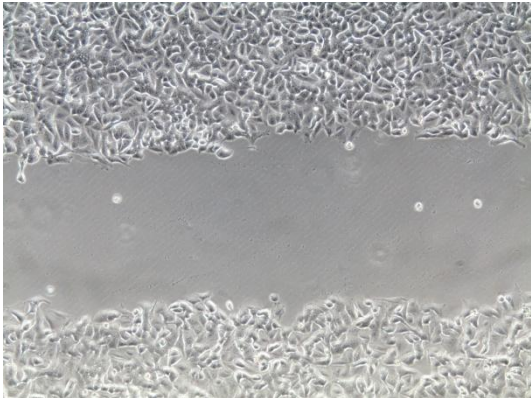
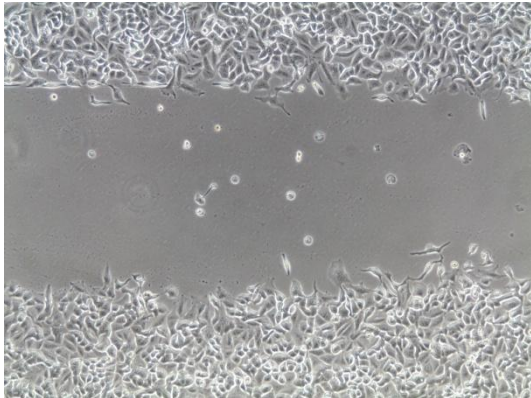
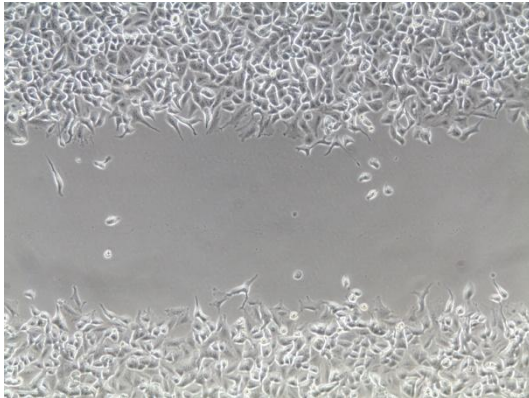
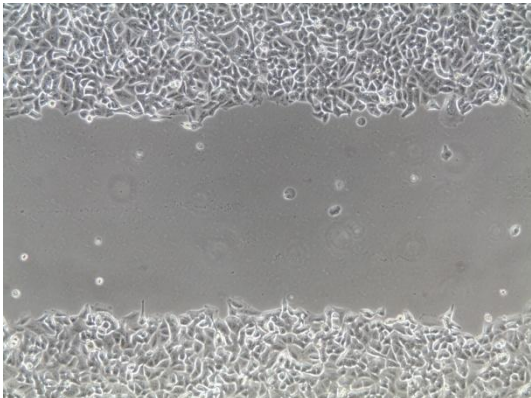
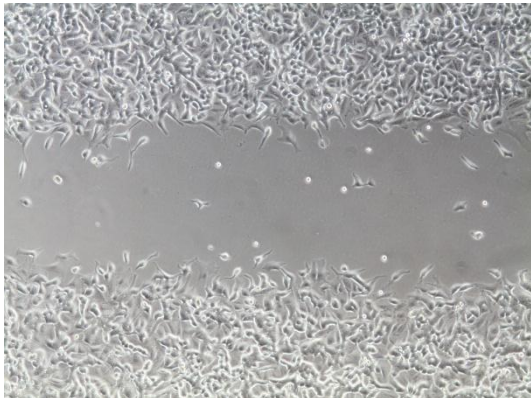
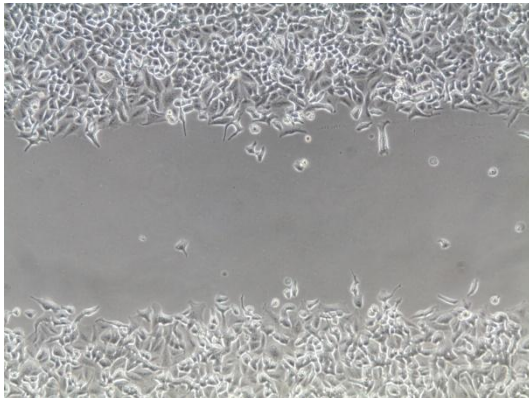
Après 22h de migration	Cellules A549 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en normoxie	Cellules A549 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie chronique	Cellules A549 exposées aux milieux conditionnés de macrophages incubés 6h+4hR en hypoxie cyclique
Milieux conditionnés sans TNF-α			
Milieux conditionnés contenant 0,1ng/ml de TNF-α			

Figure III.13 : Effet des milieux conditionnés de macrophages M0 sur la migration des cellules A549 après 22h de migration. Des scratches ont été réalisés dans une monocouche confluente de cellules EAhy926. Les cellules ont ensuite été rincées 2x à l'aide de PBS avant d'être incubées en N en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0 pour une durée totale de 22h. Des photos ont été prises après 6h, 10h et 22h de migration.

2) Etude de la migration des cellules A549

Les cellules tumorales possèdent des propriétés intrinsèques leur permettant d'acquérir un phénotype invasif. L'invasion survient lorsque des cellules tumorales passent outre la membrane basale du tissu qu'elles occupent. A partir de là, elles peuvent rejoindre le flux sanguin et former de nouvelles tumeurs au niveau de sites secondaires. L'invasion des cellules tumorales fait intervenir de nombreux mécanismes et communications intercellulaires. Il est également évident que l'invasion requiert une migration des cellules tumorales. Comme nous l'avons décrit précédemment, cette migration peut être médiée par les TAMs via la communication EGF/CSF-1 s'établissant entre les TAMs et les cellules tumorales. Il était donc intéressant de répéter l'étude des effets conditionnés de macrophages M0 sur une lignée tumorale, ici, les cellules A549.

La procédure que nous avons utilisé pour étudier la migration des cellules A549 est la même que celle utilisée pour l'étude de la migration des cellules EAhy926. Nous avons une nouvelle fois réalisé un contrôle négatif de migration en incubant les cellules A549 en normoxie en présence de milieu CO₂-indépendant non-conditionné. 6h, 10h et 22h après avoir réalisé le scratch, on n'observe pas de migration des cellules A549 dans ces derniers (Figure III.10). Aucun contrôle positif n'a été réalisé pour cette expérience.

Les figures III.11, III.12 et III.13 montrent les résultats de l'expérience ayant pour objectif d'évaluer l'effet des milieux conditionnés de macrophages M0 sur la migration des cellules A549. Les cellules A549 incubées 6h en présence des milieux conditionnés ne migrent pas dans le scratch (Figure III.11). La prolongation de l'exposition des cellules A549 aux différents milieux conditionnés ne modifie pas leur comportement migratoire puisqu'aucune (ou très peu) cellule ne peut être observée à l'intérieur du scratch 10h et 22h après l'ajout des milieux conditionnés (Figures III.12 et III.13). Les milieux conditionnés des macrophages M0 n'induisent donc pas la migration des cellules A549 dans ce système.

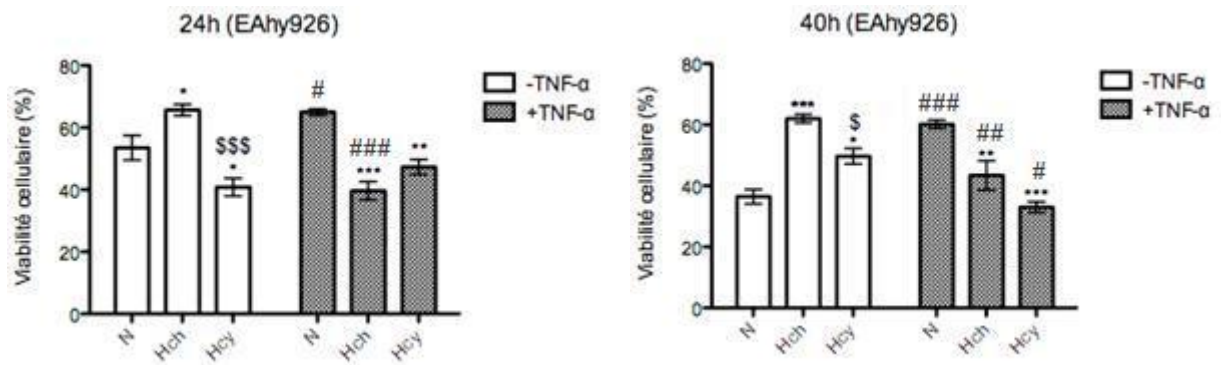


Figure III.14 : Effets de milieux conditionnés de macrophages M0 sur la viabilité des cellules EAhy926. 24h après avoir été ensemencées en plaques 24 puits, les cellules EAhy926 ont été incubées 24h ou 40h en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0. Au terme des incubations, la solution MTT a été ajoutée à chaque puits, et les cellules ont été lysées. Finalement, l'absorbance a été lue grâce à un spectrophotomètre. Pour les deux cinétiques, des contrôles ont été réalisés en incubant des cellules EAhy926 en présence de milieu CO₂-indépendant non conditionné. Ces contrôles constituent le seuil de 100% de viabilité. Une analyse statistique a été réalisée en effectuant une ANOVA 2.

* Hch et Hcy vs N correspondant * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p< 0,001
 \$ Hcy vs Hch correspondant \$ p<0,05 ; \$\$\$ p< 0,001
 # TNF-α vs CTL pour la même pO₂ # p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p< 0,001

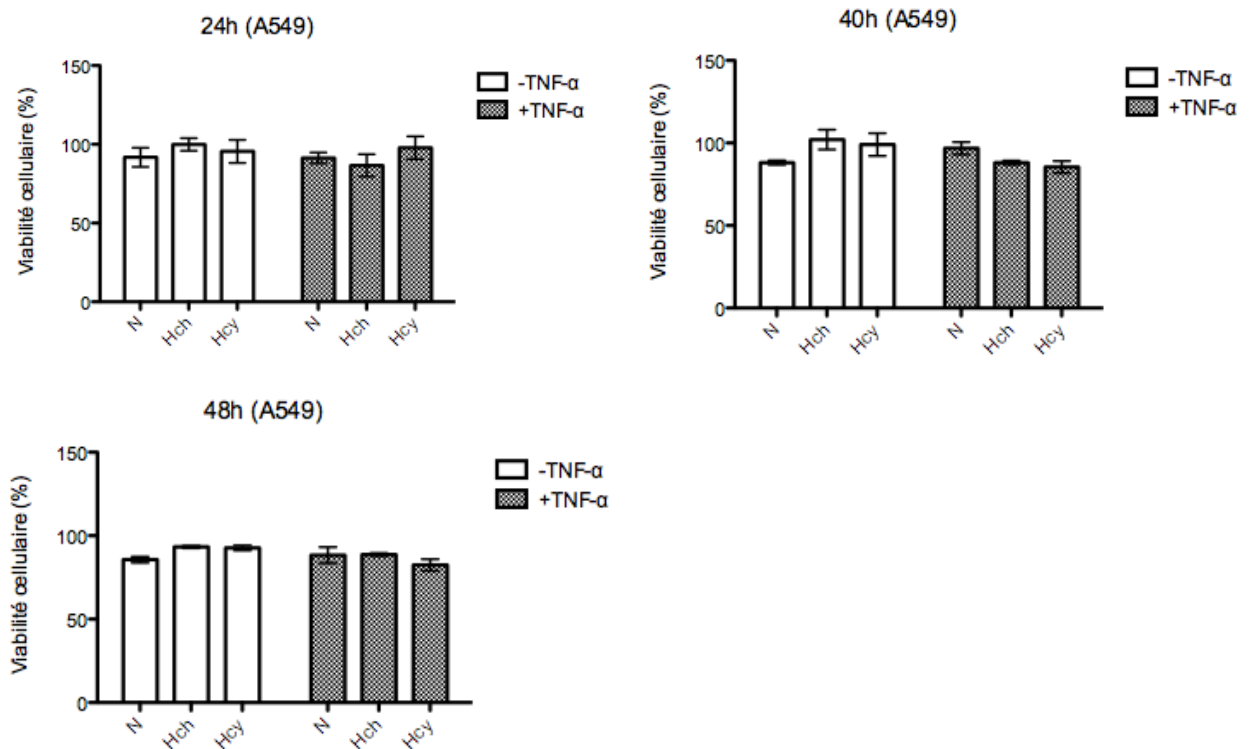


Figure III.15 : Effets de milieux conditionnés de macrophages M0 sur la viabilité des cellules A549. 24h après avoir été ensemencées en plaques 24 puits, les cellules A549 ont été incubées 24h, 40h et 48h en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0. Au terme des incubations, la solution MTT a été ajoutée à chaque puits, et les cellules ont été lysées. Finalement, l'absorbance a été lue grâce à un spectrophotomètre. Pour les trois cinétiques, des contrôles ont été réalisés en incubant des cellules A549 en présence de milieu CO₂-indépendant non conditionné. Ces contrôles constituent les seuils de 100% de viabilité. Une analyse statistique a été réalisée en effectuant une ANOVA 2.

▪ *Etude de la viabilité cellulaire*

1) **Etude de la viabilité des cellules EAhy926**

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins requiert également la prolifération et l'apparition de nouvelles cellules endothéliales. Ainsi, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet de milieux conditionnés de macrophages M0 sur la viabilité de cellules EAhy926. Les milieux conditionnés ont été obtenus comme pour l'étude de la migration, c'est-à-dire en incubant des macrophages M0 en N, Hch ou en Hcy en présence ou non d'une concentration physiologique de TNF- α . 24h après ensemencement en plaques 24 puits, les cellules EAhy926 ont été incubées en présence des différents milieux conditionnés de macrophages M0 pour des durées de 24h et 40h. Des contrôles ont été réalisés pour chaque cinétique en incubant des cellules en présence de milieu CO₂-indépendant non conditionné. Ces contrôles constituent le seuil de 100% de viabilité cellulaire. Au terme des incubations, la solution MTT a été ajoutée à chaque puits, et les cellules ont été lysées. Finalement, nous avons lu l'absorbance grâce à un spectrophotomètre.

Après 24h d'incubation, on remarque que tous les milieux conditionnés sont responsables d'une cytotoxicité envers les cellules EAhy926 (Figure III.14). En effet, le taux de survie cellulaire est compris entre 40% et 70% par rapport à la condition contrôle. En absence de TNF- α , l'effet cytotoxique sur les cellules EAhy926 est significativement moindre pour les cellules incubées en présence de milieu conditionné de macrophages M0 incubés en Hch par rapport à celles incubées en présence de milieu conditionné de macrophages M0 incubés en normoxie. Au contraire, l'effet cytotoxique est significativement plus important en présence de milieu conditionné de macrophages M0 incubés en Hcy. En présence de TNF- α , le pouvoir cytotoxique des milieux conditionnés de macrophages M0 incubés en Hch et Hcy est nettement plus important que lorsque les macrophages sont incubés en normoxie. Après 40h d'incubation, et pour les conditions en absence de TNF- α , on observe que le milieu conditionné des macrophages qui ont été préalablement incubés en N possède un pouvoir cytotoxique plus important que lorsque ces macrophages sont incubés en Hch ou en Hcy. L'effet inverse est observé en présence de TNF- α .

2) **Etude de la viabilité des cellules A549**

Enfin, nous avons émis l'hypothèse que l'hypoxie chronique, cyclique, ou l'inflammation pouvait induire chez les macrophages M0, l'expression de facteurs favorisant la survie des cellules tumorales, et par conséquent, la croissance tumorale. Nous avons donc répété l'étude de viabilité sur les cellules A549. Comme pour les cellules EAhy926, nous avons donc généré des milieux conditionnés que nous avons mis en présence de ces cellules tumorales. Des contrôles donnant la viabilité de 100% ont également été réalisés de manière similaire à l'étude de la viabilité des cellules EAhy926. Les cellules A549 ont été incubées pour des cinétiques de 24h, 40h et 48h.

Après 24h d'incubation, on n'observe pas d'effet significatif des différents milieux conditionnés de macrophages M0 sur la viabilité des cellules A549 (Figure III.15). En effet, la viabilité oscille aux alentours des 100% pour les différentes conditions étudiées. L'augmentation de la durée d'exposition aux différents milieux conditionnés n'affecte pas la survie ni la prolifération des cellules A549.

IV. DISCUSSION, CONCLUSION, PERSPECTIVES

1) Discussion

Nous savons désormais que le microenvironnement dans lequel se développe une tumeur possède un impact considérable sur la croissance de celle-ci. Ce microenvironnement est caractérisé par la présence de populations cellulaires diversifiées, parmi lesquelles, en plus de cellules tumorales elles-mêmes, on retrouve des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules immunitaires. Parmi ce dernier type cellulaire, la présence et le nombre de macrophages sont généralement corrélés avec un mauvais pronostic (Yue et al., 2012, Steidl et al., 2010, Bingle et al., 2002). Ces macrophages associés aux tumeurs (TAMs) échouent à afficher les caractéristiques classiques des macrophages comme la capacité d'attirer et d'activer les cellules de l'immunité adaptative. Au contraire, ils contribuent à l'extinction de cette réponse immune adaptative vis-à-vis des cellules tumorales, à l'apparition d'un caractère invasif de ces cellules ainsi qu'à l'approvisionnement des tumeurs en oxygène par induction de l'angiogenèse. A l'heure actuelle, cette activation dite « alternative » des macrophages tumoraux est encore mal comprise. Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de deux caractéristiques majeures rencontrées au niveau du le microenvironnement tumoral : l'hypoxie cyclique résultant de l'architecture peu fonctionnelle de la microvasculature tumorale et l'inflammation perpétuelle présente au niveau de la tumeur.

Nous avons donc commencé notre recherche par la caractérisation de macrophages M0 incubés en Hch, en Hcy en présence ou non de TNF- α , sur base de l'expression de transcrits en ARNm. Bien que les macrophages tumoraux constituent des populations extrêmement hétérogènes, il est généralement admis que ces macrophages tendent à exprimer des marqueurs de macrophages M2 au contraire des marqueurs M1 qui sont eux bien plus rarement exprimés.

L'étude des marqueurs de macrophages M1 a montré que l'Hch, et l'Hcy tendaient à réduire l'expression des transcrits de CXCL10 alors que la présence de TNF- α au contraire l'augmentait légèrement. Cette chémokine est connue pour favoriser le recrutement de cellules T, des cellules dendritiques et des natural killer et participe ainsi à activer les défenses immunitaires anti-tumorales. L'IL-1 β , le second marqueur M1 étudié, représente la forme sécrétée de l'IL-1. Elle est produite par les macrophages en tant que pro-protéine, qui adopte sa forme active à la suite d'un clivage protéolytique réalisé par la caspase 1. Cette cytokine est un important médiateur de la réponse inflammatoire qui peut être impliquée dans l'apoptose par l'activation de NF- κ B et la voie de signalisation JNK-p38 (Raingeaud et al., 1995). L'expression de cette cytokine ne semble ni affectée par l'Hch ou Hcy, ni par la présence de TNF- α dans le milieu. Un autre médiateur important de l'apoptose est justement le TNF- α . En 1986, Urban et al. ont montré que l'effet cytotoxique de macrophages sur des cellules tumorales UV1591-RE pouvaient être attribué à la libération de TNF- α par les macrophages. De plus, l'utilisation d'anticorps dirigés contre du TNF- α recombinant murin a montré une diminution importante de l'activité cytotoxique de ces macrophages (Urban et al., 1986). Après avoir incubé des macrophages M0 en Hch et en présence de TNF- α , on observe une diminution de l'expression de cette même cytokine. On peut donc dire que l'Hch tend à réduire l'expression de marqueurs M1 (CXCL10 et TNF- α) alors que les effets de l'Hcy et du TNF- α sont moins clairs.

En étudiant l'effet de ces mêmes conditions sur l'expression de marqueurs de macrophages M2, on remarque une diminution de l'expression de CCL18 provoquée par l'Hch et l'Hcy en absence de TNF- α . Cette chémokine est impliquée dans la l'attraction des cellules T naïves qui, dans un environnement riche en macrophages M2 et en cellules dendritiques immatures, conduit à l'anergie du système immunitaire envers les cellules tumorales (Sica et al., 2006).

DISCUSSION, CONCLUSION, PERSPECTIVES

On remarque également que l'Hch, et dans une moindre mesure l'Hcy, augmentent l'expression de l'IL-1R2, de la fibronectine et de MMP-12. L'IL-1R2 est un récepteur à cytokine qui lie l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1R1 et qui inhibe l'activité de ses ligands en agissant comme une proie. En supprimant l'action de l'IL-1 β , l'IL-1R2 atténue ainsi l'activité cytotoxique des macrophages. La fibronectine et MMP-12 sont impliqués dans la réorganisation de la matrice extracellulaire, permettant à la tumeur de se réorganiser. Le fait que l'abondance relative de ces 3 ARNm soit augmentée en Hch et Hcy pourrait donc concorder avec un phénotype de macrophages pro-tumoraux induit par ces deux types d'hypoxie. On observe également que l'expression de l'IL-10 est augmentée par l'Hcy mais également par la présence de TNF- α dans le milieu. Cette cytokine est capable d'inhiber l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IFN- γ et le TNF- α , contribuant à l'anergie du système immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales. Il a également été montré que des stades avancés de cancers du poumon étaient corrélés avec une forte expression en ARNm de l'IL-10 dans les TAMs (Wang et al., 2011). De plus, l'IL-10 est impliquée dans la différenciation des monocytes en macrophages M2 (Sica et al., 2006, McFarland et al., 2013). La sécrétion de cette cytokine par les macrophages pourrait donc agir de manière paracrine sur les monocytes recrutés au sein de la tumeur et les polariser vers un phénotype pro-tumoral. Nous n'avons malheureusement pas pu détecter de sécrétion d'IL-10.

Les trois derniers marqueurs étudiés sont l'IL-6, l'IL-8 et COX-2. L'IL-6 a été identifiée comme un marqueur primordial du cancer, impliqué dans de nombreux processus pro-survie. Des niveaux élevés d'IL-6 ont en effet été corrélés avec une augmentation du risque d'apparition et d'avancement de la maladie (Zarogoulidis et al., 2013). Lors de nos expérimentations, nous avons observé que l'Hch et l'Hcy pouvaient induire l'expression de cette cytokine. Comme nous l'avons vu, l'IL-6 constitue l'activateur majeur de STAT3 (McFarland et al., 2013). L'induction de cette voie induit le développement d'un microenvironnement inflammatoire procarcinogène. En effet, les voies de transductions situées en aval de la signalisation IL-6/STAT3 aboutissent à la transcription de gènes favorisant la croissance et le potentiel métastatique des tumeurs. Parmi ces gènes cibles, on trouve notamment la cycline D1 et Bcl-XL, respectivement impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire, mais aussi MMP-2 et MMP-9 impliqués dans le remodelage matriciel, le VEGF, le bFGF et HIF-1 α responsables de l'activation de l'angiogenèse ainsi que l'IL-10 impliquée dans l'anergie immunitaire (Huang, 2007). Nous n'avons malheureusement pas pu détecter la sécrétion d'IL-6, probablement parce que la quantité libérée est inférieure au seuil de détection de l'ELISA.

L'IL-8 est une molécule chémoattractive pour les leucocytes et est donc un médiateur important de la réponse inflammatoire. L'IL-8 promeut aussi l'angiogenèse via le recrutement de précurseurs endothéliaux. Des études récentes suggèrent que l'utilisation d'IL-8 recombinante induit l'expression de MMP-2 et MMP-9 dans les cellules endothéliales menant à leur migration, leur invasion et l'organisation en tubes capillaires. De plus, l'IL-8 est également impliquée comme facteur de survie dans les cellules endothéliales et comme médiateur clé de l'angiogenèse pour de nombreuses tumeurs, incluant les carcinomes pulmonaires, du colon, de la cavité orale, le sarcome de Kaposi et les mélanomes (Li et al., 2003). A travers l'induction de l'abondance relative en ARNm d'IL-8 dans les macrophages M0, l'Hcy peut donc favoriser la croissance tumorale. Sur base de ces résultats, nous avons donc réalisés un ELISA pour détecter l'IL-8 afin de voir si le profil obtenu en PCR pouvait être extrapolé sur un profil de sécrétion. Nous avons ainsi montré que l'Hcy induisait effectivement la sécrétion de l'IL-8. Cependant, l'induction de la sécrétion protéique est nettement plus faible que l'induction des transcrits en ARNm. Aussi, alors que le profil obtenu en RT-qPCR montre également une induction (plus faible) de l'IL-8 en Hch, on

observe une diminution de sa sécrétion dans cette condition en comparaison avec les macrophages incubés en N. Ces différences pourraient être expliquées par le changement de cinétique utilisé pour la réalisation de l'ELISA.

Le dernier marqueur en ARNm que nous avons étudié, COX-2, est une des enzymes principales impliquées dans la production de prostaglandines. Elle est également connue pour réguler le processus angiogénique et pour être constitutivement exprimée dans différents types de cancers, comme par exemple le cancer colorectal. De plus, il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de COX-2 réduisait le nombre et la taille d'adénomes intestinaux chez des patients atteints de polypose adénomateuse familiale (Nakanishi et al., 2011). L'induction de l'expression de COX-2 dans les macrophages M0 par l'Hch, et dans une moindre mesure par l'Hcy, pourrait donc contribuer à favoriser la progression tumorale.

L'étude fonctionnelle consistant à étudier les effets de milieux conditionnés de macrophages M0 n'a pas permis de montrer l'influence significative de l'un ou l'autre milieu conditionné sur le comportement migratoire de cellules endothéliales (EAhy926) et tumorales (A549), et ce, indépendamment de la durée d'exposition. La viabilité des cellules A549 n'est pas non plus affectée par la présence de ces différents milieux. Nous avons cependant observé une cytotoxicité non-négligeable de ces milieux envers les cellules EAhy926. En réalité, cet effet létal est également visible sur les photographies prises lors des expériences de scratch assay. Cette cytotoxicité n'est cependant pas imputable à l'Hch, Hcy ou même au TNF- α . En effet, le milieu conditionné récupéré à partir de macrophages M0 incubés en N et sans TNF- α présente lui aussi une forte cytotoxicité pour les deux cinétiques étudiées. Ce phénomène trouve donc une autre origine, qui pourrait peut-être être imputable à un épuisement du glucose dans le milieu CO₂-indépendant, épuisement qui serait moins dommageable pour les cellules A549.

2) Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons démontré que l'Hch, l'Hcy et la présence de TNF- α peuvent affecter la polarisation des macrophages. Sur base des quelques transcrits étudiés, nous avons montré que des marqueurs typiques de macrophages M1 tendent à être réprimés en réponse à l'Hch alors que l'Hcy et n'affecte pas de manière significative leur expression. Plusieurs marqueurs M2 ont quant à eux vu leur expression augmenter en réponse à l'Hch et l'Hcy (IL-1R2 ; IL-10 ; Fibronectine ; MMP-12), tandis que d'autres semblent non affectés voire réprimés par ces conditions d'oxygène (CCL18, CCL22). L'expression d'autres marqueurs ARNm typiquement associés au cancer est également induite par l'Hch et l'Hcy (IL-6, IL-10, COX-2). Nous avons également montré que l'Hch et l'Hcy induisent des modifications transcriptomiques bien distinctes. Ces distinctions résident essentiellement dans l'amplitude et non la direction des variations d'expression (répression/induction). Finalement, nous avons montré que la présence de TNF- α dans le milieu régule de manière positive l'expression de l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-10 dans les macrophages M0.

Les études fonctionnelles menées au cours de notre travail n'ont pas pu aboutir à l'obtention d'informations complémentaires. C'est pourquoi, la première perspective à laquelle nous pensons est l'élimination des limites techniques rencontrées au cours de ce travail. Il serait ainsi intéressant de concentrer les milieux conditionnés des macrophages afin de pouvoir étudier les profils de sécrétion de l'IL-6 et de l'IL-10 d'une part, mais également de voir si, des milieux conditionnés plus concentrés peuvent influencer le comportement migratoire et la viabilité des cellules endothéliales et tumorales. Pour y parvenir, les échantillons pourraient

DISCUSSION, CONCLUSION, PERSPECTIVES

être concentrés en utilisant un Centricon. Un dosage du glucose présent dans les milieux conditionnés pourrait également nous indiquer si une pénurie de glucose peut être à l'origine de la cytotoxicité induite par ces milieux envers les cellules endothéliales. Le cas échéant, il conviendrait alors d'ajouter du glucose à ces milieux conditionnés.

Dans un deuxième temps, nous pourrions étendre notre recherche. Dans cette optique, il serait d'abord nécessaire de reconduire l'étude des marqueurs ARNm en triplicats afin d'obtenir des données statistiques solides. Il serait également intéressant d'étendre l'étude transcriptomique à d'autres marqueurs pour obtenir une meilleure information sur le phénotype des macrophages. Pour affiner l'étude fonctionnelle, on pourrait également envisager d'étudier les effets des milieux conditionnés sur la formation de tubes par les cellules endothéliales (endothelial tube formation assay). Des tests de viabilité pourraient aussi être réalisés sur d'autres types cellulaires comme des macrophages (M0, M1 et/ou M2), qui permettrait peut-être d'identifier une stimulation autocrine de ces cellules. Pour finir, il pourrait être intéressant de reconduire ces différentes expériences à partir de macrophages M1 et/ou M2 après caractérisation de ceux-ci. Cela permettrait d'étudier le potentiel de transpolarisation de l'Hch, de l'Hcy ou du TNF- α , c'est-à-dire leur capacité à induire un shift phénotypique des macrophages M1 en macrophages M2 et/ou vice-versa. L'ensemble de ces résultats permettrait de mieux comprendre le rôle joué par le microenvironnement tumoral dans la croissance des tumeurs.

V. BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- AUGUSTE, P., LEMIERE, S., LARRIEU-LAHARGUE, F. & BIKFALVI, A. 2005. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol*, 54, 53-61.
- BALKWILL, F. & MANTOVANI, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357, 539-45.
- BAYER, C. & VAUPEL, P. 2012. Acute versus chronic hypoxia in tumors: Controversial data concerning time frames and biological consequences. *Strahlenther Onkol*, 188, 616-27.
- BINGLE, L., BROWN, N. J. & LEWIS, C. E. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*, 196, 254-65.
- BOSCO, M. C., PUPPO, M., BLENGIO, F., FRAONE, T., CAPPELLO, P., GIOVARELLI, M. & VARESI, L. 2008. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology*, 213, 733-49.
- BRADLEY, J. R. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*, 214, 149-60.
- BROWN, J. M. 1979. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol*, 52, 650-6.
- BROWN, J. M. & GIACCIA, A. J. 1998. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*, 58, 1408-16.
- BUTTGEREIT, F. & BRAND, M. D. 1995. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J*, 312 (Pt 1), 163-7.
- CABAL-HIERRO, L. & LAZO, P. S. 2012. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*, 24, 1297-305.
- CARMELIET, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9, 653-60.
- CARMELIET, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438, 932-6.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-57.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473, 298-307.
- CHAPLIN, D. J., DURAND, R. E. & OLIVE, P. L. 1986. Acute hypoxia in tumors: implications for modifiers of radiation effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 12, 1279-82.
- COFFELT, S. B., HUGHES, R. & LEWIS, C. E. 2009. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta*, 1796, 11-8.
- CONDEELIS, J. & SEGALL, J. E. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*, 3, 921-30.
- DE SPIEGELAERE, W., CASTELEYN, C., VAN DEN BROECK, W., PLENDL, J., BAHRAMSOLTANI, M., SIMOENS, P., DJONOV, V. & CORNILLIE, P. 2012. Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *J Vasc Res*, 49, 390-404.

BIBLIOGRAPHIE

- DEB, A., SKELDING, K. A., WANG, S., REEDER, M., SIMPER, D. & CAPLICE, N. M. 2004. Integrin profile and in vivo homing of human smooth muscle progenitor cells. *Circulation*, 110, 2673-7.
- DEGEN, W. G., PRUIJN, G. J., RAATS, J. M. & VAN VENROOIJ, W. J. 2000. Caspase-dependent cleavage of nucleic acids. *Cell Death Differ*, 7, 616-27.
- DERY, M. A., MICHAUD, M. D. & RICHARD, D. E. 2005. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 535-40.
- DEWHIRST, M. W. 2007. Intermittent hypoxia furthers the rationale for hypoxia-inducible factor-1 targeting. *Cancer Res*, 67, 854-5.
- ELSASSER-BEILE, U., KOLBLE, N., GRUSSENMEYER, T., WETTERAUER, U. & SCHULTZE-SEEMANN, W. 1998. Correlation of clinical and immunological parameters of metastatic renal cell carcinoma patients undergoing therapy with interleukin 2, interferon-alpha and retinoic acid. *Anticancer Res*, 18, 1883-90.
- FAN, Y., MAO, R. & YANG, J. 2013. NF-kappaB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*, 4, 176-85.
- FOLKMAN, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285, 1182-6.
- FURUYA, M., NISHIYAMA, M., KASUYA, Y., KIMURA, S. & ISHIKURA, H. 2005. Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vasc Health Risk Manag*, 1, 277-90.
- GIACCIA, A. J., SIMON, M. C. & JOHNSON, R. 2004. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev*, 18, 2183-94.
- GIAVAZZI, R., GAROFALO, A., BANI, M. R., ABBATE, M., GHEZZI, P., BORASCHI, D., MANTOVANI, A. & DEJANA, E. 1990. Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice. *Cancer Res*, 50, 4771-5.
- GOEL, S., DUDA, D. G., XU, L., MUNN, L. L., BOUCHER, Y., FUKUMURA, D. & JAIN, R. K. 2011. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev*, 91, 1071-121.
- GORDON, S. & MARTINEZ, F. O. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32, 593-604.
- GORELIK, E., WILTROUT, R. H., BRUNDA, M. J., HOLDEN, H. T. & HERBERMAN, R. B. 1982. Augmentation of metastasis formation by thioglycollate-elicited macrophages. *Int J Cancer*, 29, 575-81.
- GUPTA, M. K. & QIN, R. Y. 2003. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol*, 9, 1144-55.
- HANAHAN, D. & FOLKMAN, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-64.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.

BIBLIOGRAPHIE

- HENDRIX, M. J., SEFTOR, E. A., HESS, A. R. & SEFTOR, R. E. 2003. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*, 3, 411-21.
- HEUSINKVELD, M. & VAN DER BURG, S. H. 2011. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med*, 9, 216.
- HILLEN, F. & GRIFFIOEN, A. W. 2007. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev*, 26, 489-502.
- HOCKEL, M., KNOOP, C., SCHLENGER, K., VORNDRAN, B., BAUSSMANN, E., MITZE, M., KNAPSTEIN, P. G. & VAUPEL, P. 1993. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol*, 26, 45-50.
- HOCKEL, M., SCHLENGER, K., ARAL, B., MITZE, M., SCHAFFER, U. & VAUPEL, P. 1996. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*, 56, 4509-15.
- HOLASH, J., MAISONPIERRE, P. C., COMPTON, D., BOLAND, P., ALEXANDER, C. R., ZAGZAG, D., YANCOPOULOS, G. D. & WIEGAND, S. J. 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 284, 1994-8.
- HSU, H., HUANG, J., SHU, H. B., BAICHWAL, V. & GOEDDEL, D. V. 1996. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, 4, 387-96.
- HUSSAIN, S. P., HOFSETH, L. J. & HARRIS, C. C. 2003. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, 276-85.
- JAIN, R. K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*, 9, 685-93.
- KALTHOFF, H., ROEDER, C., BROCKHAUS, M., THIELE, H. G. & SCHMIEGEL, W. 1993. Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. *J Biol Chem*, 268, 2762-6.
- KE, Q. & COSTA, M. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, 70, 1469-80.
- KIDA, Y., KOBAYASHI, M., SUZUKI, T., TAKESHITA, A., OKAMATSU, Y., HANAZAWA, S., YASUI, T. & HASEGAWA, K. 2005. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine*, 29, 159-68.
- KITADAI, Y. 2010. Angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer. *J Oncol*, 2010, 468725.
- KREIDER, T., ANTHONY, R. M., URBAN, J. F., JR. & GAUSE, W. C. 2007. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol*, 19, 448-53.
- LEE, J. W., BAE, S. H., JEONG, J. W., KIM, S. H. & KIM, K. W. 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*, 36, 1-12.
- LEWIS, C. E. & POLLARD, J. W. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*, 66, 605-12.

BIBLIOGRAPHIE

- LORUSSO, G. & RUEGG, C. 2008. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*, 130, 1091-103.
- MANIOTIS, A. J., FOLBERG, R., HESS, A., SEFTOR, E. A., GARDNER, L. M., PE'ER, J., TRENT, J. M., MELTZER, P. S. & HENDRIX, M. J. 1999. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*, 155, 739-52.
- MANTOVANI, A. & SICA, A. 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*, 22, 231-7.
- MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A. & LOCATI, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25, 677-86.
- MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P. & SICA, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23, 549-55.
- MARTINIVE, P., DEFRESNE, F., BOUZIN, C., SALIEZ, J., LAIR, F., GREGOIRE, V., MICHIELS, C., DESSY, C. & FERON, O. 2006. Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer Res*, 66, 11736-44.
- MCDONALD, D. M. & CHOYKE, P. L. 2003. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med*, 9, 713-25.
- MICHIELS, C. 2004. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol*, 164, 1875-82.
- MURDOCH, C. & LEWIS, C. E. 2005. Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *Int J Cancer*, 117, 701-8.
- OSBORN, L., KUNKEL, S. & NABEL, G. J. 1989. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2336-40.
- PEREIRA, K. M., CHAVES, F. N., VIANA, T. S., CARVALHO, F. S., COSTA, F. W., ALVES, A. P. & SOUSA, F. B. 2013. Oxygen metabolism in oral cancer: HIF and GLUTs (Review). *Oncol Lett*, 6, 311-316.
- PLATE, K. H., SCHOLZ, A. & DUMONT, D. J. 2012. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol*, 124, 763-75.
- POTENTE, M., GERHARDT, H. & CARMELIET, P. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146, 873-87.
- QIN, H., WILSON, C. A., LEE, S. J., ZHAO, X. & BENVENISTE, E. N. 2005. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood*, 106, 3114-22.
- RAKOFF-NAHOUM, S. 2006. Why cancer and inflammation? *Yale J Biol Med*, 79, 123-30.

BIBLIOGRAPHIE

- ROLNY, C., CAPPARUCCIA, L., CASAZZA, A., MAZZONE, M., VALLARIO, A., CIGNETTI, A., MEDICO, E., CARMELIET, P., COMOGLIO, P. M. & TAMAGNONE, L. 2008. The tumor suppressor semaphorin 3B triggers a prometastatic program mediated by interleukin 8 and the tumor microenvironment. *J Exp Med*, 205, 1155-71.
- RUAS, J. L. & POELLINGER, L. 2005. Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator. *Semin Cell Dev Biol*, 16, 514-22.
- SANTEE, S. M. & OWEN-SCHAUB, L. B. 1996. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *J Biol Chem*, 271, 21151-9.
- SELLIER, H., REBILLARD, A., GUETTE, C., BARRE, B. & COQUERET, O. 2013. How should we define STAT3 as an oncogene and as a potential target for therapy? *JAKSTAT*, 2, e24716.
- SEMENZA, G. L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3, 721-32.
- SEMENZA, G. L. 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*, 20, 51-6.
- SEMENZA, G. L. 2012. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 33, 207-14.
- SHERMAN, M. H., DOWNES, M. & EVANS, R. M. 2012. Nuclear receptors as modulators of the tumor microenvironment. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5, 3-10.
- SHISHODIA, S. & AGGARWAL, B. B. 2002. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol*, 35, 28-40.
- SICA, A. & BRONTE, V. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*, 117, 1155-66.
- SICA, A. & MANTOVANI, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, 122, 787-95.
- SICA, A., SCHIOPPA, T., MANTOVANI, A. & ALLAVENA, P. 2006. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*, 42, 717-27.
- SOLINAS, G., GERMANO, G., MANTOVANI, A. & ALLAVENA, P. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*, 86, 1065-73.
- SOLINAS, G., MARCHESI, F., GARLANDA, C., MANTOVANI, A. & ALLAVENA, P. 2010. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 29, 243-8.
- STEIDL, C., LEE, T., SHAH, S. P., FARINHA, P., HAN, G., NAYAR, T., DELANEY, A., JONES, S. J., IQBAL, J., WEISENBURGER, D. D., BAST, M. A., ROSENWALD, A., MULLER-HERMELINK, H. K., RIMSZA, L. M., CAMPO, E., DELABIE, J., BRAZIEL, R. M., COOK, J. R., TUBBS, R. R., JAFFE, E. S., LENZ, G., CONNORS, J. M., STAUDT, L. M., CHAN, W. C. & GASCOYNE, R. D. 2010. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 362, 875-85.

BIBLIOGRAPHIE

- STEINMAN, R. M. & IDOYAGA, J. 2010. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*, 234, 5-17.
- TAKEUCHI, M., ROTHE, M. & GOEDEL, D. V. 1996. Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem*, 271, 19935-42.
- THOMLINSON, R. H. & GRAY, L. H. 1955. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer*, 9, 539-49.
- TOFFOLI, S., FERON, O., RAES, M. & MICHIELS, C. 2007. Intermittent hypoxia changes HIF-1alpha phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1alpha. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1558-71.
- TOFFOLI, S. & MICHIELS, C. 2008. Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *FEBS J*, 275, 2991-3002.
- TOFFOLI, S., ROEGIERS, A., FERON, O., VAN STEENBRUGGE, M., NINANE, N., RAES, M. & MICHIELS, C. 2009. Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis*, 12, 47-67.
- VAJKOCZY, P., BLUM, S., LAMPARTER, M., MAILHAMMER, R., ERBER, R., ENGELHARDT, B., VESTWEBER, D. & HATZOPOULOS, A. K. 2003. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med*, 197, 1755-65.
- VAUPEL, P. 2004. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol*, 14, 198-206.
- VAUPEL, P., KELLEHER, D. K. & HOCKEL, M. 2001. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol*, 28, 29-35.
- WATERS, J. P., POBER, J. S. & BRADLEY, J. R. 2013. Tumour necrosis factor and cancer. *J Pathol*, 230, 241-8.
- WINZEN, R., WALLACH, D., ENGELMANN, H., NOPHAR, Y., BRAKEBUSCH, C., KEMPER, O., RESCH, K. & HOLTSMANN, H. 1992. Selective decrease in cell surface expression and mRNA level of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor during differentiation of HL-60 cells into macrophage-like but not granulocyte-like cells. *J Immunol*, 148, 3454-60.
- WINZEN, R., WALLACH, D., KEMPER, O., RESCH, K. & HOLTSMANN, H. 1993. Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1. *J Immunol*, 150, 4346-53.
- YUAN, G., NANDURI, J., BHASKER, C. R., SEMENZA, G. L. & PRABHAKAR, N. R. 2005. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J Biol Chem*, 280, 4321-8.
- YUE, Z. Q., LIU, Y. P., RUAN, J. S., ZHOU, L. & LU, Y. 2012. Tumor-associated macrophages: a novel potential target for cancer treatment. *Chin Med J (Engl)*, 125, 3305-11.

