



HAL
open science

Rôle du monoxyde d'azote dans la reconnaissance cellulaire : étude d'un modèle endothélial lié au mélanome

Aude Sélo Sélo-Carreau

► **To cite this version:**

Aude Sélo Sélo-Carreau. Rôle du monoxyde d'azote dans la reconnaissance cellulaire : étude d'un modèle endothélial lié au mélanome. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2010. Français. NNT : 2010ORLE2028 . tel-00585128

HAL Id: tel-00585128

<https://theses.hal.science/tel-00585128>

Submitted on 11 Apr 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

CENTRE DE BIOPHYSIQUE MOLECULAIRE

THÈSE présentée par

Aude SÉLO-CARREAU

soutenue le **12 octobre 2010**

pour obtenir le grade de **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

**ROLE DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LA MODULATION DE LA RECONNAISSANCE
CELLULAIRE: ETUDE D'UN MODELE ENDOTHELIAL LIE AU MELANOME.**

THÈSE dirigée par :

Catherine GRILLON

Chargée de recherche CNRS, CBM

RAPPORTEURS :

Monique DAVID-DUFILHO

Chargée de recherche, UPMC

Jorge DOMENECH

Professeur de l'université de Tours

MEMBRES DU JURY :

Chantal PICHON

Professeur de l'université d'Orléans, Présidente du jury

Monique DAVID-DUFILHO

Chargée de recherche, UPMC

Jorge DOMENECH

Professeur de l'université de Tours

Catherine GRILLON

Chargée de recherche CNRS, CBM

Claudine KIEDA

Directeur de recherche CNRS, CBM

Pascale PAUL

Chargée de recherche INSERM, Université de Marseille

Je prends ma plus belle plume pour écrire ces quelques mots. Je tiens cependant à m'excuser si les mots sont maladroits, les sentiments sont pour moi souvent difficiles à retranscrire : je ne suis pas et ne serai jamais une grande écrivaine. Alors sans plus de cérémonie,

je tiens à remercier

Monsieur le Professeur Jean-Claude Beloeil de m'avoir accueillie au sein du Centre de Biophysique Moléculaire pour y effectuer ma thèse.

Madame le Docteur Catherine Grillon, directrice de cette thèse, qui m'a permis de la réaliser dans les meilleures conditions. Au jour le jour, vous avez été là, pour m'écouter, m'orienter, me remotiver, me supporter et corriger mes erreurs ... même tout le long de votre maladie. Vous avez fait plus que votre travail et pour cela je vous en remercie profondément.

Madame le Docteur Claudine Kieda qui m'a acceptée dans son équipe de recherche. Merci pour votre foultitude d'idées et de conseils, qui m'ont bien souvent permis d'avancer. Votre optimiste débordant a contrebalancé mon grand pessimisme.

Monsieur le Professeur Jorge Domenech et madame le Docteur Monique Dufilho, qui m'ont fait l'honneur de juger et de rapporter ce travail de thèse. Je les remercie pour le temps qu'ils ont consacré à ce travail.

Monsieur le Docteur Willy Gosgnach, mon maître de stage de Master 2, ou Doc'. Tu es devenu peu à peu mon mentor. Tu m'as donné l'envie de continuer dans la recherche et le NO[•] et tu m'as même aidée quand j'en ai eu besoin lors de cette thèse. J'ai enfin réussi à inventer quelque chose qui marche ... enfin presque !, donc Merci.

Michèle, Alan, Aurore et maintenant Fabienne : les gardiens de nos précieuses cellules. Vous avez été aussi précieux pour moi et mon travail que les cellules, car vous avez toujours été disponibles pour m'aider.

David, le maître de la cytométrie, qui m'a appris à me servir de tous les appareils du laboratoire. Merci de n'avoir que soupiré et jamais rouspété, à chaque fois que je t'ai appelé en catastrophe parce que j'avais un problème.

Le personnel de l'équipe de P05 des maladies cardiovasculaires de l'Institut de Recherche Servier pour m'avoir permis de réaliser plusieurs manips importantes en ayant accès à votre matériel et votre expérience. Merci au Docteur Marie-Pierre Bourguignon, au Docteur Nicole Villeneuve, à Nathalie Carpentier et Cyril Briant.

Toutes les personnes du laboratoire avec qui j'ai travaillé, manipulé, discuté, bu un thé, rigolé... et toujours dans la bonne humeur. Je pense plus particulièrement à Emilie, Stéphane, Aneta, Guillaume, Sabrina, Nathalie, Bouchra et à tous les stagiaires.

De façon plus personnelle, mes parents qui m'ont toujours encouragée dans mes projets. Promis on se verra un peu plus maintenant.

Mes sœurs qui m'ont ouvert la voie. Votre petite sœur deviendra grande, un jour, et j'espère que vous serez aussi fière d'elle qu'elle l'est de vous.

Ma Lana et Maïlys, juste par leurs sourires et câlins me font voir la vie rose.

Mes amis, les meilleurs, avec qui je passe toujours de très bons moments et qui m'ont fait sortir lors des coups de blues.

Enfin, je dédie ce travail à mon Homme, Guillaume. Malgré tout ce que je te fais subir, tu es toujours là à côté de moi, à m'encourager et à me montrer que j'en suis capable. Merci de m'avoir, des fois, posée devant l'ordi pour que je travaille. J'espère que ces 4 années difficiles ne sont que le vinaigre des 40 prochaines années mielleuses. Si j'en suis là, c'est grâce à toi...

PLAN

ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION	13
GENERALITES.....	16
1. LE MODELE DU MELANOME.....	16
2. L'ANGIOGENESE TUMORALE	18
a. Découverte de l'angiogenèse et généralités	18
i. Présentation	18
ii. Historique	18
b. Les étapes de l'angiogenèse tumorale au niveau cellulaire	19
i. L'état quiescent des cellules endothéliales	19
ii. Dormance des tumeurs	20
iii. Définitions relatives à l'hypoxie et la normoxie	21
iv. Activation de l'angiogenèse	21
v. Migration des cellules endothéliales vers la tumeur.....	22
vi. Formation des vaisseaux et stabilisation	23
vii. Les acteurs cellulaires « secondaires »	25
c. Les étapes de l'angiogenèse tumorale au niveau moléculaire	25
i. Induction d'une hypoxie intratumorale	26
ii. Le facteur inductible par l'hypoxie (hypoxia inducible factor, HIF1).....	27
iii. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)	27
iv. Le monoxyde d'azote (Nitric Oxide, NO [*])	28
v. Les angiopoïétines (ANGPT).....	29
vi. Le facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast growth factor, FGF)	29
vii. Les métalloprotéinases de la matrice (Matrix metalloproteases, MMP)	29
viii. Les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse	30
d. Les molécules d'adhésion impliquées dans l'angiogenèse.....	30
i. PECAM-1/CD31	31
ii. ICAM-1/CD54	31
iii. VE-cadhérine/CD144.....	32
iv. Intégrines	32
3. LA REPOSE IMMUNITAIRE	35
a. Présentation	35
b. L'adhésion des leucocytes	35
i. Capture et roulement des leucocytes sur la paroi endothéliale	36
ii. Activation pour l'arrêt des leucocytes.....	36
iii. Roulement lent, arrêt et adhésion ferme.....	37

iv. La diapédèse au travers de l'endothélium	37
<i>Le parcours intercellulaire</i>	37
<i>Le parcours transcellulaire</i>	38
<i>Passage de la lame basale</i>	39
c. Les molécules d'adhésion de la réponse immunitaire	39
i. Les sélectines	40
ii. CD34.....	41
iii. ICAM-1/CD54	41
iv. VCAM-1/CD106.....	41
v. ICAM-2/CD102	42
vi. PECAM-1/CD31	42
vii. Molécules d'adhésion des jonctions (Junctional Adhesion Molecules, JAM).....	42
viii. CD99.....	43
d. Les récepteurs de chimiokines et glycosaminoglycannes de la réponse immune	43
i. Les chimiokines et leurs récepteurs	43
<i>Le récepteur CCR5 et ses ligands</i>	44
<i>Le récepteur CCR7 et ses ligands, 6Ckine et MIP-3β</i>	45
<i>Le récepteur CX₃CR1 et son ligand, la fractalkine</i>	45
<i>Le récepteur CXCR4 et son ligand, SDF-1</i>	46
ii. Les glycosaminoglycannes (GAG)	46
<i>La Chondroïtine Sulfate (CS)</i>	47
<i>L'Héparanne Sulfate (HS)</i>	47
4. LE MONOXYDE D'AZOTE (NO[•]).....	49
a. Présentation	49
b. Synthèse du NO[•]	49
c. NO Synthèses.....	50
i. Généralités.....	50
ii. Les différentes isoformes	52
<i>NOS1 ou nNOS</i>	52
<i>NOS2 ou iNOS</i>	52
<i>NOS3 ou eNOS</i>	53
d. Mécanismes moléculaires de l'action du NO[•]	56
i. Effets directs du NO [•]	56
ii. Effets dépendants des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote.....	57
e. Les fonctions physiologiques du NO[•].....	58
i. Dans le système vasculaire	58
ii. Dans le système immunitaire	58
iii. Dans le système nerveux	59
f. NO[•] et cancer.....	59
i. Production du NO [•] dans les tumeurs	59
ii. Rôle du NO [•] dans le développement d'un cancer.....	59
<i>NO[•] et initiation de la tumeur</i>	60
<i>NO[•] et angiogenèse</i>	60
<i>NO[•] et flux sanguin</i>	61

<i>NO[•], invasion et métastases</i>	61
<i>NO[•] et réponse immunitaire</i>	61
<i>NO[•] et apoptose</i>	61
<i>Résistance au NO[•]</i>	62
iii. Utilisation thérapeutique du NO [•] dans le cadre du cancer.....	62
<i>Thérapie par augmentation du NO[•]</i>	62
<i>Thérapie par diminution du NO[•]</i>	64
MATERIEL & METHODES	67
1. LE MODELE CELLULAIRE	67
a. Les cellules endothéliales	67
b. Les cellules lymphoïdes CEMT4.....	67
c. Les cellules tumorales	67
2. LA CULTURE CELLULAIRE	67
3. TRAITEMENTS PAR LES DONNEURS DE NO[•]	68
4. L'HYPOXIE	70
5. LE MICROSCOPE A FLUORESCENCE	70
6. ANALYSE DES ARN MESSAGERS	72
7. EXPRESSION DE PROTEINES	74
a. Par cytométrie en flux	74
b. Par Western Blot.....	75
8. DOSAGE DU GMP_c	77
9. CYTOTOXICITE	78
10. DETECTION DE L'APOPTOSE	78
11. L'ANGIOGENESE	79
12. ADHESION	80
a. Adhésion en conditions statiques	81
b. Adhésion en conditions de flux.....	82
13. MIGRATION CELLULAIRE	83
a. Cicatrisation.....	83
b. Technique des inserts.....	83
14. ANALYSES STATISTIQUES	84
RESULTATS & DISCUSSION	87
1. LES LIGNEES ENDOTHELIALES	87
a. Présentation	87
b. Morphologie	88
c. Angiogenèse	89

d.	Les molécules de surface	90
e.	La voie du NO[•]	92
i.	Les enzymes de production du NO [•] : les NO Synthases	92
	<i>Expression des ARNm</i>	92
	<i>Expression protéique</i>	93
ii.	La production de NO [•]	93
iii.	Discussion sur l'étude de la voie du NO [•]	95
2.	EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES UTILISEES POUR L'ETUDE.....	96
a.	Evaluation de la toxicité cellulaire.....	96
b.	Evaluation de l'apoptose	99
c.	Conclusion sur la toxicité et l'apoptose induites par le NO[•]	101
3.	NO[•] & ANGIOGENÈSE.....	102
a.	Effet du NO[•] sur la formation de pseudo-vaisseaux	102
i.	Effet d'un apport de NO [•] exogène par les NONOates sur l'angiogenèse.....	103
ii.	Effet du NO [•] endogène sur l'angiogenèse.....	105
iii.	Conclusion sur l'impact du NO [•] sur l'angiogenèse	109
b.	Effet du NO[•] sur la migration cellulaire.....	110
i.	La migration cellulaire évaluée par la technique de cicatrisation	110
ii.	La migration à travers des inserts.....	112
iii.	Conclusion sur l'effet du NO [•] sur la migration des cellules endothéliales	114
c.	Effet du NO[•] sur les interactions cellulaires CE-CE.....	114
i.	Evaluation de l'adhésion entre les cellules endothéliales.....	114
ii.	Expression des molécules de surface	116
	<i>En présence d'un donneur de NO[•]</i>	116
	<i>En hypoxie.....</i>	118
iii.	Conclusion sur le rôle du NO [•] dans les interactions cellulaires lors de l'angiogenèse.....	120
d.	Discussion générale sur le rôle du NO[•] dans l'angiogenèse	121
i.	Bilan	121
ii.	Discussion sur l'effet du NO [•] sur l'angiogenèse	122
4.	NO[•] & RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE.....	126
a.	Effet du NO[•] sur la reconnaissance leucocytes-endothélium	126
i.	Interactions entre leucocytes et cellules endothéliales	126
	<i>En condition statique.....</i>	126
	<i>En condition dynamique</i>	128
	<i>Conclusion sur l'effet du NO[•] sur l'adhésion des CEMT4 sur les cellules endothéliales...</i>	130
ii.	Les molécules de surface de la reconnaissance leucocytaire.....	130
	<i>Etude des molécules impliquées dans le recrutement.....</i>	130
	<i>En présence d'un donneur de NO[•]</i>	132
	<i>En hypoxie.....</i>	134
iii.	Bilan des résultats.....	136
iv.	Discussion sur la modulation du recrutement leucocytaire par le NO [•]	138
b.	L'activation du recrutement des leucocytes par les chimiokines	140
i.	Les récepteurs de chimiokines	141

ii. Les glycosaminoglycannes	143
<i>En présence de donneurs de NO[•]</i>	143
<i>En hypoxie</i>	145
iii. Bilan des résultats.....	147
iv. Discussion sur les modulations d'expression des récepteurs de chimiokines par le NO [•] ..	148
c. Conclusion sur l'impact du NO[•] lors du recrutement leucocytaire	151
CONCLUSION GENERALE	153
BIBLIOGRAPHIE	158
ANNEXE 1: SOLUTIONS UTILISEES	174
ANNEXE 2: PUBLICATION « Nitric oxide modulates endothelial cell adhesion molecule expression involved in angiogenesis and leukocyte recruitment »	175
ANNEXE 3: REVUE « Why is the partial oxygen pressure of human tissue a crucial parameter? »	189
ANNEXE 4: COLLABORATION A PUBLICATION, EN REVISION « CD133 positive progenitor endothelial cell lines from human cord blood »	224

ABRÉVIATIONS

Cette liste comporte les abréviations ayant plusieurs occurrences dans ce manuscrit. Les autres abréviations sont explicitées directement dans le texte.

1400w	N-(3-(aminométhyl)benzyl)acetamide
aa	acide aminé
AC	adénylate cyclase
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ANGPT	angiopoïétine
ARN	acide ribonucléique
BH₄	tetrahydrobiopterine
BSA	sérum albumine bovine <i>bovine serum albumin</i>
CaM	Calmoduline
CAM	molécule d'adhésion cellulaire <i>cell adhesion molecule</i>
CE	cellule endothéliale
CEM	cellule endothéliale microvasculaire
CS	Chondroïtine Sulfate
DPTA-NONOate	dipropylenetriamine NONOate
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERK	<i>extracellular-signal-regulated protein kinase</i>
ESL1	ligand 1 de la E-sélectine <i>E-selectin ligand1</i>
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FAK	kinases de l'adhésion focale <i>focal adhesion kinase</i>
FGF	facteur de croissance des fibroblastes <i>Fibroblast growth factor</i>
FMN	Flavine mononucléotide
GAG	glycosaminoglycane
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTN	trinitrate de glycérol <i>glycéryl trinitrate</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HIF	Facteur inductible par l'hypoxie <i>hypoxia inducible factor</i>
HMG-CoA	hydroxyméthylglutaryl coenzyme A
HPLNEC.B3	Cellule endothéliale microvasculaire de ganglion lymphatique périphérique humain, clone B3 <i>human peripheral lymph node endothelial cell, B3 clone</i>

HRE	élément de réponse à l'hypoxie <i>hypoxia responsive element</i>
HS	héparane Sulfate
HSkMEC	Cellule endothéliale microvasculaire de peau humaine <i>human skin microvascular endothelial cell</i>
HUVEC	Cellule endothéliale de veine ombilicale humaine <i>human umbilical vein endothelial cell</i>
IBMX	isobutylmethylxanthine
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
JAK-STAT	<i>Janus kinase - Signal Transducers and Activator of Transcription</i>
JAM	molécules d'adhésion des jonctions <i>Junctional Adhesion Molecules</i>
L-NAME	N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester
L-NNA	N(G)-nitro-L-arginine
LPA	acide lysophosphatidique <i>Lysophosphatidic acid</i>
LPS	lipopolysaccharide
MEC	matrice extracellulaire
MMP	métalloprotéase de la matrice <i>matrix metalloproteinase</i>
N₂O₃	trioxyde d'azote
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	lymphocyte tueur naturel <i>natural killer</i>
NO[•]	radical monoxyde d'azote <i>nitric oxide</i>
NO₂	dioxyde d'azote
NO₂⁻	nitrite
NO₂⁺	cation nitronium
NO₃⁻	nitrate
NOS	monoxyde d'azote synthétase <i>Nitric oxide synthase</i>
O₂⁻	anion superoxyde
OH⁻	anion hydroxyle
OH[•]	radical hydroxyle
ONOO⁻	peroxynitrite
PBS	tampon phosphate salin <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	réaction en chaîne par polymérase <i>polymerase chain reaction</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PI3k	phosphoinositide 3-kinase

PK	protéine kinase
PL	phospholipase
PO₂	pression partielle en oxygène
PSGL1	ligand 1 de la P-sélectine <i>P-selectin glycoprotein ligand1</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normally T-Expressed, and presumably Secreted</i>
RGP	phase de croissance radiale <i>radial-growth-phase</i>
RNS	dérivé réactif de l'azote <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	dérivé réactif de l'oxygène <i>reactive oxygen species</i>
SDF	Facteur dérivé des cellules stromales <i>stromal cell derived factor</i>
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamine
SNP	sodium nitroprusside
SVF	sérum de veau fœtal
TAM	Macrophages associés aux tumeurs <i>tumor-associated macrophages</i>
Tdt	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF	facteur de croissance transformant <i>Transforming growth factor</i>
Tie	<i>tyrosine kinase with immunoglobuline and epidermal growth factor homology domains</i>
TNF	facteur de nécrose tumorale <i>tumor necrosis factor</i>
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
VCAM	<i>vascular cellular adhesion molecule</i>
VEGF	facteur de croissance vasculaire endothélial <i>vascular endothelial growth factor</i>
VGP	stade de croissance verticale <i>vertical-growth-phase</i>
VHL	von Hippel Lindau
VVO	organelle vésiculo-vacuolaire <i>vesiculo-vacuolar organelle</i>

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Pour une majorité de français, le cancer est une des maladies les plus graves. Ils évaluent sa gravité loin devant le sida et les maladies cardiovasculaires¹. Cette inquiétude est justifiée puisque c'est la première cause de mortalité en France (145 500 décès en 2008)².

Le cancer est caractérisé par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu de l'organisme. Le plus souvent, un réseau vasculaire se forme autour de la tumeur par angiogenèse, phénomène nécessaire pour nourrir et oxygéner les cellules cancéreuses. Une des stratégies actuelles de thérapies vise à empêcher l'angiogenèse tumorale en bloquant les signaux pro-angiogéniques, tels que le facteur de croissance vasculaire endothélial (Vascular Endothelial Growth Factor VEGF)³. Une autre consiste à « normaliser » les vaisseaux sanguins tumoraux, souvent chaotiques, pour améliorer la diffusion des chimiothérapies⁴. Ce principe est étudié au laboratoire dans le cas du mélanome, en utilisant comme agent normalisant le myo-inositol trispyrophosphate, effecteur allostérique de l'hémoglobine⁵ (études en cours au laboratoire). Ces thérapies sont hautement efficaces car elles ciblent le réseau vasculaire. En effet, les micro-vaisseaux sanguins entourant la tumeur, et plus précisément l'endothélium, sont l'interface de communication de la tumeur avec son environnement. C'est aussi le point commun d'un grand nombre de tumeurs solides. L'endothélium est impliqué:

- lors de l'angiogenèse : le réseau vasculaire est détourné pour nourrir la tumeur,
- lors de réactions immunitaires contre la tumeur ; la diapédèse des leucocytes à travers l'endothélium est inhibée,
- lors de la formation de métastases : les cellules tumorales traversent la paroi des vaisseaux pour envahir un nouvel organe.

La reconnaissance entre les cellules endothéliales (CE) et les autres types cellulaires est un mécanisme clef de ces trois processus.

Le monoxyde d'azote (NO[•]) est un des acteurs principaux de la progression tumorale. Premièrement, il est synthétisé par plusieurs types cellulaires impliqués dans les processus cancéreux : les CEs, les cellules tumorales et les macrophages. Deuxièmement, sa production est augmentée lorsque la tumeur est en hypoxie⁶ ou anoxie⁷. Troisièmement, lors de l'angiogenèse tumorale, il participe à la formation des vaisseaux mais son rôle précis reste encore flou. Quatrièmement, lorsqu'il est produit en forte concentration par les leucocytes, le NO[•] a normalement un rôle bactéricide. Cependant, il serait à l'origine du dérèglement des réactions immunitaires contre une tumeur.

Tenant compte de l'importance du NO[•] lors d'un cancer, nous avons étudié son rôle sur la reconnaissance cellulaire avec l'endothélium. Nous avons choisi comme modèle les cellules endothéliales microvasculaires (CEMs) de peau et de ganglions lymphatiques périphériques, tissus impliqués dans le mélanome. Les effets du NO[•] sur l'angiogenèse et les mécanismes du recrutement leucocytaire, deux mécanismes basés sur les interactions cellulaires, ont été analysés. Pour cette étude, nous avons modulé les concentrations cellulaires de NO[•] par ajout de NO[•] exogène ou d'inhibiteurs de NO synthases (NOS). Puis nous avons comparé les effets cellulaires et moléculaires du NO[•] avec ceux de l'hypoxie, mime de l'environnement tumoral et activateur de la production de NO[•] endogène.

La première partie de ce manuscrit développera des généralités sur le mélanome, l'angiogenèse tumorale, le recrutement leucocytaire et le NO[•]. Les résultats seront présentés en 4 parties :

- une présentation des lignées endothéliales montrera leurs différences selon leur organe d'origine et leur statut vis-à-vis du NO[•] et des NOS,
- les expérimentations qui ont permis de déterminer les conditions d'utilisation de toutes les molécules exogènes seront analysées,
- l'étude précise du rôle du NO[•] lors de chaque étape de l'angiogenèse tumorale sera réalisée,
- les effets cellulaires et moléculaires du NO[•] lors du recrutement leucocytaire seront considérés.

Une conclusion générale fera le bilan de ce travail en replaçant cette étude dans le contexte du mélanome et se terminera sur les perspectives envisagées.

GENERALITES

GENERALITES

1. LE MODELE DU MELANOME

Le mélanome est le cancer de la peau le plus rare (derrière le carcinome baso-cellulaire et le carcinome spino-cellulaire), mais celui qui cause le plus de mortalité. En effet, le mélanome comptabilise 132 000 nouveaux cas par an dans le monde et 80% des décès par cancer de la peau, selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Il est dû à une croissance incontrôlée des cellules pigmentaires : les mélanocytes⁸.

La peau est constituée de plusieurs types cellulaires localisés dans l'épiderme : kératinocytes, mélanocytes, cellules de Langerhans et cellules de Merkel (Figure 1).

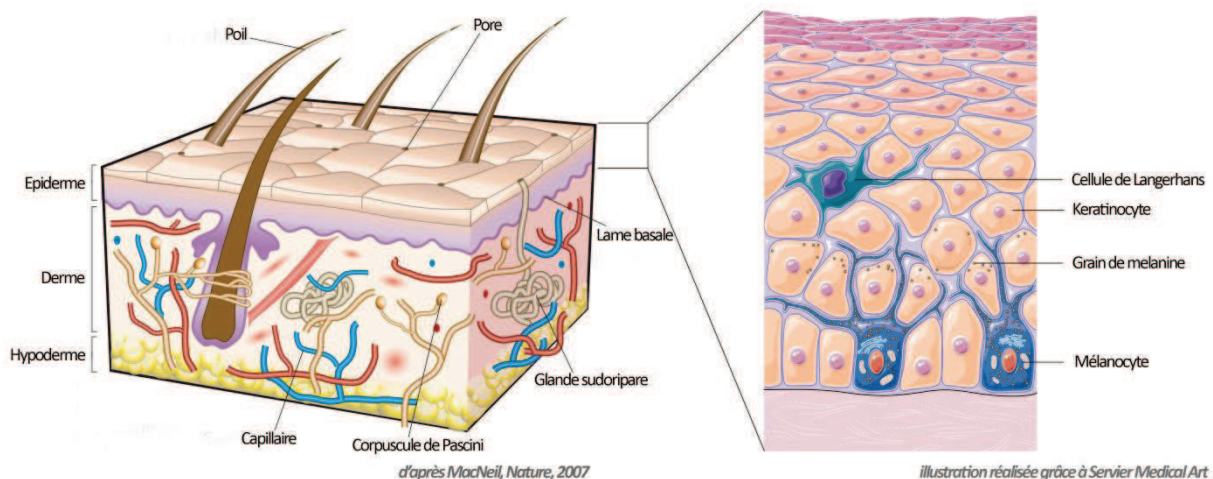


Figure 1 : Représentation de la peau et de ses 3 couches spécialisées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme⁹. La couche supérieure est l'épiderme, qui contient notamment les cellules impliquées dans le mélanome : les mélanocytes.

Les mélanocytes ont un rôle dans la protection des effets des radiations ultraviolettes, facteur de risque majeur des cancers de la peau. Ces cellules sont contrôlées par les kératinocytes pour leur prolifération, production de mélanine, motilité et survie. Cependant, certaines mutations impliquant des gènes du cycle cellulaire, de la production de facteurs de croissance ou de l'adhésion cellulaire peuvent induire une perte de contrôle des kératinocytes sur les mélanocytes¹⁰. Ainsi, les mélanocytes prolifèrent et se propagent, conduisant à la formation d'un nævus ou grain de beauté. Certains nævi peuvent être dysplasiques et présenter des mélanocytes atypiques (Figure 2).

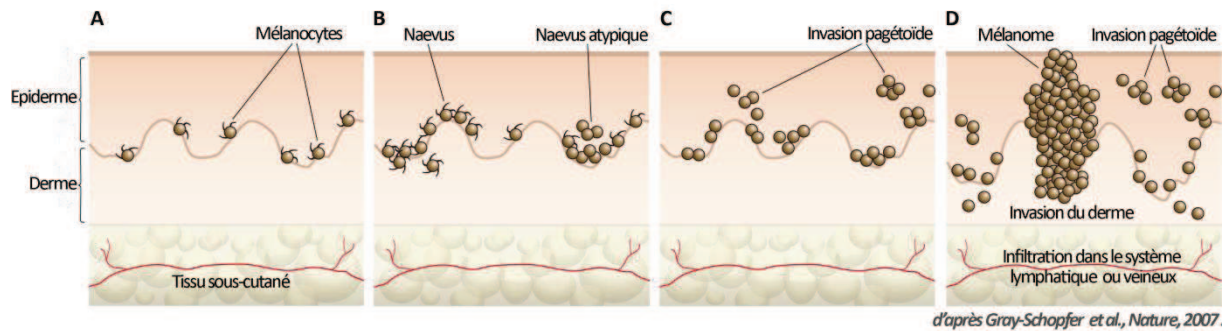


Figure 2 : Progression de la transformation de mélanocytes. A : Peau avec distribution normale des mélanocytes. B : Agrégation de mélanocytes pour former des nævi. Certains peuvent être dysplasique avec des morphologies atypiques. C : Phase de croissance radiale. D : Phase de croissance verticale pouvant mener à un mélanome malin métastatique¹¹.

Le plus souvent, les nævi sont bénins mais ils peuvent progresser vers le stade de croissance radiale (radial-growth-phase RGP) lors duquel ils se multiplient et se propagent, d'une part, vers la partie supérieure de l'épiderme (invasion pagétoïde) et, d'autre part, par des micro-invasions vers le derme. Cette étape est considérée comme un stade I de mélanome (Figure 2C).

Les cellules au stade RGP peuvent progresser vers le stade de croissance verticale (vertical-growth-phase VGP), lors duquel les cellules sont métastatiques et forment des nodules envahissant le derme. Il s'agit de la première étape pouvant mener directement à un mélanome malin métastatique¹², par infiltration de cellules tumorales dans les systèmes vasculaires et lymphatiques (Figure 2D).

La technique du « ganglion sentinelle » est souvent employée afin de visualiser le stade du mélanome. En effet, le ganglion le plus proche de la tumeur, dit « sentinelle » est le premier à recevoir le drainage lymphatique et/ou vasculaire. Ainsi, la détection de cellules cancéreuses dans ce ganglion indique que la tumeur est dans un stade invasif et que l'angiogenèse a déjà eu lieu. Par conséquent, des cellules tumorales ont potentiellement colonisé d'autres organes. La technique du « ganglion sentinelle » est donc un important facteur pronostic, afin de définir la meilleure stratégie thérapeutique. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement réellement efficace pour les patients atteints de cancer métastatique et plus de 90% des patients meurent des complications des métastases.

L'étape critique du phénomène de tumorigenèse (pour la survie de l'individu dans le cas du mélanome) est donc le passage d'une tumeur de taille réduite, avasculaire et localisée à une tumeur en croissance à partir de laquelle des cellules cancéreuses peuvent se propager dans l'organisme. Cette modification du phénotype tumoral résulte essentiellement de la néovascularisation à partir du réseau préexistant de l'hôte : c'est le « switch » angiogénique¹³.

2. L'ANGIOGENESE TUMORALE

a. Découverte de l'angiogenèse et généralités

L'angiogenèse se définit comme le développement de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Elle peut être physiologique ou bien liée à une pathologie.

i. Présentation

L'angiogenèse a lieu de manière normale et physiologique pendant la croissance et lors de processus biologiques (cicatrisation et reproduction). Cependant, diverses pathologies sont capables de détourner ces phénomènes angiogéniques pour contribuer au développement de cancers, d'inflammations ou de maladies autoimmunes¹⁴. Dans ces cas, l'angiogenèse contribue à exacerber une inflammation lors de maladies autoimmunes ou à faciliter la progression tumorale et la dissémination de cellules cancéreuses.

Dans d'autres cas, l'angiogenèse elle-même est le principal facteur responsable de la pathologie : lors de rétinopathies diabétiques, de dégénérescence maculaire ou d'endométriose, une néovascularisation peut servir d'indicateur pronostique ou diagnostique de l'avancée de la pathologie. A l'opposé des hypervascularisations, une perte de la fonction vasculaire à la suite d'une attaque ou d'un infarctus mène à une ischémie tissulaire. Une revascularisation locale et rapide est indispensable pour restaurer la fonction des tissus lésés.

Si la promotion ou l'inhibition de l'angiogenèse peuvent être considérées comme une stratégie thérapeutique, ce mécanisme complexe et hautement régulé doit être finement contrôlé lors de modulations par des médicaments. En effet, l'angiogenèse régule la survie et l'invasion de cellules vasculaires et toute modification excessive serait pathologique.

ii. Historique

L'observation de l'angiogenèse autour des tumeurs a été faite au début du siècle dernier¹⁵. Les premières évidences de production d'une substance angiogénique par les tumeurs ont été mises en avant en 1968^{16,17}. En 1971, le chirurgien Judah Folkman¹⁸ publie une revue dans « New England Journal of Medicine » dans laquelle il propose pour la première fois que la croissance tumorale et les métastases seraient dépendantes de l'angiogenèse. Cette hypothèse, vivement critiquée au départ, a permis d'ouvrir une nouvelle voie de recherche visant à bloquer l'angiogenèse pour stopper la croissance tumorale, voie qui est toujours suivie par nombre de scientifiques. Peu de temps après, Gimbrone¹⁹ établit les premières lignées endothéliales.

De nombreuses études ont, depuis lors, tenté d'étudier le mécanisme de l'angiogenèse, mais plus de 100 ans après son observation, il n'est pas encore entièrement élucidé tant celui-ci est complexe et met en jeu de nombreux acteurs moléculaires et cellulaires.

b. Les étapes de l'angiogenèse tumorale au niveau cellulaire

L'angiogenèse tumorale, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux à proximité d'une tumeur dans le but de la nourrir et l'oxygéner, se déroule en plusieurs étapes. A partir du schéma général (figure 3), les phases de ce processus seront décomposées et expliquées.

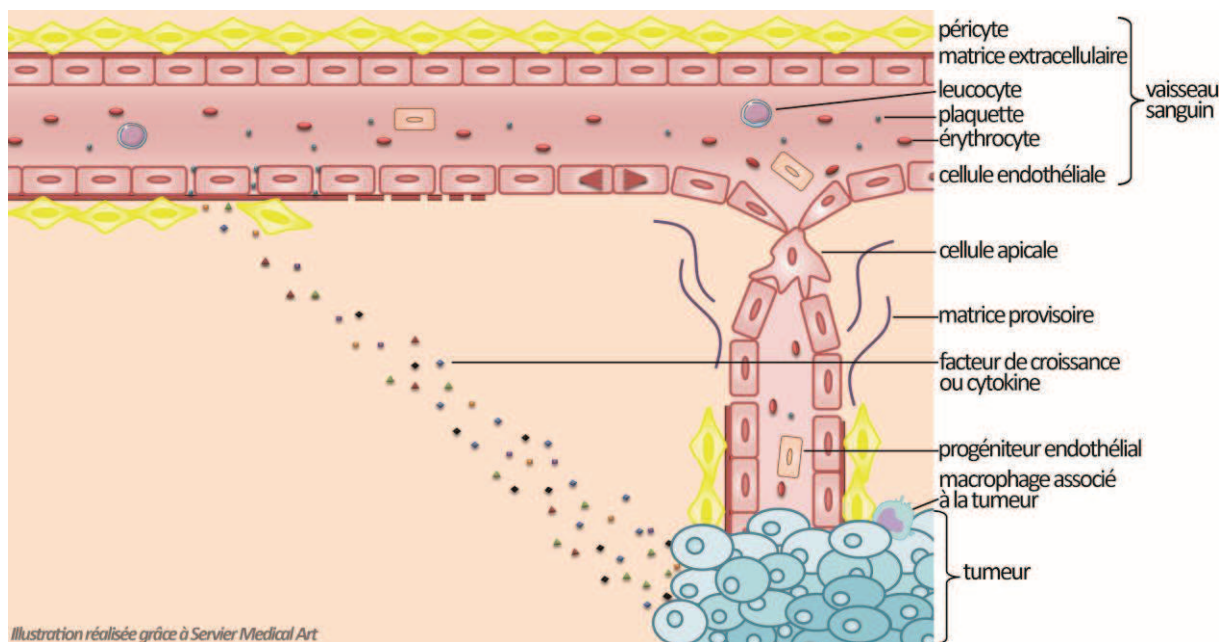


Figure 3 : Représentation schématique de l'angiogenèse tumorale. Les cellules tumorales en hypoxie produisent des facteurs de croissance et cytokines pour activer et recruter les cellules endothéliales. Celles-ci se libèrent de la matrice extracellulaire, prolifèrent et migrent vers la tumeur orientée par la cellule apicale dans une matrice provisoire. A proximité de la tumeur, les cellules endothéliales se réorganisent en néovaisseaux.

i. L'état quiescent des cellules endothéliales

La prolifération basale des CEs est une des plus lentes du corps humain¹⁴, car ces cellules, résidant dans les artérioles, veinules et capillaires, sont majoritairement quiescentes. Elles se chevauchent partiellement dans le but de former une structure continue imperméable au sang et aux molécules de plus de 75 kDa. Ainsi l'endothélium se comporte comme une paroi qui facilite le flux sanguin²⁰ (figure 4).

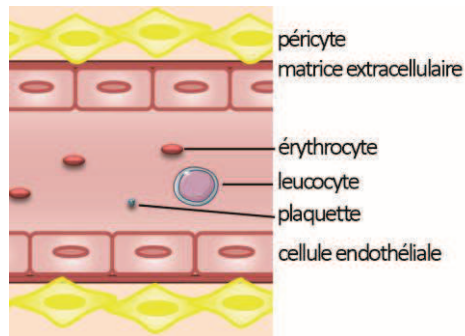


Figure 4 : Vaisseau sanguin de la microcirculation. *Un endothélium quiescent tapisse la paroi des vaisseaux qui permettent le passage du flux sanguin. Les cellules endothéliales sont soutenues par la matrice extracellulaire et des péricytes.*

Les cellules vasculaires sont ancrées à la matrice extracellulaire (MEC) sous-jacente. Les CE interagissent aussi entre elles par des jonctions cellules-cellules, à l'aide de molécules d'adhésion : VE-cadhérine/CD144 et PECAM-1/CD31. Parsemés le long des capillaires, les péricytes prolongent les contacts entre plusieurs CE et participent à stabiliser la structure capillaire. Ces interactions sont permises par la liaison de l'angiopoïétine-1 (ANGPT1) à son récepteur endothélial (tyrosine kinase with immunoglobuline and epidermal growth factor homology domains, Tie2). Enfin, le taux de molécules d'adhésion cellulaires (cell adhesion molecules, CAM) à la surface des CE quiescentes est bas et l'arrêt de cellules circulantes est rare²¹.

La faible prolifération des CE couplée à de fortes jonctions cellulaires permet de garder un endothélium quiescent et très résistant aux signaux pro-apoptotiques.

ii. Dormance des tumeurs

Initialement, les tumeurs sont d'une taille inférieure à 1-2 mm³. Souvent, elles sont dormantes et indépendantes de l'angiogenèse, avec une prolifération contrebalancée par une apoptose. L'apport de l'oxygène et des nutriments aux cellules tumorales est assuré par diffusion simple ou par une vascularisation inappropriée²² (figure 5). En conséquence, les cellules au centre de la tumeur sont souvent en hypoxie.

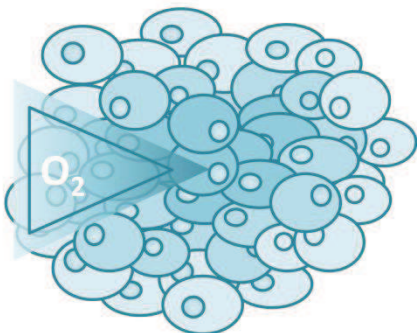


Figure 5 : Tumeur solide indépendante de l'angiogenèse. *La tumeur étant de petite taille, l'oxygène diffuse dans les tissus.*

iii. Définitions relatives à l'hypoxie et la normoxie

L'hypoxie est définie comme un état de manque en oxygène (O_2) pour des cellules, consécutif à un apport insuffisant en O_2 . En hypoxie, la pression partielle en oxygène (PO_2) est donc inférieure à la PO_2 physiologique des tissus. Or, chaque organe de l'organisme a des besoins différents ; l'apport en oxygène est donc distinct pour chacun pour assurer la survie et l'activité des cellules le composant. Dans une revue (Annexe 3), nous avons réalisé une étude bibliographique des PO_2 dans les tissus et mis en évidence qu'elles s'échelonnent de 9.5 à 1.1% selon les organes. Les conditions expérimentales « classiques » de culture cellulaire, dans lesquelles le pourcentage en oxygène est de 19.95% (air (21% O_2 /79% N_2) supplémenté de 5% de CO_2), ne tiennent pas compte de la PO_2 naturelle des tissus. Ces conditions expérimentales sont donc inadéquates et ne reflètent pas la physiologie des organes. Nous avons, par la suite, montré plusieurs exemples (facteur inductible par l'hypoxie 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF1), micro-ARN, molécules d'adhésion, angiogénine) dans lesquels la régulation par le taux en oxygène est primordial. Cela suggère que nous devrions considérer différemment les expérimentations *in vitro* afin de prendre en compte la valeur réelle de PO_2 dans les tissus et d'être au plus proche de la situation *in vivo*.

Nous proposons donc plusieurs définitions relatives à l'oxygénation des tissus :

- La normoxie correspond à la pression en oxygène de l'air, traditionnellement utilisée *in vitro*, c'est-à-dire 19.95% d'oxygène,
- La normoxie tissulaire ou physioxie est la pression partielle en oxygène physiologique dans les tissus,
- L'hypoxie représente une PO_2 inférieure à la PO_2 physiologique et indique un manque d'oxygénation du tissu.

iv. Activation de l'angiogénèse

Sous l'effet de l'accumulation des altérations génétiques, la prolifération des cellules tumorales devient plus active et la tumeur grossit au delà des limites de diffusion simple de l'oxygène dans les tissus (100 à 200 μm). Le manque en oxygène dans la tumeur induit une surexpression de gènes angiogéniques par les cellules tumorales^{23,24}. Les facteurs proangiogéniques produits sont alors en excès par rapport aux agents antiangiogéniques : c'est le « switch » angiogénique. Il s'agit du phénomène par lequel une tumeur passe d'un phénotype non-angiogénique à un phénotype angiogénique¹³.

Le « switch » angiogénique a été démontré pour la première fois dans un modèle de souris transgénique RIP-Tag : les cellules tumorales prélevées à un stade précoce ne sont pas capables de provoquer une réponse angiogénique lorsqu'elles sont co-cultivées avec des CEs *in vitro*. Au

contraire, des cellules tumorales isolées à un stade tardif de la progression tumorale sont capables d'induire une réponse angiogénique sur les CE²⁵.

La surproduction de facteurs proangiogéniques dans le microenvironnement tumoral, dont l'angiopoïétine-2 (ANGPT2), stimule les CE. ANGPT2 entre en compétition avec ANGPT1 pour sa liaison avec le récepteur endothélial Tie2. Une fois liée à son récepteur, ANGPT2 induit une modification du phénotype des CE : elles entrent en prolifération et en migration. De plus, les CE activées sont capables de produire divers facteurs (métalloprotéinases de la matrice (matrix metalloproteinase, MMP), héparinases et activateurs du plasminogène), dans le but de dégrader la MEC soutenant les vaisseaux²⁶.

Tout ceci permet aux plaquettes circulantes d'atteindre la lamina sous-jacente²⁷. En se liant à des molécules de la MEC, les plaquettes s'activent et déchargent le contenu de leur α -granules (protéases/lipases de la MEC, VEGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor, PDGF) et sphingosine 1 phosphate). Ces molécules contribuent à l'activation cellulaire, à la dégradation de la MEC et par conséquent à perdre tous les contacts cellulaires (figure 6).

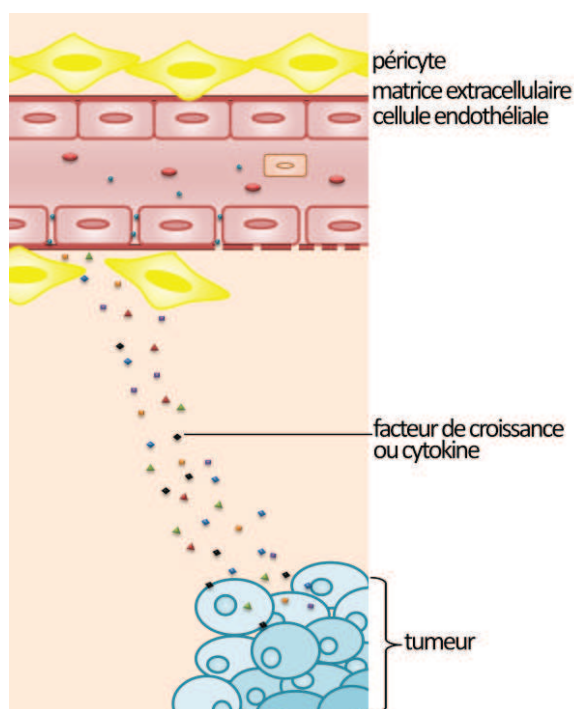


Figure 6 : Etapes précoces de l'angiogenèse. Les cellules tumorales hypoxiques produisent des facteurs de croissance et cytokines pour activer les cellules endothéliales. Celles-ci se libèrent de la MEC, ce qui leur permet de développer un phénotype pro-migratoire.

v. Migration des cellules endothéliales vers la tumeur

Les modifications du phénotype des CE associées à une perte de contact permettent d'activer le phénotype pro-migratoire de ces cellules. Ainsi, elles peuvent migrer en direction de la source du stimulus angiogénique : la tumeur. Certaines cellules, nommées les cellules apicales ou « tip-cells », sont à l'extrémité du capillaire en formation. Leur progression se fait par extension réversible de leurs filipodes et sont guidées par un gradient de cytokines, qui définit la direction de croissance du

vaisseau²⁸. Les principaux facteurs de croissance intervenant au cours de cette étape de l'angiogenèse sont le facteur de croissance basique des fibroblastes (basic fibroblast growth factor, bFGF ou FGF2), libéré par la dégradation de la MEC, et le VEGF²⁹.

La migration des CEs est facilitée par la formation d'une matrice provisoire, qui guide les CEs vers leur cible et par l'expression accrue de nouvelles protéines transmembranaires (intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, CAMs), qui leur permettent d'adhérer à cette nouvelle matrice³⁰. Les progéniteurs endothéliaux circulants peuvent se différencier en cellules matures et aussi participer à la formation de nouveaux vaisseaux (figure 7).

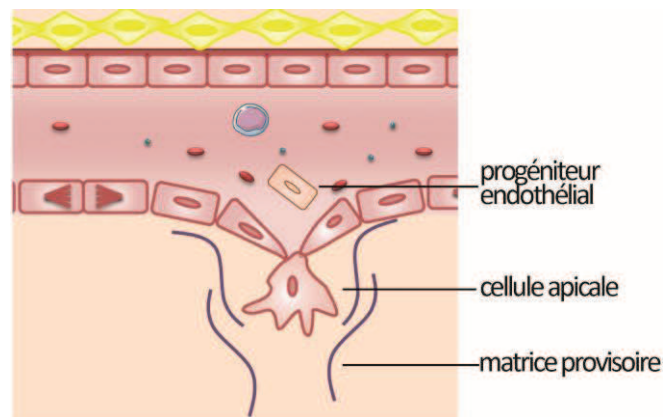


Figure 7 : Bourgeonnement des cellules endothéliales vers la tumeur et intervention de précurseurs endothéliaux. Les cellules endothéliales prolifèrent, puis migrent vers le stimulus à travers une matrice provisoire, grâce à la cellule apicale.

vi. Formation des vaisseaux et stabilisation

Arrivées à proximité du stimulus, les CEs se réorganisent en structures tubulaires, formant de nouveaux vaisseaux immatures mais fonctionnels. Les CEs vont induire la mise en place de la paroi vasculaire (composée des péricytes et de la MEC) qui assure la stabilisation des nouveaux vaisseaux³¹. Dans de nombreux cancers, des cellules immunitaires, macrophages associés à la tumeur (tumor-associated macrophages, TAM), sont recrutés au site tumoral. Ils produisent des facteurs de croissance pro-angiogéniques et du NO[•], mais contribuent aussi à activer le système immunitaire (figure 8).

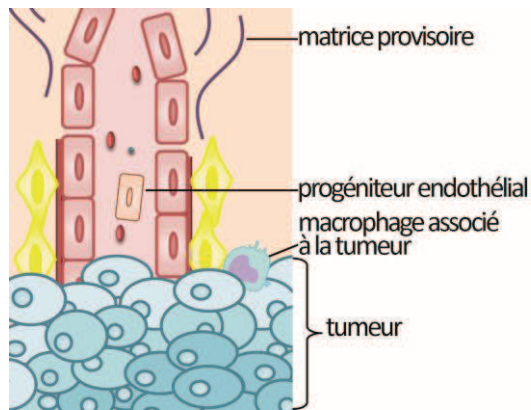


Figure 8 : Formation de néovaisseaux autour de la tumeur. Les cellules endothéliales se réorganisent à proximité de la tumeur, qui peut alors se nourrir et s'oxygéner. Les TAM sécrètent des facteurs de croissance, des molécules inflammatoires et du NO^{*}.

Les bourgeons capillaires sont en général composés d'une ou deux CEs et forment un lumen par fusion des vésicules cytoplasmiques ou par apposition des membranes de deux cellules adjacentes. Une fois que les cellules sont liées à la MEC, les intégrines libèrent ANGPT1, qui peut se lier à Tie2 pour provoquer la quiescence des CEs. ANGPT2 est alors sous-exprimée dans les CEs quiescentes. Ayant mis en place sa propre vascularisation, la tumeur peut recevoir l'oxygène et les nutriments nécessaires à son expansion. Les vaisseaux sanguins fournissent aussi aux cellules tumorales leur principale voie pour coloniser d'autres organes³².

Il est à remarquer que la structure des néovaisseaux tumoraux est très différente de celle des vaisseaux de tissus normaux (figure 9).

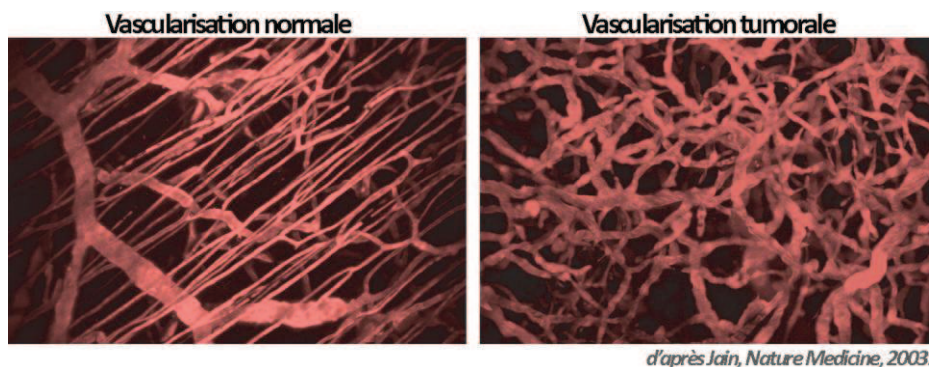


Figure 9 : Comparaison d'un réseau vasculaire normal à un réseau tumoral³³.

Pour s'adapter à la croissance tumorale rapide et aux besoins en oxygène et nutriments sans cesse grandissants de la tumeur, la vascularisation tumorale est soumise à une restructuration constante. Ce remodelage entraîne la constitution d'un réseau vasculaire chaotique, fragilisé, formé de vaisseaux de diamètre irrégulier. Cela est dû en partie à la compression de la paroi vasculaire par les cellules tumorales en prolifération³⁴. De plus, le microenvironnement tumoral est souvent riche en NO^{*} (produit par les TAM, les cellules tumorales et les CEs), lequel est à l'origine de

l'hyperperméabilité des vaisseaux tumoraux³⁵. La paroi vasculaire est anormale, les péricytes ne forment pas un manchon complet autour des CEs, ce qui explique la fragilité des vaisseaux tumoraux et leur perméabilité³³.

vii. Les acteurs cellulaires « secondaires »

Cellules endothéliales précurseurs : Ce sont des cellules myéloïdes circulantes qui sont recrutées aux sites de l'angiogenèse par la surexpression de molécules de surface (ICAM-1/CD54 et VCAM-1/CD106). Des données suggèrent qu'une fraction mesurable des CEs impliquées dans l'angiogenèse physiologique ou pathologique dérive de précurseurs endothéliaux^{36,37}. Le recrutement de précurseurs des CEs se fait par un processus comparable à celui des leucocytes : les sélectines et intégrines ($\alpha_4\beta_1$) des cellules précurseurs interagissent avec la surface du tapis cellulaire par l'intermédiaire des molécules d'adhésion endothéliales.

Péricytes : Ils jouent le rôle de stabilisation du vaisseau en formant des contacts avec les CEs. Ces contacts impliquent des interactions entre le récepteur endothélial Tie2 et ANGPT1, présents dans la vascularisation quiescente^{38,39}.

Macrophages associés aux tumeurs : Ils maintiennent un milieu inflammatoire au site d'angiogenèse^{40,41} et, comme les autres macrophages, produisent des quantités importantes de NO^{*}. Ces cellules sécrètent directement des facteurs de croissance ou bien induisent leur expression par d'autres cellules en réponse à l'interleukine 1 (IL1) ou au facteur de nécrose tumorale α (tumor necrosis factor α , TNF α). Ces facteurs agissent comme des facteurs de survie sur les CEs angiogéniques. Les TAM contribuent aussi à l'expression de composants de la MEC.

Fibroblastes associés aux cancers (cancer associated fibroblasts, CAF) : Ces dérivés des cellules souches mésenchymateuses sont les plus présents dans le stroma des tissus cancéreux, en particulier lors des carcinomes du sein et du pancréas⁴². Ces cellules favorisent le développement des cellules tumorales en exprimant un grand nombre de facteurs ayant des activités mitogènes (FGF, facteur de croissance épidermique et hépatocytaire, ainsi que les cytokines CXCL12 et interleukine 6 (IL6)), pro-angiogéniques (VEGF et CXCL12) et pro-invasifs (MMP, TGF β et facteur de croissance hépatocytaire)⁴³.

c. Les étapes de l'angiogenèse tumorale au niveau moléculaire

L'angiogenèse est contrôlée par un équilibre entre des facteurs de stimulation et d'inhibition. La croissance vasculaire se produit lorsque la balance est en faveur des stimuli positifs⁴⁴. La cascade

d'événements, du manque en oxygène à la production de facteurs pro-angiogéniques, est décrite dans la figure 10 et les paragraphes suivants.

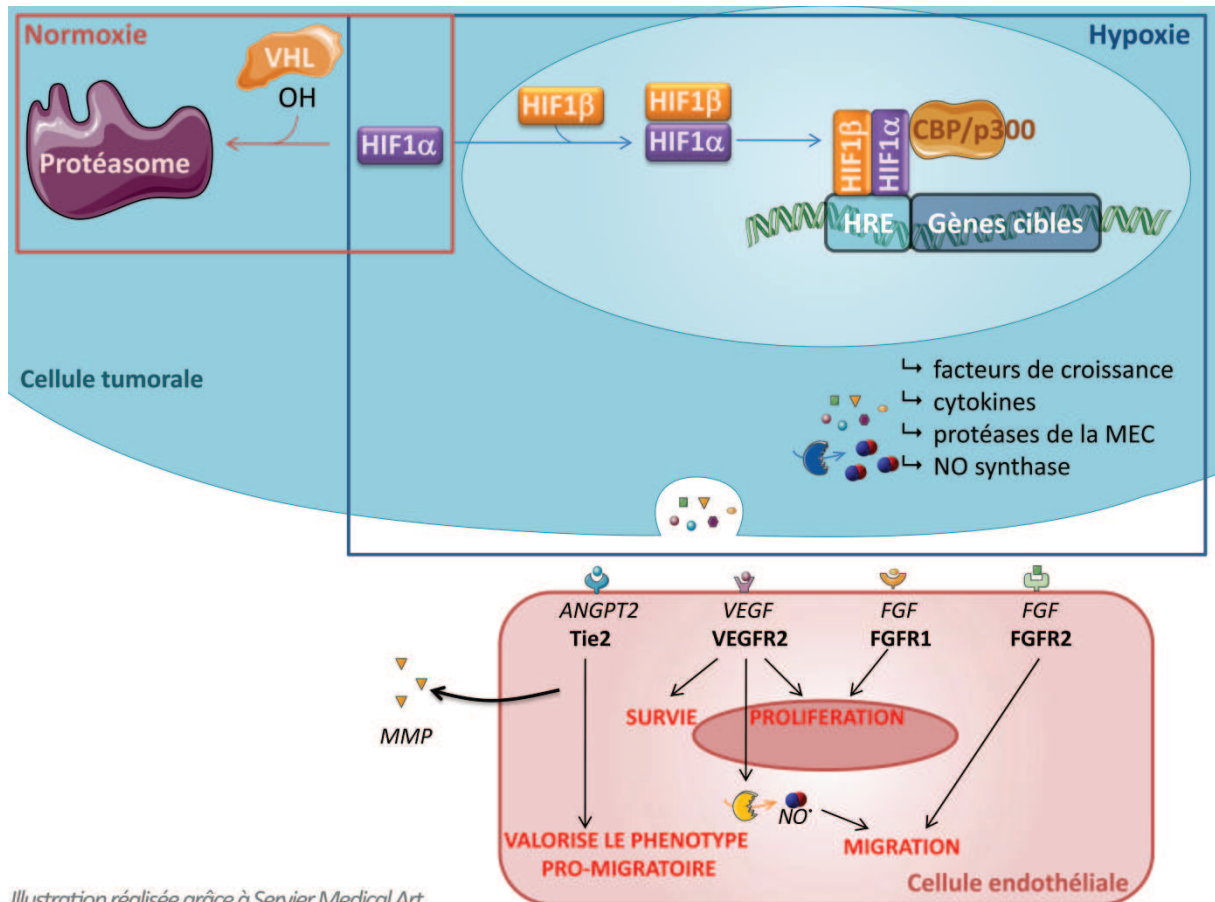


Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

Figure 10 : Représentation schématique de l'activation des cellules endothéliales par les cellules tumorales.

Le facteur déclenchant l'angiogenèse est la stabilisation de HIF1 α par le milieu hypoxique. En normoxie, HIF1 α est hydroxylé puis rapidement dégradé par le protéasome. En hypoxie, HIF1 α est stabilisé, ce qui rend le couplage HIF1 α -HIF1 β possible. La liaison de HIF1 α -HIF1 β aux éléments de réponse à l'hypoxie (hypoxia responsive element, HRE) permet d'activer l'expression de protéines d'activation de l'angiogenèse (facteurs de croissance, cytokines, MMP, NOS, ANGPT). Une partie de ces facteurs activent les CE pour modifier leur phénotype. Ainsi, les CE ont la capacité de proliférer et migrer pour former des pseudo-vaisseaux. Les paragraphes suivants précisent les événements menant à l'activation des CE et présentent les molécules impliquées.

i. Induction d'une hypoxie intratumorale

L'hypoxie, c'est-à-dire un environnement ayant une PO₂ inférieure à celui de la normoxie tissulaire, est le premier régulateur physiologique du « switch » angiogénique. La rapide prolifération des

cellules tumorales provoque une augmentation de l'activité métabolique et par conséquent une plus forte consommation d'oxygène. De plus, la masse tumorale augmente ce qui éloigne le tissu tumoral des capillaires ; l'oxygène diffuse difficilement dans la tumeur, en conséquence les taux d'oxygène intratumoraux diminuent. La première conséquence de l'hypoxie est la stabilisation du facteur HIF1 α .

ii. Le facteur inductible par l'hypoxie (hypoxia inducible factor, HIF1)

Il s'agit d'un facteur de transcription de la famille des basic-helix loop helix/Per-ARNT-SIM, constitué d'hétérodimères $\alpha\beta$. Alors que la sous-unité α de HIF1 est régulée par l'oxygène, la sous-unité β est exprimée de façon constitutive et est indépendante de l'oxygène.

En normoxie (21% d'oxygène), la demi-vie de HIF1 α est d'environ 5 minutes, alors qu'elle augmente jusqu'à 30 min en absence d'oxygène⁴⁵. En effet, en présence d'oxygène, l'hydroxylation de deux prolines dans le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène de HIF1 α permet sa liaison à la protéine von Hippel Lindau (VHL). Puis, HIF1 α est ubiquitinylé et rapidement dégradé par le protéasome. Par contre, en hypoxie, la protéine est peu hydroxylée et s'échappe donc de la voie de dégradation. La stabilisation de HIF1 α permet son hétérodimérisation avec HIF1 β . Par la suite, le complexe HIF1 α -HIF1 β se lie aux HRE des promoteurs de gènes cibles, pour les activer, à l'aide des co-activateurs CBP/p300⁴⁶ (figure 10). La littérature décrit actuellement plus de 60 gènes activés par le complexe HIF1 α - HIF1 β ⁴⁷, dont le VEGF et la NOS2.

Au niveau fonctionnel, des études de délétion génique de HIF1 α dans les cellules murines ES montrent une augmentation de l'apoptose de ces cellules et une réduction de la masse tumorale⁴⁸. En effet, HIF1 α est un régulateur positif de l'angiogenèse, de la croissance tumorale⁴⁹ et de la formation de métastases⁵⁰, par régulation de la fonction endothéliale⁵¹.

iii. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)

Ce facteur est considéré comme l'initiateur ubiquitaire de l'angiogenèse tumorale. En effet, il est capable de réguler beaucoup, si ce n'est pas toutes, les étapes de la cascade angiogénique : expression des protéines, migration, division et apoptose des CE. Contrairement à d'autres facteurs angiogéniques, l'action proliférative du VEGF semble être restreinte aux CE, ce qui fait de lui une cible excellente pour des thérapies anti-angiogéniques³.

Le VEGF est une glycoprotéine, de 45 kDa, dimérique et sécrétée. La famille des VEGF comporte les VEGF A, B, C, D et E dont les effets résultent de leur fixation à un récepteur, lui-même couplé à des récepteurs tyrosine kinase transmembranaires. Le VEGF a trois récepteurs différents: VEGFR1 (Flt1),

R2 (Flk1 ou KDR) et R3. De plus, le VEGF est capable de se lier au protéoglycane héparane sulfate (HS), aux neuropilines et à l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ ⁵².

Le VEGF 165 est l'isoforme mitogène du VEGF A, le plus abondant. Sa liaison au VEGFR2, exprimé à la surface des CEs, active les voies de signalisation pro-angiogéniques^{53,54}.

La transcription du VEGF peut être stimulée par :

- l'hypoxie, par l'intermédiaire de HIF1 α : c'est le stimulateur principal de l'expression de VEGF,
- des oncogènes activés,
- certaines cytokines : IL-1 α/β , Tumor Growth Factor (TGF) β , prostaglandine E2, TNF- α ,
- la cyclooxygénase 2,
- les forces mécaniques.

Lors de l'angiogenèse, la liaison du VEGF A sur son récepteur induit l'activation des CEs. Plusieurs activités cellulaires sont alors modulées :

- la survie cellulaire : cela passe principalement par l'activation de la voie de la phosphoinositide 3'-kinase (PI3k)/Akt^{55, 56}. De plus, VEGFR2 est capable de s'associer à l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, ce qui augmente l'activité du récepteur du VEGF et contribue à l'activation des kinases de l'adhésion focale (focal adhesion kinase, FAK).
- la multiplication cellulaire : Le VEGF est un activateur de la kinase ERK (acronyme de « extracellular-signal-regulated protein kinase ») et de la phospholipase C (PLC), par l'intermédiaire desquelles est modulée la synthèse d'ADN.
- la migration des CEs : la migration est sous la dépendance de la formation de nouveaux points focaux d'adhésion. Le VEGF induit la phosphorylation de FAK pour l'activer et former ces complexes. De plus, la liaison du VEGF sur le récepteur VEGFR2 augmente la production du NO^{*}, par activation de la NOS3. Le NO^{*} peut alors réguler l'intégrité des points focaux pour moduler la migration cellulaire.

iv. Le monoxyde d'azote (Nitric Oxide, NO^{*})

Le NO^{*} est un radical libre jouant un rôle central lors de l'angiogenèse. Il est produit par les cellules tumorales activées par l'hypoxie, les CEs activées par l'hypoxie ou le VEGF et les TAM activés par des cytokines. Tout d'abord décrit comme un vasodilatateur, il permet d'initier la multiplication des CEs dans les vaisseaux normaux, puis au niveau des vaisseaux tumoraux d'améliorer le flux sanguin vers le centre de la tumeur. Son importance dans la formation des vaisseaux a été rapidement élargie lorsqu'il a été établi que le NO^{*} est présent en forte concentration dans certaines tumeurs⁵⁷, ce qui est associé avec une surexpression d'une des enzymes de synthèse : la NOS2⁵⁸. L'inhibition de la production de NO^{*} provoque une abolition de l'angiogenèse⁵⁹. Le NO^{*} a été impliqué dans plusieurs

étapes du processus cancéreux : l'initiation et le développement de la tumeur, l'angiogenèse, l'invasion des cellules cancéreuses pour former des métastases et la réponse anti-tumorale de l'hôte. Ses propriétés seront plus précisément décrites dans un chapitre ultérieur et l'approfondissement de son rôle dans l'angiogenèse tumorale fait l'objet de ce travail de thèse.

v. Les angiopoïétines (ANGPT)

Ces facteurs de croissance agissent dans les étapes précoces de l'angiogenèse et de la vasculogenèse, par l'intermédiaire du récepteur Tie2. L'isoforme ANGPT1 est trouvé aux sites de remodelage des tissus dans les tissus adjacents aux vaisseaux sanguins ; il facilite le bourgeonnement des CEs et la maturation du réseau vasculaire⁶⁰.

ANGPT2 a un effet antagoniste sur ANGPT1 en bloquant la phosphorylation de Tie2⁶¹. ANGPT2, en combinaison avec le VEGF, permet la néovascularisation.

vi. Le facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast growth factor, FGF)

C'est le premier facteur de croissance angiogénique découvert¹⁸. La famille des FGF est composée d'au moins 20 molécules (dont FGF1 et basal FGF) produites par les CEs vasculaires et musculaires lisses. Les FGF ont de nombreux effets biologiques dont l'induction de la prolifération d'une grande gamme de cellules et plus largement lors de l'angiogenèse, de l'inflammation et de la régénération tissulaire⁶².

La réponse biologique des FGF est l'activation d'un des 4 récepteurs spécifiques tyrosine-kinases : FGFR1, FGFR2, FGFR3 et FGFR4. La signalisation par FGFR1 stimule la migration et la différenciation des CEs, alors que FGFR2 ne permet de moduler que la migration⁵². Les FGF ont aussi la capacité de se lier aux glycosaminoglycannes (GAG), et en particulier l'HS de la MEC. Le rôle de ces associations est différent selon la nature du protéoglycane associé : la liaison de FGF à son récepteur peut être facilitée ou le FGF peut être séquestré par un GAG⁶³.

vii. Les métalloprotéinases de la matrice (Matrix metalloproteases, MMP)

Les métalloprotéinases de la matrice sont des endopeptidases dépendantes du zinc. Il existe 24 MMP humaines. Elles sont caractérisées par leur capacité à dégrader des protéines de la matrice extracellulaire telles que collagènes, laminine, fibronectine, vitronectine, agrécane, entactine, ténascine, élastine et protéoglycannes. Cela peut provoquer la libération de facteurs de croissance séquestrés. Collectivement, elles sont aussi capables de dégrader un certain nombre de molécules bioactives : certains récepteurs de surface et chimiokines⁶⁴. Les MMP sont généralement exprimées à des taux très faibles et leur expression est régulée par des cytokines et facteurs de croissance (IL1, IL4, IL6, TGF β ou TNF α)⁶⁵.

Lors de cancer, beaucoup de MMP sont produites par des CE. Les cellules cancéreuses produisent, quant à elles, des activateurs de la production de MMP qui stimulent la libération de MMP par les fibroblastes⁶⁶.

Lors de l'angiogenèse, les MMP peuvent avoir des effets pro- ou anti-angiogéniques : les MMP2/9 endothéliales clivent le collagène type IV, constituant principal de la lame basale, ce qui l'expose à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et augmente l'angiogenèse. Cependant, en clivant le plasminogène, MMP12 génère un puissant inhibiteur de l'angiogenèse : l'angiostatine.

viii. Les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse

Les molécules présentées jusqu'alors activent la formation de néo-vaisseaux. Cependant, la production d'inhibiteurs est importante, stoppant les signaux pro-angiogéniques. Trois molécules sont particulièrement importantes : l'angiostatine, la tumstatine et l'endostatine. Par divers mécanismes, ces inhibiteurs ciblent l'angiogenèse, en diminuant la prolifération endothéliale. Cela a pour conséquence de diminuer la croissance des tumeurs et d'accentuer l'apoptose tumorale⁵².

d. Les molécules d'adhésion impliquées dans l'angiogenèse

Les phénomènes d'adhésion entre les CE sont primordiaux tout au long de l'angiogenèse (figure 11).

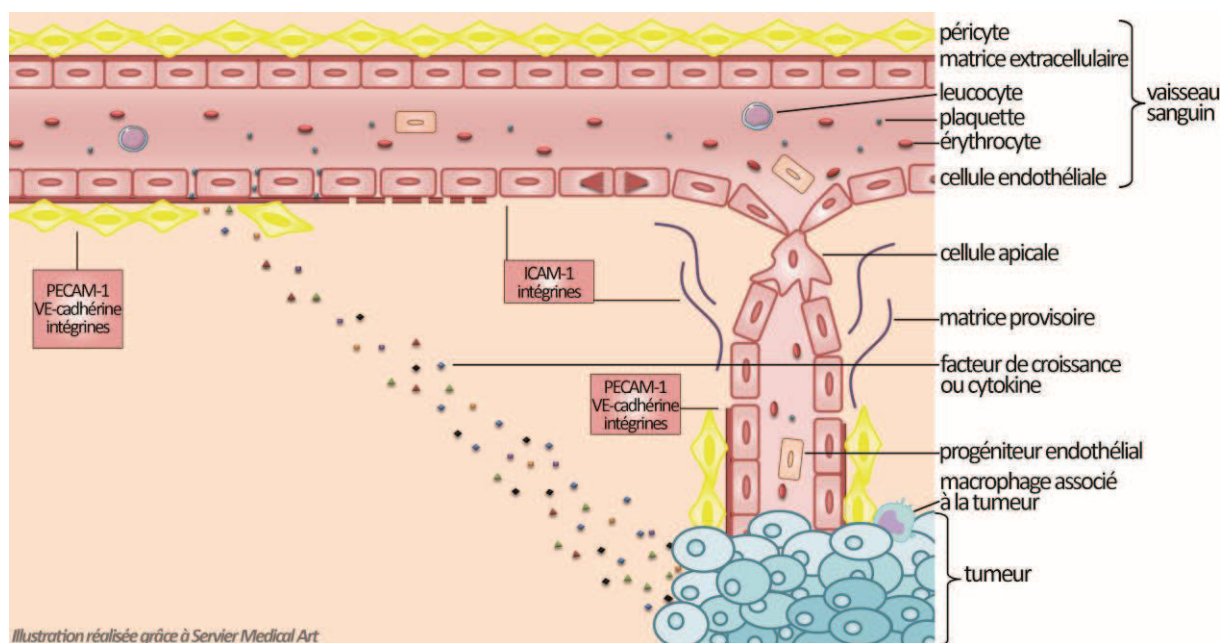


Figure 11 : Représentation schématique de l'angiogenèse tumorale et des molécules d'adhésion impliquées (dans les encadrés).

Les molécules d'adhésion permettent le maintien des cellules quiescentes en un vaisseau stable et fonctionnel, puis la perte de contact favorise la migration et la prolifération des CE. La viabilité est aussi hautement contrôlée par l'adhésion des CE à la matrice provisoire. Enfin, le phénotype

quiescent est réacquit dès que les cellules sont de nouveau en contact. Il apparaît que l'angiogenèse est en partie due à une régulation dynamique de l'expression de plusieurs classes de molécules d'adhésion⁶⁷. Les principales sont les CAM, les cadhérines et les intégrines.

i. PECAM-1/CD31

PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) correspond au cluster de différenciation 31. Cette protéine transmembranaire de type I (traversant une seule fois la membrane plasmique) est un membre de la superfamille des immunoglobulines (Ig). PECAM-1/CD31 possède 738 acides aminés (aa), est composée de 6 domaines Ig et comporte 9 sites de N-glycosylation.

Exprimé très fortement par les CEs (environ 1 million de copies/cellule)⁶⁸, PECAM-1/CD31 est aussi trouvé sur les plaquettes, mégacaryocytes, leucocytes et ostéoclastes. La présence de PECAM-1/CD31 principalement dans les CEs en fait un marqueur de la vascularisation couramment utilisé.

PECAM-1/CD31 se situe au niveau des jonctions cellulaires, car il permet les interactions cellulaires adhérentes aux cellules adjacentes par liaison homotypique (par le domaine Ig1 N terminal distal et les aa D11, D33, K50, D51 et K89). Le maintien de la localisation de PECAM-1/CD31 aux jonctions des CEs requiert un contact cellulaire. Sans contact, PECAM-1/CD31 reste distribué de façon diffuse à la surface de la cellule, jusqu'à ce qu'il rencontre son ligand sur une autre cellule.

PECAM-1/CD31 est impliqué dans la formation et la stabilisation des contacts entre les CEs^{69,70}, ce qui permet de maintenir la barrière vasculaire perméable⁷¹. De plus, PECAM-1/CD31 est impliqué dans la modulation de la migration cellulaire^{72,73,74} et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins lors de l'angiogenèse^{75,76}.

ii. ICAM-1/CD54

ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) correspond au cluster de différenciation 54. Cette protéine transmembranaire de type I est un membre de la superfamille des immunoglobulines. Cette molécule d'adhésion est exprimée sur les CEs, les lymphocytes et macrophages, avec une surexpression après activation par certaines cytokines (VEGF, IL1, TNF α ...).

Comprenant 532 aa et 7 sites de N-glycosylation, ICAM-1/CD54 contient 5 répétitions Ig-like grâce auxquelles elle peut interagir avec les intégrines CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$ ou LFA-1)⁷⁷ et CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$ ou Mac-1)⁷⁸ ou avec ICAM-1/CD54 lui-même. Par l'intermédiaire de sa région intracellulaire, ICAM-1/CD54 est capable d'interagir avec l' α -actinine⁷⁹ et certainement indirectement avec l'eitrine et la moesine^{80,81}, protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette. Lors de sa liaison à un ligand, il se forme des structures de « docking »^{81,82} à la face apicale des cellules. Le regroupement de nombreux ICAM-1/CD54 provoque une cascade de signalisation au niveau des CEs : augmentation du

calcium cytosolique libre, activation des tyrosines kinases src et formation de fibres de stress, ce qui explique la forte implication de cette molécule d'adhésion dans le contrôle de la migration cellulaire.

iii. VE-cadhérine/CD144

VE-cadhérine (vascular-endothelial cadherin) ou cadhérine-5 correspond au cluster de différenciation 144. Elle possède 784 aa, 7 sites de N-glycosylation et la région extracellulaire est organisée en 5 domaines « cadhérine ». Les cadhérines représentent une des familles majeures des molécules d'adhésion et régulent l'adhésion par des interactions homotypiques dépendantes du calcium. VE-cadhérine/CD144 est la seule cadhérine endothéliale parmi les 8 existantes, cependant, son expression ne se retrouve pas sur toutes les CEs.

Au niveau intracellulaire, l'extrémité C-terminale des cadhérines est associée à des protéines cytosoliques : les caténines (p0071, plakoglobin, β caténine et p120), liant l' α -caténine. A ce niveau, elle semble interagir avec l'actine ; mais à ce jour, l'identité du lien moléculaire entre l'actine et le complexe cadhérine-caténine n'est pas encore élucidée.

Sa fonction a été découverte par l'utilisation d'anticorps neutralisants : alors que *in vitro* les contacts cellulaires sont perdus en présence de l'anticorps, *in vivo* une accumulation de neutrophiles est observée dans les péritoines inflammés des souris⁸³ ainsi que des hémorragies sous-cutanées menant à la mort de l'animal⁸⁴. Ceci a permis de définir VE-cadhérine/CD144 comme étant un déterminant majeur de l'intégrité des contacts entre les CEs et de l'organisation de leurs jonctions.

Lors de l'angiogenèse, ceci se traduit par la régulation de la fusion des vacuoles menant à la formation du lumen. De plus, de part ses interactions avec le récepteur VEGFR2, VE-cadhérine/CD144 joue un rôle dans plusieurs fonctions cellulaires ; en effet, l'activation du VEGFR2 par liaison au VEGF permet la phosphorylation de VE-cadhérine/CD144 sur différents sites. Cela module négativement la prolifération cellulaire, tout en soutenant les signaux de survie de VEGFR2⁸⁵.

iv. Intégrines

La famille des intégrines est un groupe de glycoprotéines de surface, exprimées sur tous les types cellulaires. Elles sont formées de 2 chaînes hétérodimériques α et β , associées de façon non covalente. Il existe 18 sous-unités α et 8 β , qui s'assemblent pour former au moins 24 hétérodimères, dont 13 sont décrites comme exprimées par les CEs (figure 12 gauche). La masse moléculaire des sous-unités des intégrines varie de 90 à 160 kDa.

Du côté extracellulaire, les chaînes α et β se rapprochent pour former en N-terminal une région de liaison aux ligands. Cette région est caractérisée par la présence des aa Arginine-Glycine-Acide

aspartique, dite région « RGD ». La combinaison de 2 sous-unités détermine la spécificité de liaison pour un ligand et les propriétés de signalisation, pour une intégrine donnée (figure 12 droite).

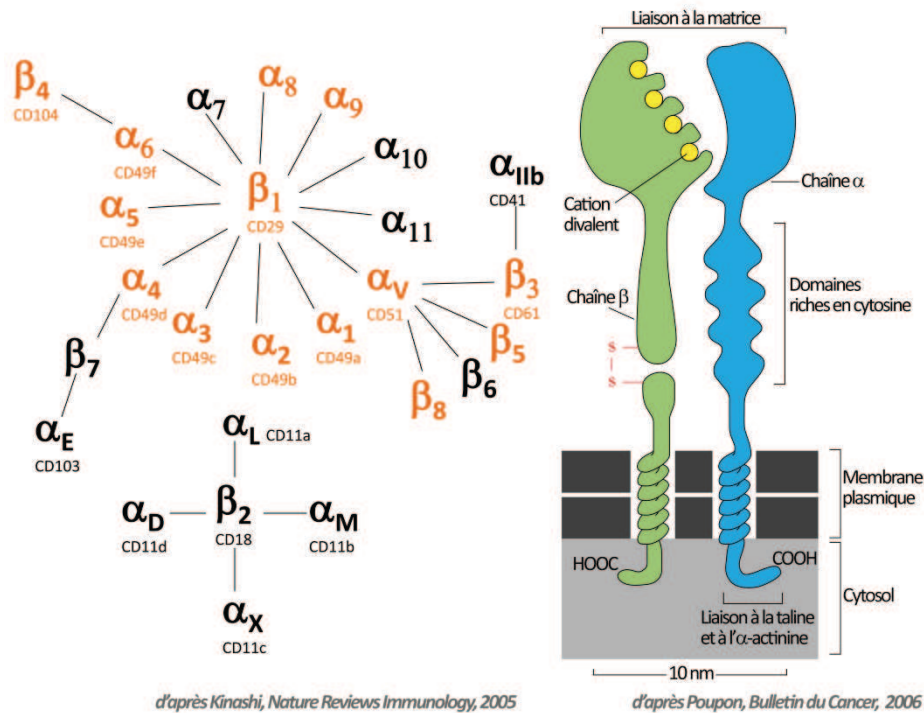


Figure 12 : Classification et structure des intégrines. A gauche, les différentes sous-unités α et β et les hétérodimères possibles sont présentés. Les intégrines exprimées à la surface des cellules endothéliales sont en orange. A droite, une intégrine est représentée de façon schématisée⁸⁶. L'intégrine est constituée de ses deux chaînes α et β , les deux extrémités extracellulaires forment une poche réceptrice spécifique pour ses ligands.

Le rôle principal des intégrines est l'attachement des cellules à la MEC via des ligands tels que la fibronectine, la vitronectine, le collagène et la laminine. A l'intérieur de la cellule, les liaisons avec les microfilaments sont indirects et passent par des protéines d'ancrage: taline, paxiline et α -actinine. Les intégrines ont un rôle de transduction de signal lors de la croissance cellulaire, la division, la survie, la différenciation, l'apoptose...

Lors de la progression tumorale et plus particulièrement l'angiogenèse, certaines intégrines jouent un rôle spécifique. Deux intégrines ont été largement étudiées pour leur implication dans la formation des vaisseaux sanguins : il s'agit des intégrines $\alpha_v\beta_3$, récepteur de la fibronectine et vitronectine, et $\alpha_v\beta_5$, récepteur de la vitronectine. Ces intégrines sont surexprimées dans un contexte angiogénique et leur rôle est alors primordial, puisque leur neutralisation perturbe l'angiogenèse tumorale. Hormis ces intégrines majeures pour la progression tumorale, d'autres sont décrites comme régulateurs positifs ou négatifs de ce phénomène : les intégrines β_1 , $\alpha_v\beta_8$ et $\alpha_6\beta_4$. La fonction des intégrines est souvent dépendante du substrat et du contexte cellulaire.

Les intégrines des cellules vasculaires changent durant l'angiogenèse : les interactions précoces se produisent par l'intermédiaire d'intégrines pré-existantes ($\alpha_v\beta_5$)⁸⁷, alors que l'expression de certaines intégrines ($\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$) est diminuée. D'autre part, les intégrines $\alpha_v\beta_3$, α_4 et $\alpha_5\beta_1$ sont exprimées *de novo* ou surexprimées, principalement pour interagir avec la matrice provisoire.

3. LA REPONSE IMMUNITAIRE

a. Présentation

En réponse à une blessure d'un tissu, plusieurs signaux chimiques sont initiés pour obtenir une réponse de l'hôte. Cela augmente l'activation et la migration dirigée des leucocytes vers le site de l'infection.

Lors d'un cancer, les cellules tumorales produisent diverses cytokines et chimiokines, ce qui est perçu par le système immunitaire comme un lieu d'infection. Les neutrophiles sont les premiers recrutés lors d'une réponse inflammatoire aiguë. Dans les tissus, les monocytes se différencient en macrophages et sont guidés par les facteurs chimiotactiques. Le cancer en développement contient donc une population complexe de leucocytes capables de produire des cytokines, médiateurs cytotoxiques (dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive oxygen species, ROS), MMP, granzyme, perforine) et des médiateurs solubles de mort cellulaire (TNF α , IL et interférons (IFN)). Cependant, les réponses immunitaires endogènes anti-tumorales efficaces pour détruire la tumeur sont rares. Pourquoi ? La tumeur semble capable de développer des stratégies pour échapper à l'immunité spécifique anti-tumorale, voire de tirer profit des facteurs de croissance produits pour la progression tumorale ainsi que des cellules recrutées au site tumoral.

Depuis plusieurs années, des thérapies anti-cancéreuses sont développées dans le but de mieux diriger le système immunitaire vers la tumeur et de détruire le cancer par l'immunité de l'hôte. Ces traitements prometteurs ne sont aujourd'hui pas suffisants et ne sont qu'un complément d'une thérapie classique. En effet, il est difficile de jouer sur cet équilibre fragile entre progression pro- et anti-tumorale, d'autant plus que toutes les subtilités de ce mécanisme ne sont pas complètement élucidées.

b. L'adhésion des leucocytes

La migration transendothéliale a été décrite pour la 1^{ère} fois il y a 200 ans⁸⁸, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont été découverts que récemment⁸⁹. La migration transendothéliale est décrite par différentes étapes représentées sur la figure 13.

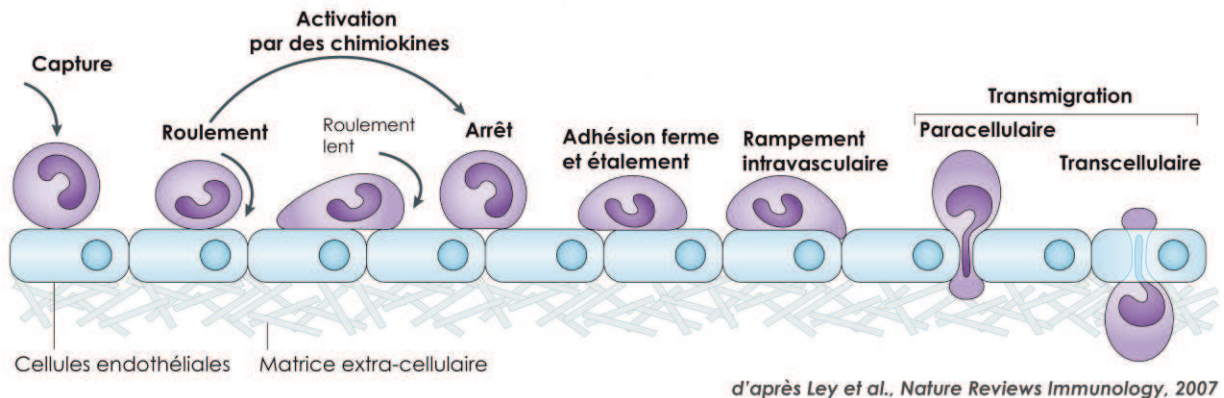


Figure 13 : Cascade de recrutement des leucocytes sur un endothélium⁸⁹.

Après adhésion sur l'endothélium, les leucocytes roulent et sont activés par des chimiokines, pour qu'ils adhèrent fermement aux CEs. Les leucocytes s'étalent, puis rampent sur l'endothélium jusqu'à trouver un site où une transmigration est possible entre ou au travers des cellules.

i. Capture et roulement des leucocytes sur la paroi endothéliale

L'adhésion et le roulement des leucocytes sanguins sur l'endothélium sont assurés principalement par la L-sélectine (sur les leucocytes), la P-sélectine (sur les CEs activées et les plaquettes activées) et la E-sélectine (sur les CEs activées)⁹⁰. Ces molécules interagissent avec le ligand 1 de la P-sélectine (P-selectin glycoprotein ligand1, PSGL1) pour la L- et P-sélectine ; CD44 et le ligand 1 de la E-sélectine (E-selectin ligand1, ESL1) pour la E-sélectine. La capture des cellules inflammatoires est aussi facilitée par des interactions entre l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ sur un leucocyte et VCAM-1/CD106 sur les CEs.

Ces interactions permettent aux leucocytes de rouler sur un endothélium activé en condition de flux, puisque les liaisons sont formées et détruites à des vitesses très rapides. Les contraintes de cisaillement semblent indispensables à l'expression des L- et P-sélectines lors de l'adhésion, car les cellules en roulement se détachent quand le flux est stoppé.

ii. Activation pour l'arrêt des leucocytes

Lors du roulement, il apparaît que les deux types cellulaires sont activés par des cytokines : d'une part, les CEs sont activées par des cytokines inflammatoires et expriment de nouvelles molécules d'adhésion pour la fixation des leucocytes; d'autre part, les leucocytes sont recrutés et activés par un gradient chimioattractant dû à la fixation de chimiokines sur les GAGs endothéliaux⁹¹. La liaison des chimiokines aux GAGs est primordiale pour un recrutement efficace des leucocytes : des mutations des chimiokines sur les résidus spécifiques de la liaison aux GAGs empêchent tout recrutement des leucocytes, alors que l'effet sur le chimiotactisme est intact⁹². Les chimiokines CCL5, CXCL4, CXCL5... sont synthétisées par les CEMs ou par des plaquettes activées.

iii. Roulement lent, arrêt et adhésion ferme

Une fois les deux partenaires activés, les leucocytes peuvent se lier fermement aux CEs par l'intermédiaire d'interactions mettant en cause des intégrines leucocytaires et des CAM endothéliales: $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1/CD106, $\alpha_L\beta_2$ -ICAM-1/CD54 et $\alpha_M\beta_2$ -ICAM-2/CD102. Lors de cette étape, les chimiokines sont capables de réguler rapidement l'avidité des intégrines, en augmentant l'affinité (par modification conformationnelle) et le nombre de liaisons possibles à l'intégrine ainsi qu'en les activant, de manière spécifique selon les cellules, en quelques millisecondes⁹³.

Avant de traverser la paroi des vaisseaux, les neutrophiles et monocytes se déplacent le long de l'endothélium, par l'intermédiaire de $\alpha_M\beta_2$ et de ICAM-1/CD54, pour trouver un site préférentiel de diapédèse : c'est le roulement/rampement au pas ou « intravascular crawling »⁹⁴.

iv. La diapédèse au travers de l'endothélium

Il s'agit de l'étape finale de la migration transendothéliale. Les leucocytes rencontrent alors trois barrières : les CEs, la lame basale des CEs et les péricytes. Alors que la migration transendothéliale est assez rapide (<2-5 minutes), la pénétration dans la lame basale se révèle plus longue (>5-15 minutes). La composition de la paroi vasculaire en CEs et péricytes rend certaines zones propices ou non à la migration. Cela explique la variabilité dans les durées de traversée⁸⁹.

La migration transendothéliale est déclenchée par les chimioattractants de la lumière du vaisseau et les contraintes de cisaillement. Les interactions entre les intégrines des leucocytes et leurs ligands endothéliaux stimulent aussi les CEs pour permettre la migration des leucocytes. Les leucocytes incitent les CEs à former des structures de « docking ». Ce sont des projections membranaires riches en ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, molécules cytoplasmiques (telles que l'ézrine, la radixine et la moesine) et protéines du cytosquelette (vinculine, α -actinine et talin1)⁸¹, indispensables à la migration transendothéliale que ce soit par la voie intercellulaire ou transcellulaire.

Le parcours intercellulaire

L'utilisation de cette voie consiste à modifier la perméabilité des jonctions entre les CEs pour permettre le passage des leucocytes (figure 14).

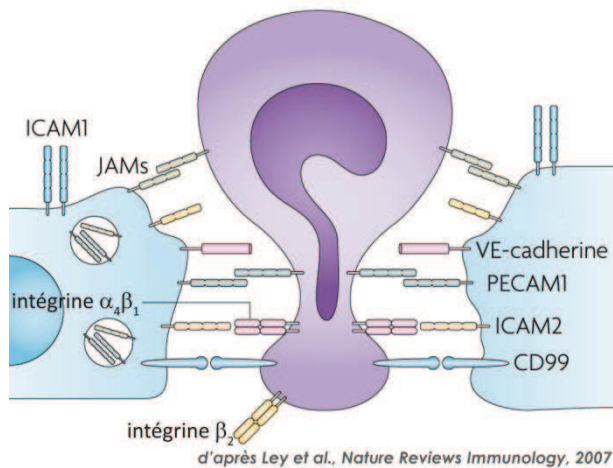


Figure 14 : transmigration par voie intercellulaire.

Certaines molécules d'adhésion sont particulièrement impliquées dans la migration transendothéliale des leucocytes *in vitro* et *in vivo*: PECAM-1/CD31, ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, les molécules d'adhésion des jonctions (Junctional Adhesion Molecules, JAM) et CD99. Les CEs activées redistribuent les molécules d'adhésion à leur surface pour favoriser la migration. Par exemple, VE-cadhérine/CD144, qui empêche la diapédèse, est redistribuée à l'écart des zones de jonctions⁹⁵. A l'inverse, PECAM-1/CD31 et JAM-A sont mobilisés sur la face luminale pour guider les leucocytes vers les jonctions⁹⁶. Cette traversée est aussi dépendante de l'augmentation des taux intracellulaires de calcium, ce qui semble permettre l'ouverture des jonctions entre les CEs (via la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, provoquant la contraction des CEs)⁹⁷.

Le parcours transcellulaire

L'utilisation de cette voie dans le cas de l'inflammation n'est connue que depuis peu de temps et ne représente qu'une minorité des diapédèses ($\approx 5-20\%$). Pourtant, le passage est très rapide (< 1 min). Les conditions et le type de leucocyte utilisant la voie transcellulaire sont dépendants de la nature de l'endothélium. Il a été montré qu'un plus grand nombre de lymphoblastes T utilise cette voie sur un endothélium microvasculaire de peau (30%) que sur des CEs de veine ombilicale humaine (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) (10%)⁹⁸.

Aux sites d'adhésion des neutrophiles sur l'endothélium, il est souvent détecté des organelles vésiculo-vacuolaires (vesiculo-vacuolar organelles, VVO): ce sont des groupes de vésicules et vacuoles en « grappes de raisin » localisés dans le cytoplasme des CEs. Elles constituent un lien direct entre le lumen vasculaire et l'espace extravasculaire⁹⁹. Cependant, à ce jour, ces structures n'ont pas été observées *in vitro*. La migration des leucocytes commence par l'extension de protusions de membranes dans les CEs. La liaison de ICAM-1/CD54 à son ligand déclenche des événements de

signalisation menant à la formation de couloirs membranaires, stabilisés par l'actine et la vimentine, au travers desquels les leucocytes peuvent migrer⁹⁸ (figure 15).

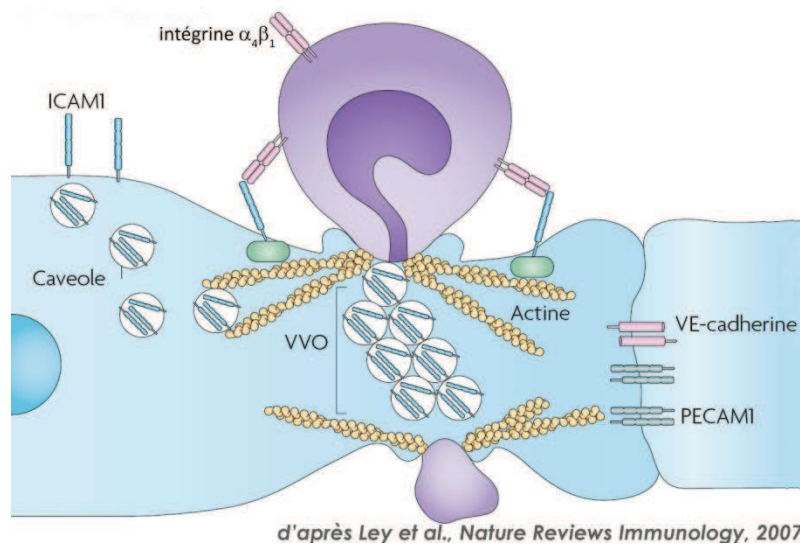


Figure 15 : Transmigration par voie transcellulaire.

Passage de la lame basale

Une fois les CE traversées, les leucocytes doivent migrer à travers la lame basale et les péricytes. La lame basale est composée de laminines et de collagène IV, qui interagissent avec le nidogen2 et le protéoglycane perlecan (composé d'HS). Les péricytes contribuent à sa production ce qui explique qu'un manque en péricyte soit directement associé à une faiblesse en protéine de la lame basale. Ces zones, de moindre résistance, s'élargissent pour laisser migrer les leucocytes. Ces sites sont aussi plus permissifs aux chimioattractants produits dans le tissu extravasculaire, générant ainsi un gradient chimiotactique dans ces zones. Les HS, composants de la lame basale, lient les chimiokines et guident les leucocytes vers les zones de transmigration⁸⁹. La liaison de PECAM-1/CD31 aux leucocytes active les intégrines de la famille β_1 , β_2 et β_3 augmentant ainsi la migration des leucocytes¹⁰⁰.

c. Les molécules d'adhésion de la réponse immunitaire

Les acteurs moléculaires majeurs du recrutement leucocytaire sont les molécules d'adhésion exprimées à la surface des CE et des leucocytes. Certaines molécules, tournées vers le lumen, aident à capturer les leucocytes et les faire rouler vers un site propice. D'autres, entre les CE, augmentent la perméabilité de l'endothélium pour permettre la diapédèse (figure 16).

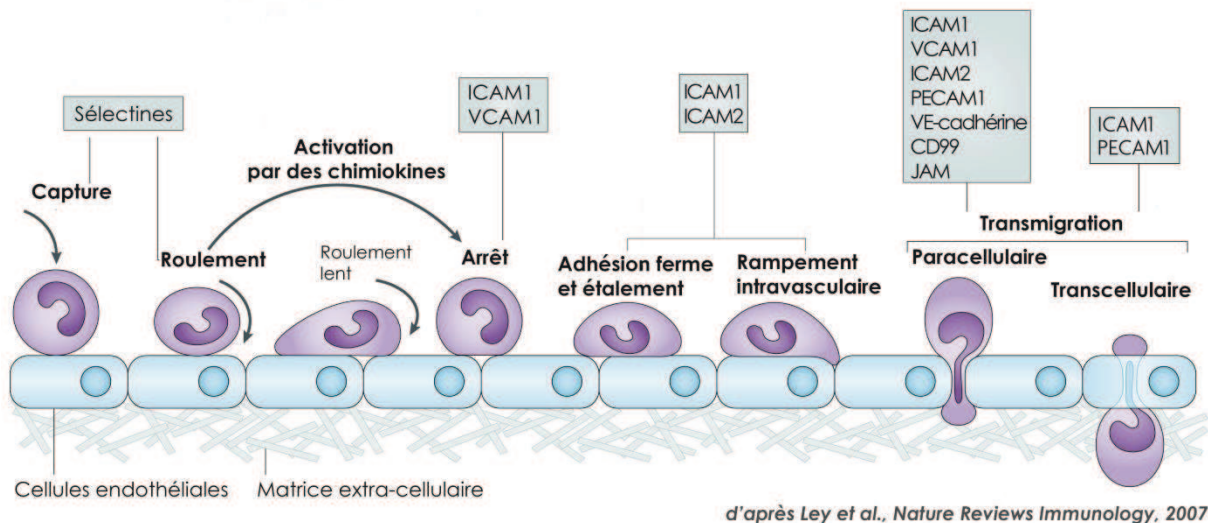


Figure 16 : Cascade de recrutement des leucocytes sur un endothélium et les molécules d'adhésion endothéliales impliquées (dans les encadrés)⁸⁹.

Quelles qu'elles soient, ces molécules sont indispensables, car l'absence de l'une d'elle entraîne une diminution voire l'abolition totale du recrutement⁹⁴. Il est important de remarquer que certaines molécules sont aussi impliquées dans l'angiogenèse. Dans les deux processus, ces molécules diminuent les contacts entre les CEs. La présentation des molécules, qui va suivre, est réalisée dans l'ordre de leur implication lors du recrutement.

i. Les sélectines

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, capables de former des interactions spécifiques entre leur domaine lectine et un ligand de type saccharidique. Les lectines sont constituées d'une suite d'aa comportant un ou plusieurs sites de reconnaissance pour un sucre spécifique. Cela leur confère la capacité de lier spécifiquement des oligosaccharides. La famille des sélectines comprend 3 membres :

- L-sélectine, exprimée sur les leucocytes. Elle est capable de se lier aux adressines CD34, MAdCAM-1 et GlyCAM-1.
- P-sélectine, exprimée sur les plaquettes et les CEs. Son principal ligand est PSGL-1.
- E-sélectine, principalement exprimée sur les endothéliums activés. Elle se lie à ESL-1, aux antigènes sialyl Lewis x et leucocytaire cutané (cutaneous leukocyte antigen, CLA)¹⁰¹.

Les sélectines sont les premières molécules engagées dans la réponse inflammatoire. Elles sont responsables du contact initial entre leucocytes et CEs⁸⁹.

ii. CD34

Comme son nom l'indique, CD34 correspond au cluster de différenciation 34. Cette protéine transmembranaire, fortement glycosylée de 385 aa et 115 kDa, appartient à la famille de sialomucines structurellement apparentées, incluant la podocalyxine et l'endoglycane. Cette famille est caractérisée par la liaison à la L-sélectine¹⁰². CD34 est fortement exprimé dans les hautes cellules endothéliales des organes lymphoïdes secondaires. Cela est expliqué par le rôle des interactions CD34-L-sélectine lors de la domiciliation orientée ou « homing » des lymphocytes vers un tissu. Ceci a été montré par l'observation d'anomalies de recrutement des leucocytes en réponse à un allergène, chez des souris knock-out pour CD34¹⁰³.

Aujourd'hui, cette protéine est surtout décrite comme marqueur de cellules souches hématopoïétiques. L'intérêt s'est rapidement porté sur la capacité des cellules CD34⁺ à reconstituer l'hématopoïèse d'un receveur après transplantation. De ce fait, CD34 est devenu un outil d'une importance considérable dans les pratiques cliniques de transplantation. Le compte des cellules CD34⁺ est aujourd'hui le critère le plus utilisé pour les greffons sanguins.

iii. ICAM-1/CD54

En plus de son rôle dans la migration des CEs lors de l'angiogenèse (décrit précédemment) et de par sa liaison avec les intégrines CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$ ou LFA-1)⁷⁷ et CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$ ou Mac-1)⁷⁸, ICAM-1/CD54 permet l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium et la migration vers un site de diapédèse. Sans *et al.* ont démontré que la seule expression de cette molécule d'adhésion dans des cellules ne l'exprimant pas de façon endogène induit une transmigration efficace¹⁰⁴.

iv. VCAM-1/CD106

VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1) correspond au cluster de différenciation 106. Cette protéine transmembranaire de type I est un membre de la superfamille des immunoglobulines. Cette molécule d'adhésion est exprimée par les CEs activées, les cellules dendritiques et les macrophages.

Comprenant 714 aa et 6 sites de N-glycosylation, VCAM-1/CD106 contient 7 répétitions Ig-like grâce auxquelles elle peut interagir avec les intégrines CD49d/CD26 ($\alpha_4\beta_1$ ou VLA-4) et CD49d/ITGB7 ($\alpha_4\beta_7$). VCAM-1/CD106 n'est pas fortement exprimé dans les endothéliums quiescents, mais il est rapidement surexprimé en réponse à des cytokines inflammatoires. Depuis son identification en 1989 sur les HUVEC, VCAM-1/CD106 est connu pour sa capacité à lier des cellules tumorales et lymphoïdes. En effet, cette molécule d'adhésion est un important médiateur du recrutement des leucocytes aussi bien lors de la phase d'adhésion que de transmigration¹⁰⁵. Une des particularités de VCAM-1/CD106 est que la forme transmembranaire peut être clivée et libérée dans le compartiment extracellulaire. La forme soluble possède une activité importante : elle est capable de stimuler la

migration des CE et l'angiogenèse¹⁰⁶. De plus, VCAM-1/CD106 soluble est chimiotactique pour les leucocytes. Enfin, la perte de cette molécule à la surface cellulaire semble fournir un moyen de régulation de l'adhésion cellulaire.

v. ICAM-2/CD102

ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule-2) correspond au cluster de différenciation 102. Cette protéine transmembranaire de type I est un membre de la superfamille des immunoglobulines. Cette molécule d'adhésion est exprimée par les CE et les leucocytes.

Comprenant 254 aa et 6 sites de N-glycosylation, ICAM-2/CD102 contient 2 répétitions Ig-like grâce auxquelles elle peut interagir avec les intégrines CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$ ou LFA-1) et CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$ ou Mac-1). ICAM-2/CD102 est exprimé à des taux significatifs à la surface membranaire de CE, même sans stimulation par des cytokines. Cela suggère que ICAM-2/CD102 joue un rôle dans la migration transendothéliale constitutive plutôt que induite¹⁰⁷. Plus précisément, la neutralisation de ICAM-2/CD102 par un anticorps spécifique ne modifie pas l'adhésion des leucocytes, mais uniquement la transmigration à travers l'endothélium⁹⁴.

Dans un modèle murin *in vivo* et *in vitro*, l'équipe de Randi a démontré l'implication de ICAM-2/CD102 dans la mise en place de l'angiogenèse, par activation de la migration cellulaire¹⁰⁸.

vi. PECAM-1/CD31

En plus de son rôle dans l'angiogenèse, de part ses liaisons homotypiques, PECAM-1/CD31 est fortement impliqué lors du recrutement leucocytaire et plus particulièrement lors de la transmigration. En effet, Muller *et al.*¹⁰⁹ ont établi qu'un anticorps ou une molécule soluble neutralisant la fonction de PECAM-1/CD31 inhibe la diapédèse, *in vitro*. Cet effet a aussi été observé *in vivo*¹¹⁰. Par l'intermédiaire de cette molécule d'adhésion, des interactions leucocytes-endothélium se forment pour guider le leucocyte vers une jonction et le faire pénétrer à travers la couche de CE.

vii. Molécules d'adhésion des jonctions (Junctional Adhesion Molecules, JAM)

Ces molécules sont des membres de la superfamille des immunoglobulines. Elles sont exprimées par les leucocytes, les plaquettes, les CE et épithéliales. Les JAMs sont impliquées dans des interactions homotypiques et aussi hétérotypiques avec les intégrines $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_M\beta_2$. Ces molécules sont surexprimées et redistribuées à la surface de la cellule en cas d'inflammation, dans le but de contrôler la perméabilité vasculaire et plus particulièrement la diapédèse des leucocytes à travers l'endothélium¹⁰⁶.

viii. CD99

Cette glycoprotéine de surface de 32 kDa est exprimée à la surface des leucocytes et se concentre aux jonctions entre CEs. Elle permet des interactions cellulaires par des liaisons homotypiques. En 2002, Schenkel *et al.* ont démontré que son rôle dans la diapédèse était primordial, car 90% des transmigrations sont stoppées après neutralisation de cette molécule¹¹¹.

d. Les récepteurs de chimiokines et glycosaminoglycannes de la réponse immune

Lors de la réponse immunitaire, une étape importante est l'activation des leucocytes et leur migration vers le site de l'inflammation. Cela est principalement dû aux chimiokines, qui sont capables de former un gradient chimioattractant pour activer et attirer les leucocytes. L'activité des chimiokines s'exerce principalement par liaison à leurs récepteurs couplés aux protéines G. Cette fixation initie une cascade d'évènements intracellulaires aboutissant à l'expression de certains gènes contrôlant l'expression de molécules d'adhésion, la croissance cellulaire, la migration cellulaire et le chimiotactisme.

i. Les chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines sont de petites cytokines, qui peuvent se lier à la surface cellulaire par l'intermédiaire de leurs récepteurs à 7 domaines transmembranaires ou de glycosaminoglycannes. Les chimiokines sont classées en 4 familles nommées selon la position des résidus cystéines conservés à l'extrémité N-terminale de la protéine: CXC, CX₃C, CC et C. Les récepteurs de chimiokines sont subdivisés en 4 classes : CXCR, CX₃CR, CCR et CR selon la famille de leurs ligands (figure 17).

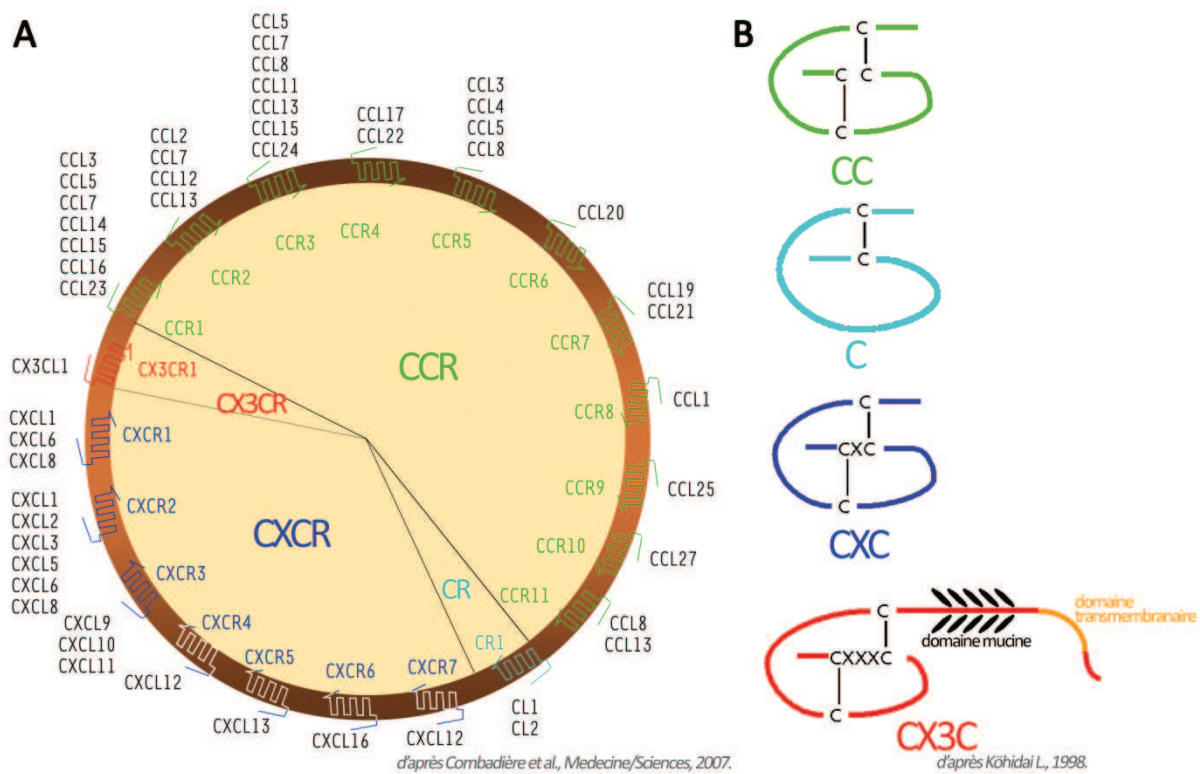


Figure 17 : Classification des récepteurs de chimiokines et de leurs ligands. A : les récepteurs de chimiokines et leurs ligands. B : les 4 familles de chimiokines classées selon leur structure¹¹².

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à 4 récepteurs des chimiokines: CCR5, CCR7, CX₃CR1 et CCR4. Ils ont été choisis pour leur forte implication dans le recrutement des leucocytes et leur rôle dans le contexte tumoral. De plus, ces molécules font l'objet d'études au laboratoire¹¹³.

Le récepteur CCR5 et ses ligands

Plusieurs chimiokines sont capables de se lier à CCR5 : CCL3 (ou macrophage inflammatory protein-1 α MIP-1 α), CCL4 (ou macrophage inflammatory protein-1 β MIP-1 β), CCL5 (ou RANTES, acronyme de « Regulated upon Activation, Normally T-Expressed, and presumably Secreted ») et CCL8 (ou monocyte chemotactic protein-2 MCP-2). Ce récepteur est exprimé aussi bien dans les cellules immunitaires, les cellules des organes lymphoïdes que sur les épithéliums, endothéliums et fibroblastes. CCR5 est le principal récepteur de RANTES. Cette chimiokine permet le recrutement des monocytes et lymphocytes T vers le site tumoral pour une réponse anti-cancéreuse active, par exemple.

Aujourd'hui, CCR5 est largement étudié car il interagit avec la glycoprotéine gp120 du virus VIH-1 pour l'entrée du virus dans les cellules de l'hôte¹¹⁴.

Le récepteur CCR7 et ses ligands, 6Ckine et MIP-3 β

CCL21 (ou 6Ckine) et CCL19 (ou macrophage inflammatory protein-3 β MIP-3 β) sont les ligands du récepteur CCR7. Ces chimiokines sont largement exprimées dans le système lymphatique. CCR7 et ses ligands jouent un rôle primordial dans la domiciliation ou « homing » des lymphocytes naïfs T et B et la migration dans les tissus lymphoïdes.

Au laboratoire, il a été démontré que la 6Ckine se fixe sélectivement sur les CEs de ganglions lymphatiques périphériques et augmente la capacité de l'endothélium à fixer des lymphocytes T¹¹³. Cela n'est pas observé avec d'autres types cellulaires endothéliaux.

Dans le cadre du cancer, CCR7 est exprimé dans nombre de cellules tumorales qui métastasent préférentiellement dans les ganglions lymphatiques. Par exemple, les cellules humaines de cancer du sein sont attirées vers le système lymphatique par l'intermédiaire d'un gradient de 6Ckine¹¹⁵. On retrouve des effets similaires dans le système murin : des cellules de mélanomes B16 exprimant CCR7 métastasent 700 fois plus efficacement dans les ganglions lymphatiques drainants que des cellules B16 qui n'expriment pas ce récepteur¹¹⁶.

Le récepteur CX₃CR1 et son ligand, la fractalkine

L'unique membre de la famille CX₃CR est le récepteur de la fractalkine (CX₃CL1). Cette chimiokine a la particularité d'être sous la forme transmembranaire, ce qui lui permet d'être directement présentée aux cellules circulantes. La forme soluble de la fractalkine est relarguée après clivage de la forme transmembranaire par les métalloprotéinases ADAM10 et 17 (ADAM, acronyme de « a disintegrin and metalloproteinase domain »).

La fractalkine est exprimée préférentiellement dans les tissus de type muqueux tels que l'intestin grêle¹¹⁷ et l'appendice. Lors de sa thèse au laboratoire, Claire Crola Da Silva a visualisé l'expression du récepteur CX₃CR1 sur des CEMs humaines d'appendice et de ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques. Puis elle a mis en évidence l'activité chimioattractante de la fractalkine sur les lymphocytes CEMT4, spécifiquement sur les cellules d'appendice¹¹³. Cela est en concordance avec les résultats de l'équipe de Jung, montrant que l'inactivation du gène codant le récepteur CX₃CR1 entraîne une réduction du recrutement des macrophages^{118,119}. Par ailleurs, le CX₃CR1 est impliqué dans les rejets de greffes cardiaques, l'absence de CX₃CR1 diminuant l'infiltration des lymphocytes tueurs naturels (natural killer NK) sur le site de la greffe et augmentant le temps de survie du greffon¹²⁰. Dans le contexte tumoral, de fortes concentrations de fractalkine au niveau des tumeurs colorectales augmentent le recrutement des lymphocytes infiltrant les tumeurs et la survie du patient¹²¹.

Le récepteur CXCR4 et son ligand, SDF-1

Le récepteur CXCR4 possède un seul ligand : CXCL12 (stromal cell derived factor-1, SDF-1). Ce récepteur est exprimé par un grand nombre de type cellulaire, dont les leucocytes, les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse, les CEs, les neurones...¹²²

Initialement, CXCL12 était considéré comme un chimioattractant pour les lymphocytes B, uniquement. En fait, cette chimiokine permet la survie ou la croissance d'une grande variété de cellules normales ou tumorales¹²³. Récemment, un deuxième récepteur pour cette chimiokine a été découvert : CXCR7. Ce récepteur a une très forte affinité pour CXCL12 et entre en compétition avec la liaison de CXCL12 avec CXCR4. CXCR7 agit principalement comme un récepteur-leurre, car une fois lié à CXCL12, aucune signalisation intracellulaire n'est induite¹²⁴.

CXCR4 est le récepteur de chimiokines le plus communément surexprimé dans les cellules tumorales¹²⁵. Il est fortement impliqué dans la formation des métastases, car la stimulation de cellules tumorales par CXCL12 augmente leur migration, leur invasion et facilite leur adhésion¹²⁶. Par exemple, des cellules B16 de mélanomes murins surexprimant CXCR4 forment des métastases 6 à 10 fois plus que des cellules B16 natives. L'accumulation des cellules cancéreuses se fait alors préférentiellement dans les poumons, fort producteur de CXCL12¹²⁷.

ii. Les glycosaminoglycannes (GAG)

Les protéoglycannes sont des macromolécules complexes, composés d'un squelette polypeptidique sur lequel sont liés de façon covalente des chaînes de glycosaminoglycannes (figure 18A). Ils sont principalement trouvés dans la matrice extracellulaire ou associés à la surface des cellules. Les GAGs sont de long polysaccharides composés d'unités disaccharidiques répétées (alternativement acide uronique et sucre aminé) et souvent sulfatés. Les 4 chaînes saccharidiques les plus fréquemment rencontrés dans la physiologie sont la chondroïtine sulfate (CS), l'héparanne sulfate (HS), le kératane sulfate et l'acide hyaluronique (figure 18B).

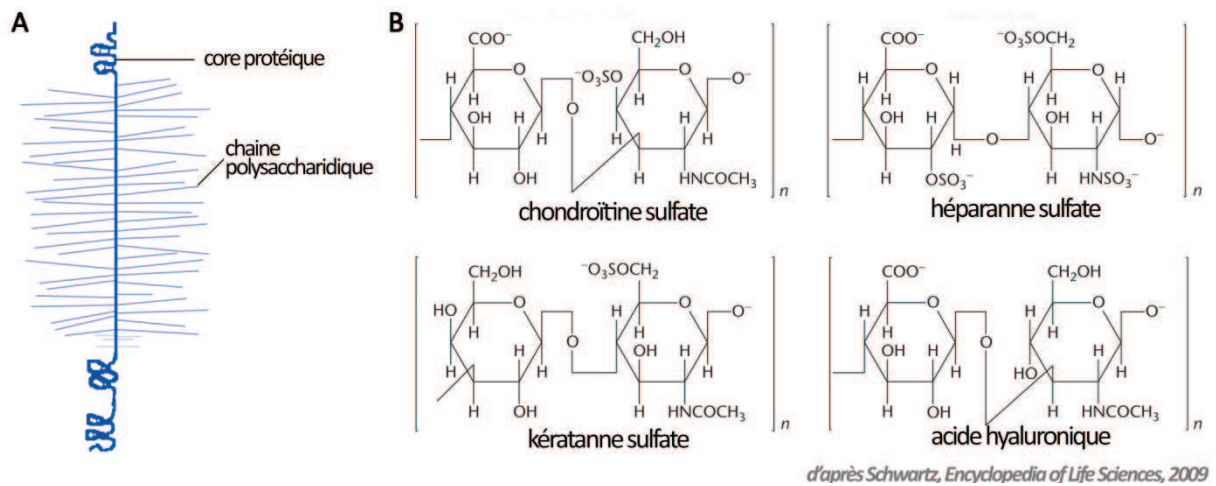


Figure 18 : Structure des protéoglycannes. A : représentation schématique de protéoglycannes. B : les 4 principales unités répétées dans les glycosaminoglycannes¹²⁸.

Ces longues chaînes peuvent se lier à des chimiokines de façon spécifique, selon la nature du GAG et de la chimiokine. Ces interactions sont aussi dépendantes du type cellulaire¹¹³. La liaison des chimiokines aux GAGs a un rôle biologique considérable. D'une part, les chimiokines se protègent d'éventuelles dégradations protéolytiques en se fixant aux GAGs. D'autre part, les interactions chimiokines/GAGs favorisent leur concentration à la surface cellulaire et contribuent à l'établissement du gradient chimiotactique qui attire les leucocytes circulants¹²⁹. Enfin, cela permet d'augmenter leur avidité et de favoriser la présentation de la chimiokine à son récepteur.

La Chondroïtine Sulfate (CS)

Les plus abondants glycosaminoglycannes sont les chondroïtines sulfates. Leurs unités répétées disaccharidiques se composent de N-acétylgalactosamine, sulfaté en C4 et/ou C6, et d'acide glucuronique. Les unités sont répétées 30 à 50 fois. De cette variabilité résultent différentes CS (A, B, C, D, E).

Dans le cadre des cancers, les GAGs ont des fonctions importantes dans la modulation de la croissance tumorale et dans la formation des métastases. Par exemple, la CS est augmentée dans de nombreux cancers et active les kinases (FAK, ERK) impliquées dans la migration des cellules tumorales¹³⁰.

L'Héparanne Sulfate (HS)

L'HS est composé d'unités répétées de N-acétylglucosamine, sulfaté en C6, et d'acide iduronique. L'HS a une grande variété de fonctions biologiques. Premièrement, il sert de co-récepteur en liant divers ligands. Pour exemple, un grand nombre d'études *in vitro* et *in vivo* ont examiné le rôle de l'HS dans l'activité du VEGF : l'HS semble être essentiel pour empêcher spatialement le VEGF de créer un

gradient autorisant la néovascularisation. L'HS peut aussi réactiver le VEGF endommagé par oxydation, ce qui est essentiel dans les zones en hypoxie où des vaisseaux sanguins sont nécessaires. L'HS peut aussi potentialiser la liaison du VEGF à ces récepteurs spécifiques permettant une transduction du signal plus efficace¹³¹.

Deuxièmement, certains protéoglycannes HS modulent la signalisation des intégrines, dans le but d'influencer l'adhésion et la motilité des cellules¹³².

Troisièmement, les HS régulent aussi la distribution tissulaire de chimiokines, pour la formation de gradients chimiotactiques pour recruter les neutrophiles au site d'inflammations^{133,134}.

Les protéoglycannes HS sont des indicateurs pronostics dans plusieurs cancers (par exemple, le glypican-3 est augmenté lors de mélanome)¹³⁵, ce qui montre l'importance de ce GAG dans les étapes importantes de la tumorigenèse. Par exemple, la croissance tumorale et l'angiogenèse sont activées de par son rôle de co-récepteur pour certains facteurs de croissance. Par contre, les protéoglycannes sécrétés par les cellules normales fonctionnent comme une barrière empêchant le passage des cellules tumorales à travers la MEC¹³⁶.

4. LE MONOXYDE D'AZOTE (NO[•])

Jusqu'alors nous avons décrit les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'angiogenèse et la réponse immunitaire lors de la progression tumorale. Puis, nous avons montré que la reconnaissance cellulaire est primordiale dans ces phénomènes et assurée par plusieurs molécules d'adhésion. Enfin, nous avons introduit le rôle du monoxyde d'azote (NO[•]) dans le processus tumoral. Donc, avec les molécules d'adhésion, le NO[•] est une des molécules régulatrices majeures de l'angiogenèse et de l'inflammation anti-tumorale.

a. Présentation

Molécule décrite comme vasodilatateur en 1979 puis étudié sous le nom d'EDRF en 1980, le monoxyde d'azote ou NO[•] a été élu « molécule de l'année 1992 »¹³⁷ par le magazine Science, mesurant l'explosion des démonstrations de son importance dans la physiologie et de ses applications biologiques. Par la suite, Furchgott, Ignarro et Murad ont reçu le prix Nobel de médecine, en 1998, pour leur travail menant à la découverte du NO[•] comme médiateur biologique dans le système cardiovasculaire.

Le NO[•] est sous forme de gaz, dans les conditions normales de pression et de température. C'est un radical libre non chargé, ce qui lui permet de participer à des réactions comme un faible oxidant ou comme un réducteur.

Le NO[•] est synthétisé par un grand nombre de types cellulaires (CEs, macrophages, neurones...) et agit comme un effecteur autocrine et/ou paracrine. Il possède une demi-vie de moins de 5 secondes, mais cela est dépendant des molécules environnantes (notamment superoxide O₂⁻) avec lesquels le NO[•] peut réagir. Sa « sphère d'influence » est d'environ 100 μm à partir du point de production, selon des modèles théoriques¹³⁸, ce qui en fait un médiateur local.

b. Synthèse du NO[•]

La L-Arginine est le précurseur du NO[•]. L'oxydation de la L-arginine en L-citrulline se fait par les NO synthases par deux réactions successives de monooxygénation, avec la N^ω-hydroxy-L-Arginine comme intermédiaire¹³⁹. 2 moles de O₂ et 1,5 mole de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) sont consommées par mole de NO[•] formé (figure 19).

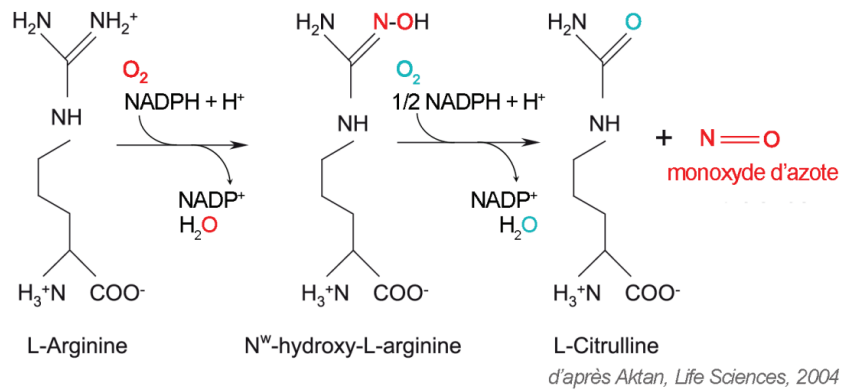


Figure 19 : La réaction de synthèse du NO[•] à partir de la L-Arginine¹⁴⁰.

Une autre réaction utilise la L-Arginine comme substrat : la dégradation de la L-Arginine en L-ornithine et urée, par l'arginase. Cette réaction est en compétition avec celle de la synthèse du NO[•], ce qui module indirectement les concentrations locales de NO[•].

c. NO Synthèses

i. Généralités

La synthèse de NO[•], à partir de l'arginine, est catalysée par une des 3 formes de la NO Synthase (EC 1.14.13.39):

- NOS1 ou nNOS : NOS neuronale (161kDa)
- NOS2 ou iNOS : NOS inductible (131kDa)
- NOS3 ou eNOS : NOS endothéliale (133kDa)

Identifiées en 1989, les 3 isoformes de la NOS ont été clonées et purifiées entre 1991 et 1994. Les NOS présentent des localisations cellulaires, des régulations et des propriétés catalytiques diverses, ainsi qu'une homologie de 51-57%. Les quantités de NO[•] produites sont très différentes selon l'isoforme. Les NOS1 et 3 sont constitutives et permettent de maintenir un taux basal assez faible de NO[•], alors que la NOS2 est exprimée en réponse à un stimulus et produit de fortes concentrations en NO[•] sur un temps court. Selon la/les NOS active(s), les taux cellulaires locaux en NO[•] sont variables de quelques nM à quelques μM.

Pour être actives, les NOS doivent être sous la forme d'homodimères. Chaque monomère possède une structure en deux domaines : réductase et oxygénase. Le domaine réductase contient les sites de liaisons pour la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et le NADPH. La partie C-terminale de ce domaine est liée par le site de reconnaissance de la calmoduline (CaM) à la partie N-terminale du domaine oxygénase. Celui-ci contient les sites de liaison pour l'hème, la tetrahydrobiopterine (BH₄) et la L-Arginine¹⁴¹⁻¹⁴³ (figure 20).

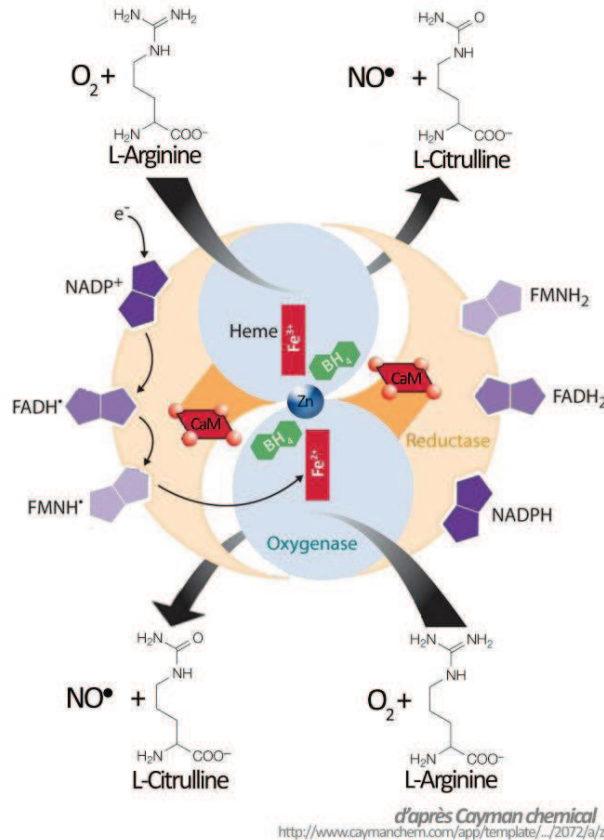


Figure 20 : Production de NO[•] par une NOS. Pour produire du NO[•], les NOS doivent être sous la forme de dimères et liées à la calmoduline. En présence de ses cofacteurs (FMN, FAD, NADPH et BH₄), l'enzyme est active et catalyse l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline et NO[•].

Lorsque la NOS est sous forme de dimère et que les différents cofacteurs (NADPH, BH₄, FAD, FMN, CaM) sont présents, le domaine réductase d'un monomère peut transférer les électrons de NADPH vers FAD puis FMN et enfin vers l'hème du domaine oxygénase de l'autre monomère. Ainsi activée, la NOS utilise l'oxygène moléculaire et les électrons pour oxyder la L-Arginine en N^ω-hydroxy-L-Arginine, elle-même oxydée en NO[•] et L-citrulline¹⁴⁴.

Aux concentrations basales en calcium dans la cellule, la CaM présente une faible affinité pour les NOS constitutives, mais est fortement liée à la NOS2. Cela explique que l'activité des NOS1 et 3 soient dépendantes de l'augmentation des concentrations intracellulaires en Ca²⁺. Au contraire, la NOS2 est indépendante du calcium et constitutivement active.

Les NOS sont capables de former un autre radical : l'ion superoxyde O₂⁻. Ce facteur est produit lorsque manquent certains cofacteurs nécessaires à la synthèse de NO[•], comme la L-Arginine ou la BH₄. De même, O₂⁻ est augmenté lorsque les NOS sont en monomères, ou sous l'action de molécules : la sérotonine, par exemple^{145,146}.

ii. Les différentes isoformes

NOS1 ou nNOS

La NOS1 est exprimée dans les neurones, les muscles squelettiques et l'épithélium du poumon. Le NO^{*} produit agit principalement comme un neurotransmetteur.

NOS2 ou iNOS

Le gène de la NOS2 est situé sur le chromosome 17¹⁴⁷. Cet isoforme n'est pas exprimé dans les cellules quiescentes, mais est rapidement et fortement induit en réponse à une stimulation. La NOS2 a été, tout d'abord, décrite dans les macrophages pour son rôle dans leur activité cytotoxique¹⁴⁸. Par la suite, l'activité de la NOS2 a été trouvée dans d'autres types cellulaires et tissus : chondrocytes, cellules de Kupffer, hépatocytes, fibroblastes, ostéoclastes, astrocytes, CEs et épithéliales, neutrophiles, tissu vasculaire et tumoral, épithélium pulmonaire et intestin¹⁴⁹. La NOS2 est induite par un grand nombre de stimuli : lipopolysaccharide (LPS), médiateurs pro-inflammatoires endogènes (TNF α , IL1 β , IFN γ)¹⁵⁰, hypoxie¹⁵¹... Nombre de publications démontrent que l'utilisation des cytokines doit se faire en combinaison de plusieurs molécules pour avoir une expression de la NOS2 importante, alors qu'un seul stimulus ne produirait qu'un effet modéré. Cela suggère que deux ou plusieurs signaux sont nécessaires pour activer l'expression de la NOS2. Ces différentes voies de régulation de l'expression de la NOS2 sont présentées sur la figure 21.

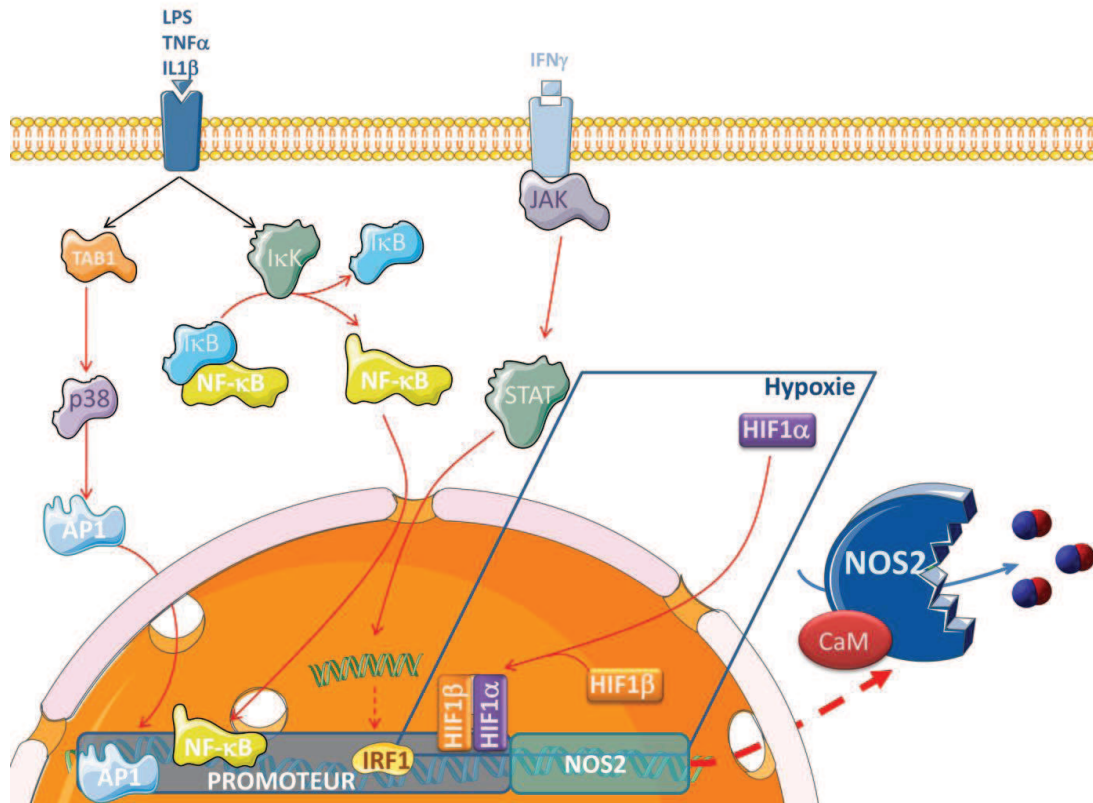


Figure 21 : Signalisation intracellulaire aboutissant à l'induction de l'expression de la NOS2 par des cytokines inflammatoires ou l'hypoxie.

Les cytokines telles que le $TNF\alpha$ ou l' $IL1\beta$ ou les endotoxines comme le LPS sont capables d'activer le promoteur de la NOS2 par l'intermédiaire de deux voies de signalisation : La première fait intervenir le facteur de transcription nommé AP1 (pour activator protein-1). La deuxième voie régule l'expression génique de la NOS2 en dissociant le facteur de transcription NF- κ B (pour « nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ») de son inhibiteur (Inhibitor of κ B I κ B), grâce à la kinase I κ K. L' $IFN\gamma$ utilise, quant à lui, la voie de signalisation JAK-STAT (pour « Janus kinase » - « Signal Transducers and Activator of Transcription »). Une fois activé, STAT active l'expression du facteur de régulation de l'interféron (Interferon regulatory factor 1, IRF1), qui est capable d'activer le promoteur de la NOS2. Enfin, le promoteur possède un élément de réponse à l'hypoxie activé par le couple HIF1 α -HIF1 β . Une fois produite, la NOS2 génère une concentration importante de NO° .

NOS3 ou eNOS

Le gène de la NOS3 est situé sur le chromosome 7¹⁴⁷. Cette enzyme est exprimée de façon constitutive dans les CE, les cardiomyocytes, les cellules pyramidales de l'hippocampe¹⁵².

Une spécificité de la NOS3, par rapport aux autres NOS, est sa localisation membranaire. En effet, dans les cellules à l'état basal, la majorité de la NOS3 est localisée dans des régions spécifiques de la membrane, appelées « cavéoles ». Ces invaginations sont riches en cholestérol, sphingolipides et en

une protéine transmembranaire : la cavéoline. La rigidité de ces régions facilite certaines interactions protéines-protéines, nécessaires à l'induction de voies de signalisation¹⁵³. L'interaction cavéoline-NOS3 permet d'inhiber la production de NO[•], en empêchant la CaM de se lier au complexe. Après stimulation par des agonistes (bradykinine, acétylcholine, VEGF, Histamine, Sphingosine 1 phosphate...), des pulses/flux de calcium sont libérés par le réticulum endoplasmique. Le couplage calcium-CaM, avec l'aide de la protéine de choc thermique 90 (heat shock protein 90, hsp90), permet de séparer la NOS3 de la cavéoline. Cette dissociation active la NOS3 à produire du NO[•]. Après une stimulation prolongée, le complexe NOS3-calmoduline se dissocie, l'enzyme est recyclée en étant transloquée vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. A ce niveau, la NOS3 se réassocie à la cavéoline et peut alors se lier de nouveau à la membrane plasmique¹⁵⁴.

Plus précisément, les agonistes et mécanismes mécaniques utilisent plusieurs voies de signalisation pour réguler l'activité de la NOS3 (figure 22).

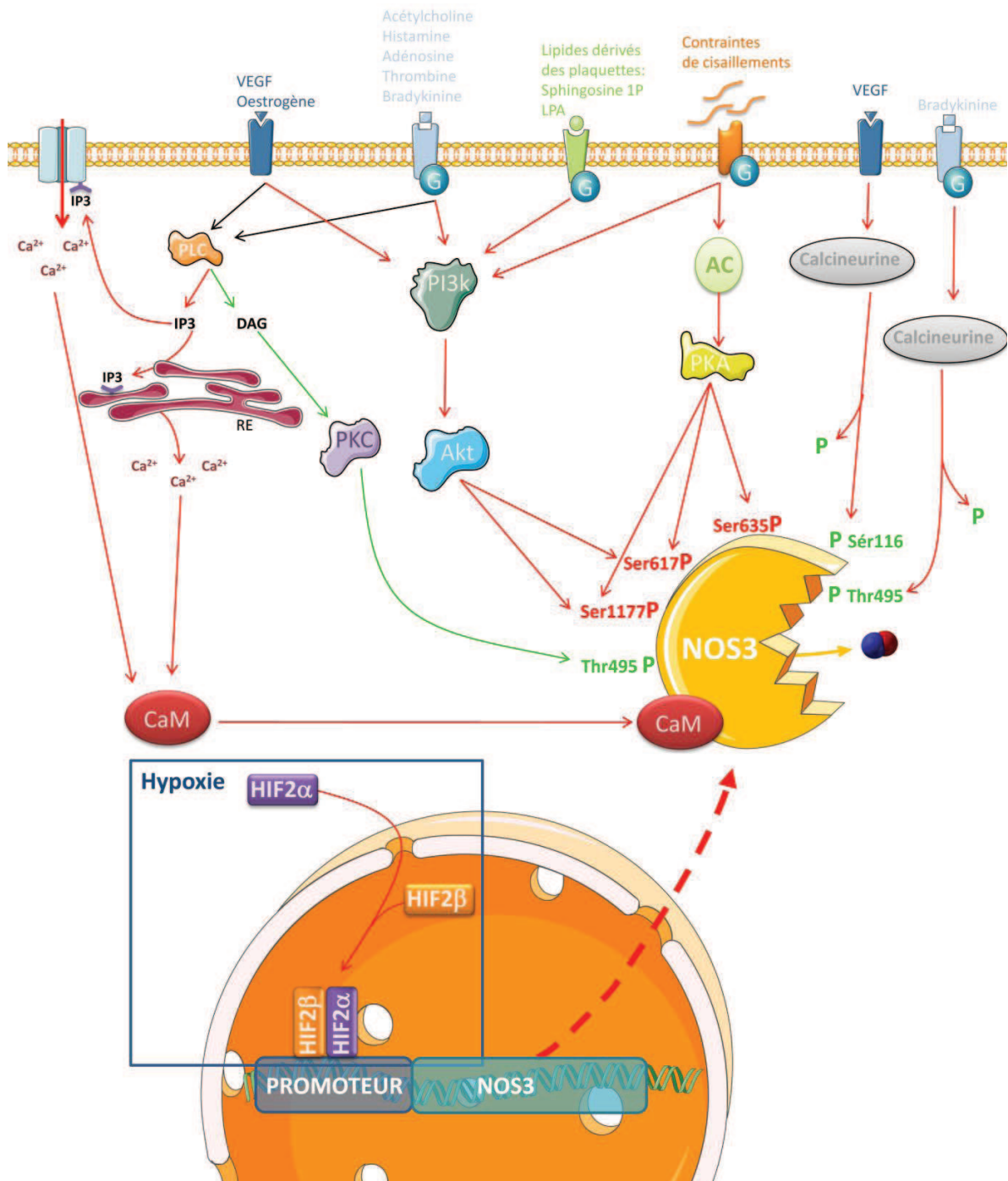


Figure 22 : Signalisations intracellulaires de la régulation de l'expression et de l'activité de la NOS3. Pour une bonne lisibilité de la figure, la NOS3 n'a pas été représentée associée à la membrane.

Le mécanisme principal de régulation de la NOS3 provient de modifications post-traductionnelles : la phosphorylation des résidus sérine 1177, 617 et 635 pour son activation et des résidus thréonine 495 et sérine 116 pour son inhibition. Divers agonistes (dont VEGF et bradykinine) sont capables d'activer plusieurs voies de signalisation :

- Voie de la phospholipase C (PLC) : l'inositol tri-phosphate (IP3), formé par hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, est capable de se lier à ces récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique (RE) ou de la membrane. Cela a pour but de libérer du calcium (Ca^{2+}) et en conséquence d'activer la CaM. Celle-ci se lie alors à la NOS3 pour l'activer.

Le diacylglycérol (DAG), le 2^{ème} produit de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, a un effet inhibiteur sur la NOS3. Le DAG active la protéine kinase C (PKC) pour phosphoryler le résidu thréonine 495.

- Voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3k) : la formation de phosphoinositides par la PI3k est nécessaire à l'activation de la protéine kinase B (PKB ou Akt). Cette voie est hautement activatrice puisque Akt phosphoryle les résidus sérine 1177 et 617. Cette voie est aussi activée par les contraintes de cisaillement et certains produits des plaquettes (Sphingosine 1 phosphate et acide lysophosphatidique (LPA)).
- Voie de la calcineurine : cette phosphatase a une cible différente (sérine 116 ou thréonine 495) selon qu'elle soit activée par le VEGF ou la bradykinine, respectivement. Dans tous les cas, son rôle est activateur de la NOS3.

Les contraintes de cisaillement sont aussi capables d'activer l'adénylate cyclase (AC), qui, elle-même, permet la phosphorylation des 3 résidus activateurs, par l'intermédiaire de la protéine kinase A (PKA).

En hypoxie, la voie d'activation de la NOS3 par le VEGF est accentuée, car le complexe HIF1 α -HIF1 β augmente la transcription et la stabilité de l'ARNm du VEGF. De plus, l'hypoxie a récemment été démontrée comme régulateur direct de la NOS3 humaine : Au niveau génique, Coulet *et al.*⁶ ont identifié un élément de réponse à l'hypoxie dans la séquence promotrice de la NOS3. La protéine de la NOS3 est donc surexprimée en hypoxie¹⁵⁵ et active¹⁵⁶. Au niveau de son activité, l'anoxie et l'hypoxie permettent une réduction des nitrites en NO^* , alors que l'oxygène est indispensable à la production classique de NO^* par la NOS3. Cette production est indépendante de la L-Arginine et uniquement observée avec la NOS3¹⁵⁷.

d. Mécanismes moléculaires de l'action du NO^*

i. Effets directs du NO^*

Le mécanisme principal par lequel le NO^* induit une transduction de signal est l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs). Le NO^* est capable de lier l'hème de la GCs, présent sur la sous-unité β . Cela active l'enzyme et permet une augmentation de 100 fois de la conversion de guanosine

triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc)¹⁵⁸. Cette réaction est à la base de nombreuses fonctions physiologiques telles que la vasodilatation, l'agglutination plaquettaire et la neurotransmission. La liaison du NO[•] à un hème ferrique est aussi responsable de l'inhibition de la cytochrome C oxydase et de l'oxydation réversible de l'hémoglobine.

ii. Effets dépendants des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote

Hormis ces mécanismes directs, plusieurs effets indirects sont attribués au NO[•]. Les réactions du NO[•] avec l'oxygène et des intermédiaires réactifs de l'oxygène peuvent produire des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (reactive nitrogen species RNS). Celles-ci sont à l'origine des stress oxydant, nitrosant et nitrant, visualisés sur la figure 23.

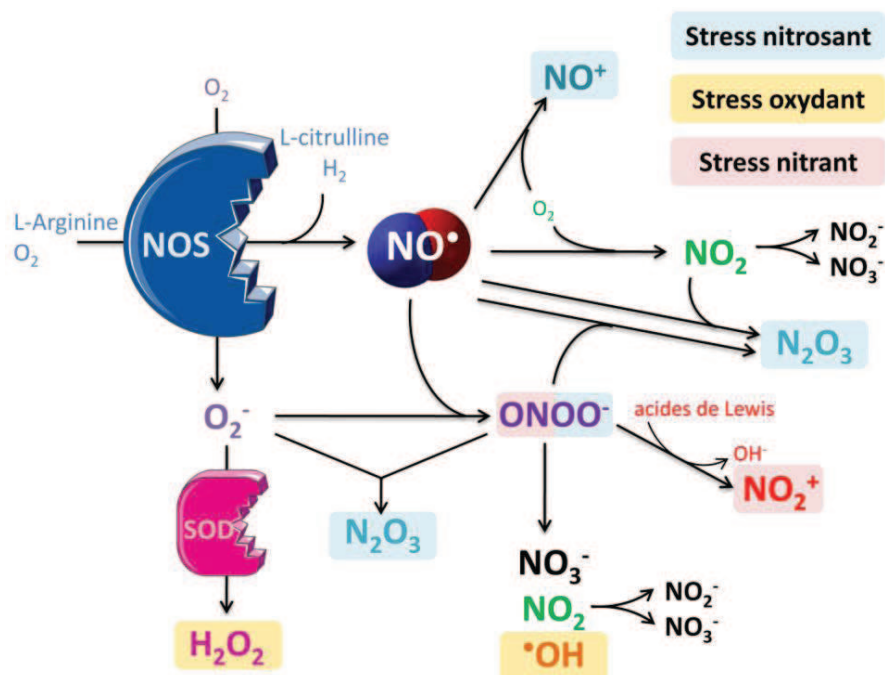


Figure 23 : Mécanismes chimiques du NO[•] et stress associés.

Produit à faibles concentrations et en présence d'oxygène, le NO[•] est converti en dioxyde d'azote NO₂, qui est métabolisé en nitrites NO₂⁻ et nitrates NO₃⁻. Cependant, en manque en certains cofacteurs comme la L-Arginine ou la BH₄, les NOS sont capables de former l'ion superoxyde O₂⁻. En présence de fortes concentrations de NO[•], O₂⁻ peut alors former du peroxyde ONOO⁻, un fort oxydant et nitrant¹⁵⁹. La décomposition de ONOO⁻ produit NO₃⁻, NO₂ et un radical hydroxyl OH[•], considéré comme le radical le plus oxydant rencontré en physiologie¹⁶⁰.

En présence d'ion cuprique ou d'autres acides de Lewis, ONOO⁻ est clivé en anion hydroxyde OH⁻ et cation nitronium NO₂⁺. Il peut réagir avec un résidu tyrosine pour former des nitrotyrosines¹⁶¹. Par l'intermédiaire de cette nitration irréversible, ONOO⁻ peut inhiber la phosphorylation des tyrosines, mimer une phosphorylation irréversible et, par conséquent, altérer la fonction de la protéine. Ces

modifications ont été détectées dans divers phénomènes pathologiques : athérosclérose, arthrite rhumatoïde ou maladie de Charcot¹⁴⁹.

Le stress nitrosant est principalement induit par le trioxyde d'azote N_2O_3 . Ce composé, formé de façon dépendante ou indépendante du $ONOO^-$, est responsable de la nitrosation réversible des thiols et des amines pour donner des S-nitrosothiols et des nitrosamines, respectivement. Ces derniers sont capables de transnitrosation sur d'autres thiols et de relarguer du NO^\bullet . Mais le NO^\bullet ou le NO^+ sont aussi capables de former directement des nitrosothiols. La S-nitrosation provoque des modifications conformationnelles modifiant l'activité des enzymes (enzymes de réparation de l'ADN, protéines en doigt de zinc, facteurs de transcription...). Dans certains cas, les protéines perdent leur fonction. Cependant, la S-nitrosation n'a pas seulement des effets néfastes, puisqu'elle a été montrée comme régulant la fonction de nombreuses protéines intracellulaires (NOS, caspases, facteurs de transcription, GTPases...)¹⁶². Par exemple, la NOS3 est inhibée par S-nitrosation à l'état basal. Les groupements nitroso- sont éliminés lorsque l'enzyme est activée par des kinases¹⁶³.

e. Les fonctions physiologiques du NO^\bullet

Le NO^\bullet est produit principalement par les CEs, les macrophages et les neurones. Il a donc principalement ses actions au niveau des vaisseaux sanguins, dans l'immunité et dans le système nerveux.

i. Dans le système vasculaire

Produit par les CEs, le NO^\bullet diffuse vers les cellules musculaires lisses. A ce niveau, il active la GCs pour former du $GMPc$, qui sera converti en acide guanylique par la cGMP phosphodiesterase. Cette conversion a des effets sur différentes cibles (protéines kinases, phosphodiesterases et canaux ioniques) responsables de la relaxation des muscles lisses et, par voie de conséquence, sur la vasodilatation des vaisseaux sanguins¹⁶⁴. Le NO^\bullet a aussi un effet inhibiteur sur l'agglutination et l'adhésion plaquettaire, via l'augmentation du $GMPc$ ¹⁶⁵. Il est important de remarquer que les concentrations en NO^\bullet physiologique (dans le système cardiovasculaire et dans les plaquettes) sont très basses (pM à nM).

ii. Dans le système immunitaire

Dans le cadre de l'inflammation, le NO^\bullet synthétisé par l'endothélium est un inhibiteur puissant de l'activation des cellules inflammatoires et de l'activité des monocytes¹⁶⁶. Quand les concentrations produites sont fortes, le NO^\bullet devient toxique ; cette propriété est utilisée par les cellules inflammatoires (principalement les macrophages) en réponse à des pathogènes ou des cellules

tumorales, pour induire l'apoptose. Enfin, le NO[•] agit comme un protecteur des infections parasitaires par des actions cyostatiques et cytotoxiques sur les micro-organismes¹⁶⁷.

iii. Dans le système nerveux

En tant que neuromédiateur, le NO[•] joue un rôle majeur dans le contrôle de l'activité neuronale de différentes régions du système nerveux central (cortex cérébral, cervelet, hippocampe et hypothalamus), mais il intervient également dans la plasticité neuronale¹⁶⁸.

f. NO[•] et cancer

i. Production du NO[•] dans les tumeurs

Le microenvironnement tumoral est souvent riche en NO^{•35}. Cette production accrue de NO[•] peut être originaire de plusieurs types cellulaires :

- Les cellules tumorales : l'expression de la NOS2 a été observée dans plusieurs types de cancers, comme par exemple le mélanome¹⁶⁹. Son activité est aussi plus forte que dans les tissus sains⁵⁸.
- Les CEs : L'expression des NOS2 et 3 est augmentée par l'hypoxie, par l'intermédiaire de HIF, mais aussi par les cytokines inflammatoires, présentes dans les zones tumorales^{6,57}. De plus, l'activité des NOS est augmentée dans les CEs à proximité des tumeurs. Dans le cas de la NOS3, la forte production de VEGF en hypoxie est en partie responsable, de même que l'activité nitrite réductase de la NOS3 en anoxie¹⁵⁷. Enfin, la xanthine oxidase est exprimée dans un grand nombre d'organes dont l'endothélium. Cette enzyme est capable de réduire les nitrites et les nitrates en NO[•], préférentiellement en hypoxie¹⁷⁰.
- Les TAM : Les macrophages infiltrant la tumeur surexpriment la NOS2 et le NO[•] produit peut avoir une activité tumoricide³⁵.

Cette surproduction de NO[•] dans le microenvironnement tumoral induit des modifications dans la physiologie des cellules proches de la tumeur et est impliquée dans la progression tumorale.

ii. Rôle du NO[•] dans le développement d'un cancer

Le NO[•] est impliqué à plusieurs niveaux dans la cancérogenèse:

- la transformation des cellules normales
- la croissance des cellules transformées
- l'angiogénèse
- l'invasion des cellules malignes

Il régule aussi des mécanismes modulant le potentiel agressif des cellules tumorales, comme l'apoptose, la réponse immune et la sélection des cellules tumorales. Dans chaque étape, l'action du NO[•] est multifactorielle et souvent distincte selon le microenvironnement de la tumeur, la concentration en NO[•] et le type cellulaire. Nous allons présenter ici les principales données connues à ce jour sur le rôle de NO[•] dans les différentes étapes de la cancérogenèse.

NO[•] et initiation de la tumeur

Les nitrosamines formées à partir de NO[•] sont des substances hautement carcinogènes¹⁷¹. L'effet des nitrosamines est à l'origine de la nitrosation des bases de l'ADN, ce qui provoque leur déamination par des conversions mutagènes ou carcinogènes (les plus fréquentes étant G:C en A:T)¹⁷². Les ROS peuvent aussi provoquer des cassures doubles ou simples brins de l'ADN pendant la réplication et la transcription¹⁷³. D'autre part, le stress nitrosant affecte les protéines de réparation de l'ADN, car les motifs en doigts de zinc sont détruits et les protéines perdent leur activité¹⁷⁴. En comparant ces 2 phénomènes, il semblerait que l'inhibition des protéines de réparation de l'ADN nécessite des concentrations en NO[•] 100 fois moindres que les modifications directes de l'ADN¹⁷⁵.

A l'inverse de ces effets mutagènes, le NO[•] produit par les cellules de Kupffer, les lymphocytes NK et les CEs a un effet cytotatique et/ou cytotoxique sur les cellules tumorales¹⁴⁹.

NO[•] et angiogenèse

Le rôle du NO[•] comme médiateur de l'angiogenèse a été maintes fois démontré et est admis dans la communauté scientifique, son effet reste cependant controversé. Les causes principales sont que le NO[•] a démontré des effets pro-et anti-angiogéniques et que malgré les études, peu de mécanismes moléculaires ont été élucidés. Toutefois, Jones *et al.*¹⁷⁶ ont commencé à élucider le rôle du NO[•] sur l'angiogenèse : il serait dépendant de sa concentration. En faibles concentrations, le NO[•] participe à la formation des capillaires et à la migration cellulaire, par l'activation de la pKC, de ERK et la phosphorylation de jun, alors qu'en fortes concentrations, le NO[•] diminue les réponses angiogéniques.

Mais la dualité du NO[•] ne s'arrête pas là : le NO[•] a des effets opposés sur le VEGF. Le VEGF induit l'activation de la NOS3 et permet la libération de NO[•], indispensable à la formation des néovaisseaux¹⁷⁷. A l'opposé, le NO[•] est capable d'augmenter ou de diminuer la production de VEGF par modulation de l'expression de HIF1 α ¹⁷⁸.

Le rôle du NO[•] dans l'angiogenèse n'est pas limité à l'activation cellulaire. Le NO[•] interfère avec la synthèse et la production des MMP-1, -2, -3, et -9, indispensables à l'invasion de la tumeur par les CEs¹⁴⁹.

Enfin, de façon très intéressante, le NO[•] diminue *in vitro* l'expression de molécules d'adhésion induites par le TNF- α telles que VCAM-1, ICAM-1 et, dans certains cas, E-sélectine¹⁷⁹⁻¹⁸². Or ces molécules sont impliquées dans plusieurs mécanismes cruciaux de l'angiogenèse et du processus cancéreux: la migration des CEs, la reconnaissance des leucocytes par l'endothélium lors de la réaction immunitaire anti-tumorale et l'adhésion des cellules cancéreuses sur l'endothélium. Cependant, la régulation de ces phénomènes de reconnaissance cellulaire par le NO[•] n'est à ce jour que peu étudiée.

NO[•] et flux sanguin

Le rôle principal du NO[•] est de relaxer les cellules musculaires lisses à proximité des CEs, par l'intermédiaire de la production de GMPc. Cela permet de réguler la constriction des vaisseaux sanguins. Cependant, les structures vasculaires au sein d'une tumeur ont une structure désorganisée, immature sans cellule contractile. Par conséquent, le NO[•] n'est pas/peu impliqué dans le contrôle du flux sanguin des néovaisseaux tumoraux.

NO[•], invasion et métastases

Là encore, le NO[•] a un effet opposé selon qu'il est produit par les NOS endothéliale ou inducible. D'une part, une expression élevée de la NOS3 dans les micro-vaisseaux proche de la tumeur prédit une survie augmentée en limitant la formation de métastases, dans les cancers colorectaux. Plus exactement, le NO[•] inhibe l'adhésion des cellules tumorales aux vaisseaux et par voie de conséquence l'invasion¹⁴⁹.

Au contraire, la NOS2 favorise l'invasion par les cellules tumorales. Par exemple, les cellules murines d'adénocarcinome n'exprimant pas la NOS2 *in vitro*, semblent l'exprimer de manière active lorsqu'elles sont introduites chez l'animal où elles sont hautement métastatiques¹⁸³. Une autre étude montre que 2 clones de cellules cancéreuses du sein ont un potentiel métastatique dépendant de leur taux d'expression de la NOS2¹⁸⁴.

NO[•] et réponse immunitaire

Comme expliqué précédemment, le NO[•] peut agir sur le système immunitaire en inhibant l'expression de plusieurs molécules d'adhésion, provoquant l'inhibition de l'adhésion des leucocytes et de leur infiltration vers le tissu tumoral.

NO[•] et apoptose

En forte concentration dans le microenvironnement par induction de la NOS2¹⁴⁹, le NO[•] endogène induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses et stromales. Cela peut avoir un rôle anti-tumoral, en

réaction de l'hôte contre la tumeur, aussi bien que pro-tumoral, lorsqu'il s'agit d'une attaque des cellules leucocytaires par exemple. Il semblerait que le NO[•] puisse réguler l'apoptose par diverses voies, dont les 2 principales sont :

- l'activation des caspases, enzymes majeures de l'induction de l'apoptose¹⁸⁵
- la formation de dommages sur l'ADN : le NO[•] peut produire du peroxy-nitrite, capable de réagir avec l'ADN et de l'endommager. En réponse, p53 est augmenté, ce qui stimule la cellule à entrer en apoptose¹⁸⁶.

A l'inverse, une faible expression de la NOS2 ou de faibles concentrations de NO[•] prévient l'apoptose, en inhibant les caspases¹⁴⁹.

La dépendance à la concentration a été décryptée par Thomas *et al.*¹⁸⁷. Ils ont démontré que, dans un modèle de cellules cancéreuses MCF7, les réponses cellulaires au NO[•] sont très variables : en deçà de 300 nM, la croissance cellulaire est activée par les phosphorylations de ERK (par l'intermédiaire de l'activation de la GCs), Akt et la stabilisation de HIF1 α . Les doses de NO[•] deviennent cytostatiques et cytotoxiques au dessus de 400 nM, en activant p53 et à cause du stress nitrosant.

En conclusion, le NO[•] a un rôle pivot dans les voies de signalisation de mort ou de survie cellulaire mais aussi dans la résistance à l'apoptose.

Résistance au NO[•]

La toxicité du NO[•] peut mener à une pression de sélection sur les cellules tumorales et induire une adaptation pour des clones résistants au NO[•]. Ces cellules ont alors de hautes capacités de survie, un fort potentiel angiogénique et métastatique¹⁴⁹.

iii. Utilisation thérapeutique du NO[•] dans le cadre du cancer

Le NO[•] est nécessaire au développement d'un cancer, mais la régulation de sa réponse biphasique est très fine¹⁸⁸. Modifier les concentrations en NO[•] dans la tumeur permettrait de rompre cet équilibre et de diminuer ou la d'empêcher progression tumorale. Le NO[•] est donc une cible possible pour une thérapie. Dans la littérature, les auteurs proposent soit l'augmentation, soit la diminution de la production du NO[•] endogène comme stratégie thérapeutique.

Thérapie par augmentation du NO[•]

Il s'agit d'utiliser le NO[•] comme agent tumoricide en augmentant sa concentration. Cela peut être réalisé en activant ou faisant exprimer une enzyme de production du NO[•]: la NOS2. Cela a déjà été réalisé *in vivo* par 4 approches distinctes:

- Induire la NOS2 par des cytokines inflammatoires : Plusieurs molécules comme l'IFN administrées au niveau de métastases hépatiques murines par l'intermédiaire de liposomes, ont montré une activité anti-tumorale¹⁸⁹. Cette induction de la NOS2 inhibe la prolifération des cellules tumorales *in vitro* mais stimule l'angiogenèse et la formation de métastases dans des cancers de seins murins¹⁹⁰.
- Délivrer un gène codant la NOS2 : Dans le cas de tumeurs murines de la thyroïde, Soler *et al.* montrent une diminution de 35% du volume tumoral, 4 jours après injection dans la tumeur d'un plasmide comportant le gène de la NOS2¹⁹¹.
- Délivrer des cellules exprimant la NOS2 : Xu *et al.* démontrent que la diffusion de cellules surexprimant la NOS2 autour de la tumeur provoque une augmentation de l'expression de FAS et de FAS-ligand, inducteurs de l'apoptose, ce qui résulte en une diminution de la croissance tumorale¹⁹² chez la souris. Le problème de cette approche vient du fait que la surproduction de NO[•] induit rapidement l'apoptose des cellules vectrices et la libération de NO[•] est donc courte.
- Sensibiliser les cellules aux radiations : après des dommages de l'ADN par des radiations, il s'agit d'utiliser les propriétés du NO[•] à protéger l'ADN des réparations géniques, pour que les cellules hôtes induisent l'apoptose¹⁹³. Il a été montré, dans un modèle de cancer du colon, que l'injection intratumorale d'un adénovirus codant la NOS2 potentialise les traitements par les radiations¹⁹⁴.

Cependant, certaines cellules tumorales expriment une arginase, provoquant une déplétion en L-arginine dans la tumeur, substrat principal de la NOS2. Les taux faibles de NO[•] produits ne sont alors pas suffisants pour la cytotoxicité tumorale, mais peuvent induire la croissance tumorale et une résistance au NO[•]. De plus, certaines cellules tumorales (par exemple, de mélanomes) surexpriment la NOS2⁵⁸, ce qui est souvent de mauvais pronostic¹⁶⁹ ; la tumeur est alors souvent résistante au NO[•].

Au regard de ces données, l'activation de la NOS3 pourrait être une approche alternative : en effet, le NO[•] participe au recrutement des cellules périvasculaires de la vascularisation tumorale. En rétablissant un taux correct de NO[•], le but serait de « normaliser » la vascularisation tumorale en aidant à la construction de vaisseaux complets et fonctionnels. Cela contribuerait à la libération efficace des agents thérapeutiques et de l'oxygène dans la tumeur et, donc, à accentuer l'effet des traitements anti-cancéreux¹⁹⁵.

D'autre part, il est possible d'utiliser des activateurs des NOS ou des donneurs de NO[•] pour augmenter la concentration en NO[•] intratumorale. Par exemple, les statines, inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase, sont des modulateurs positifs de la production de NO[•]. A fortes concentrations, la cerivastatine diminue la croissance tumorale et l'angiogenèse, dans un modèle murin de cancer du poumon¹⁹⁶. Même si peu de donneurs de NO[•] ont

été utilisés en clinique, on peut citer le donneur NCX4016 de la famille des CINODs (pour « Cyclooxygenase-Inhibiting Nitric Oxide Donator », inhibiteur de cyclooxygénase donneur de NO[•]). Ce composé commercialisé par NicOx réduit la taille des tumeurs d'adénocarcinome de rats¹⁹⁷. De même, le DETA-NONOate, en combinaison avec le cisplatine, augmente la survie des souris atteintes de mélanomes, en diminuant significativement la taille des tumeurs¹⁹⁸. Enfin, le trinitrate de glycérol (glycéryl trinitrate, GTN) diminue la capacité de cellules B16 de mélanome murin à métastaser¹⁹⁹.

Thérapie par diminution du NO[•]

Le NO[•] participe à l'angiogenèse, maintient le flux sanguin tumoral et l'apport en oxygène et nutriments. En un mot, il aide à la progression tumorale. Par conséquent, l'inhibition de la signalisation par le NO[•] est une stratégie potentielle pour la thérapie anti-cancéreuse. Une inhibition globale des NOS en utilisant des inhibiteurs non-sélectifs a montré une diminution de l'angiogenèse tumorale, du flux sanguin et de la croissance de différentes tumeurs murines et xéno greffes humaines²⁰⁰⁻²⁰².

L'inhibition continue de la NOS2 par le 1400w (inhibiteur sélectif de la NOS2) montre une diminution de la croissance tumorale lors de cancer du colon et du sein²⁰³. Cependant, cela n'est observé que lorsque les cellules tumorales impliquées expriment la NOS2 à des taux suffisants.

La NOS3 étant constitutive, elle est une cible plus attractive pour les traitements anti-angiogéniques. Il a été montré, chez la souris, que l'injection d'un plasmide codant la cavéoline permet de surexprimer cette protéine de façon spécifique dans la vascularisation tumorale, empêchant ainsi la NOS3 d'être active. On observe alors un flux sanguin et une croissance tumorale réduits, expliqués par l'inhibition des effets vasodilatateurs et pro-angiogéniques du NO[•]²⁰⁴.

A ce jour, les études précliniques ont montré que cette stratégie, visant à inhiber la production de NO[•], est un atout dans la prévention de la formation de tumeurs. Même si ces données sont encourageantes, des études sur les souris ont rapportés des résultats contradictoires. Face à ces divergences et à l'importance du NO[•] dans de nombreuses fonctions physiologiques, plus d'investigations sont nécessaires avant de développer ce type de stratégie pour une évaluation clinique.

Tenant compte de l'importance du NO[•] lors d'un cancer, nous avons tenté de préciser son rôle lors de l'angiogenèse et le recrutement leucocytaire, mécanismes basés sur la reconnaissance cellulaire avec l'endothélium. Sur des CEMs de peau et de ganglions lymphatiques périphériques, les effets cellulaires et moléculaires du NO[•] ont été comparés à ceux de l'hypoxie, mime de l'environnement tumoral et activateur de la production de NO[•] endogène.

Les outils et techniques nécessaires à cette étude font l'objet du chapitre suivant de ce manuscrit.

MATERIEL & METHODES

MATERIEL & METHODES

1. LE MODELE CELLULAIRE

a. Les cellules endothéliales

Lors de cette étude, nous avons choisi d'étudier les cellules endothéliales microvasculaires de deux tissus impliqués dans le mélanome :

- des CEMs de peau (human skin microvascular endothelial cell, HSkMEC), site primaire du mélanome
- des CEMs de ganglions lymphatiques (human peripheral lymph node endothelial cell, B3 clone, HPLNEC.B3), site de métastases

Ces deux lignées sont issues de cultures primaires, immortalisées et clonées afin de créer des lignées stables facilitant les études *in vitro*. Les caractérisations ont montré la présence des marqueurs spécifiques des CEs : le facteur de von Willebrand, l'enzyme de conversion de l'angiotensine et PECAM-1/CD31, par exemple²⁰⁵.

b. Les cellules lymphoïdes CEMT4

Dans le cadre des expériences d'adhésion sur les CE, nous avons utilisé une lignée de lymphocytes T naïfs CD4⁺ : les CEMT4. Ces cellules sont un modèle de lymphocytes CD4⁺ activés.

c. Les cellules tumorales

Le laboratoire a développé un modèle de cellules tumorales de mélanome humain. Les cellules tumorales MIV clone M ont été isolées, clonées, puis caractérisées.

2. LA CULTURE CELLULAIRE

Pour les passages d'entretien, les cellules adhérentes sont décollées par hydrolyse enzymatique à l'aide d'une solution de trypsine 0.25%/éthylène diamine tétra acétate (EDTA) 1 mM, pendant 2 minutes à température ambiante. La réaction enzymatique est stoppée par ajout de milieu complet (OptiMEM supplémenté de 2% de sérum de veau foetal (SVF), 40 µg/ml de gentamicine et 0.05 µg/ml

de fungizone ; annexe 1). Après centrifugation à 400 g pendant 5 minutes, le culot cellulaire est repris dans du milieu complet. Les cellules sont comptées sur lame de Mallassez,ensemencées à 2.10^4 cellules par cm^2 , puis incubées dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide de 5% CO₂/ 95% air pendant 48 heures.

Les lymphocytes CEMT4 se développent en suspension dans du milieu complet. Ils sont ensemencés à raison de 2.10^5 lymphocytes par ml de milieu, puis incubés dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide de 5% CO₂/ 95% air pendant 48 heures.

3. TRAITEMENTS PAR LES DONNEURS DE NO[•]

L'impact du NO[•] sur les CEs est étudié en utilisant des donneurs de NO[•] de la famille des NONOates et des inhibiteurs de NOS.

Les NONOates se décomposent spontanément en solution aux pH et température physiologiques pour produire, le plus souvent, 2 moles de NO[•]. La vitesse de décomposition est dépendante de la structure de l'adduit nucléophile lié au groupement diolate [N(O-)N=O]. La cinétique de décomposition des NONOates est simple et facilement prévisible, car la libération de NO[•] suit une cinétique de premier ordre. Ces donneurs de NO[•] sont ainsi facilement et souvent utilisés.

Au laboratoire, nous avons choisi d'utiliser 3 donneurs de NO[•], ayant des cinétiques de libération variables, donc qui miment des flux de NO[•] différents:

- la spermine-NONOate avec une demi-vie de 39 min à 37°C
- le dipropylenetriamine NONOate (DPTA-NONOate) avec une demi-vie de 3h à 37°C
- le diéthylenetriamine NONOate (DETA-NONOate) avec une demi-vie de 20h à 37°C (figure 24).

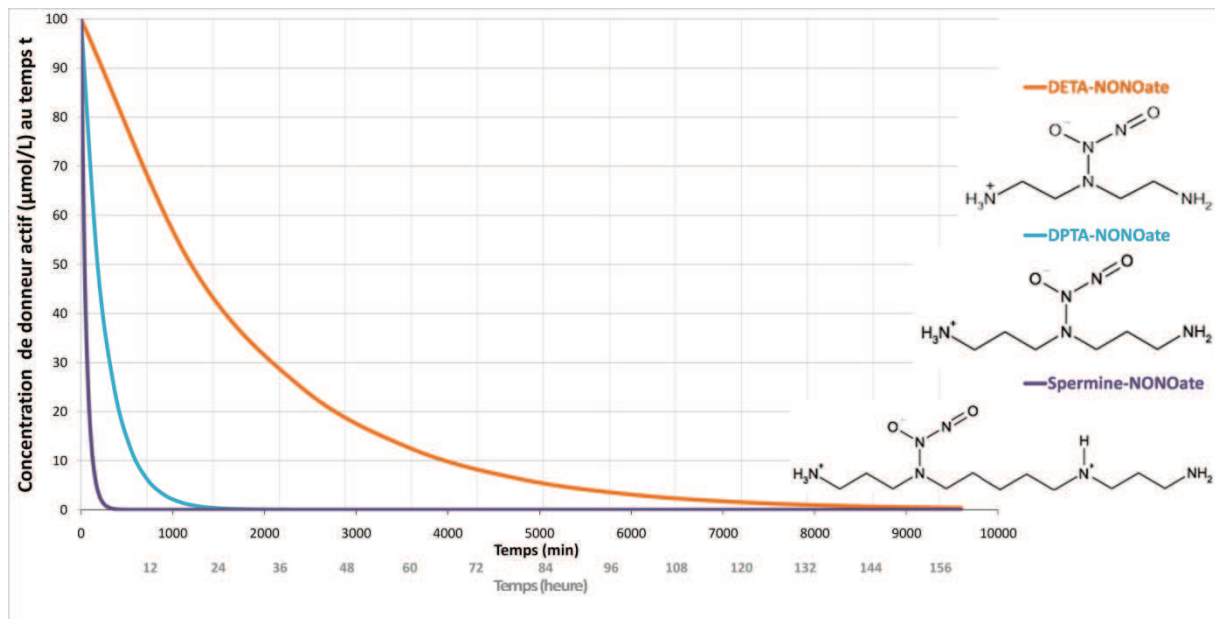


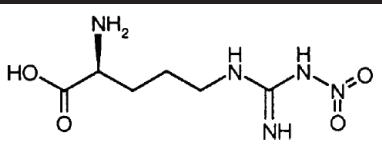
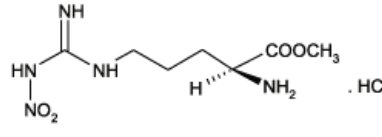
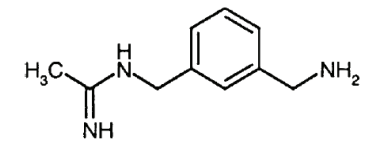
Figure 24 : Visualisation théorique de la concentration en donneurs de NO^{*} actifs (DETA-NONOate, DPTA-NONOate et Spermine-NONOate) en µmol/L au cours du temps. La simulation a été réalisée en considérant une concentration initiale de NONOate de 0.1 mM et dans le cas d'une incubation à 37°C et à pH7. Les structures chimiques des donneurs sont représentées à droite du graphique.

En se décomposant, les NONOates forment du NO^{*} et un résidu squelettique. Le NO^{*} sera ensuite réduit en nitrites et nitrates. Pour s'assurer que l'effet observé provient bien du NO^{*} et pas des autres produits de décomposition des NONOates, nous avons utilisé comme contrôles négatifs des donneurs entièrement décomposés. Les donneurs ont été dissous à une concentration de 1 mg/mL dans du tampon salin de phosphate complet (complete phosphate buffered saline, cPBS ; annexe 1) à 37°C pendant 48h (pour la Spermine-NONOate et le DPTA-NONOate) et 120h (pour le DETA-NONOate).

Pour inhiber la production endogène de NO^{*}, nous avons utilisé des inhibiteurs des NOS. Ce sont des analogues de la L-Arginine, qui empêche toute activité de la NOS et donc la libération de NO^{*}. Nous avons choisi d'utiliser 3 inhibiteurs de NOS :

- le L-N^G-Nitroarginine (L-NNA) est capable de se lier directement et de façon non sélective aux NOS
- le L-N^G-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) est hydrolysé par les estérases cellulaires en L-NNA lorsqu'il pénètre dans une cellule
- le N-(3-(aminométhyl)benzyl)acetamidine (1400w) est un inhibiteur sélectif et non réversible de la NOS2 (tableau 1).

Tableau 1 : Structure et sélectivité des NOS. La structure chimique des 3 inhibiteurs de NOS est présentée, ainsi que la concentration (en μM) en inhibiteur inhibant 50% de l'activité des NOS (IC_{50}).

	Formule chimique	IC_{50} NOS2 (μM)	IC_{50} NOS3 (μM)	IC_{50} nNOS (μM)
L-NNA		3.1	0.35	0.25
L-NAME		3.1	0.35	0.25
1400w		0.23	1000	7.3

4. L'HYPOXIE

La mise en culture des CEs sous des concentrations en oxygène inférieures à celle de la culture cellulaire « classique » permet de mimer l'environnement d'un tissu sain (1.1-9.5% O_2) ou tumoral (<1% O_2). Un mélange gazeux 95% N_2 /5% CO_2 est injecté dans la chambre pour culture cellulaire C-174 (BioSpherix, Redfield, NY) jusqu'à obtenir une atmosphère comportant le pourcentage de O_2 souhaité, supplémenté de 5% de CO_2 . Le pourcentage en oxygène est contrôlé par la sonde PROOX 110 (BioSpherix). La chambre d'hypoxie est placée dans un incubateur, ce qui permet de conserver les cellules à 37°C et sous atmosphère humide sur de longues périodes.

5. LE MICROSCOPE A FLUORESCENCE

Les expérimentations d'angiogenèse, de migration cellulaire et d'adhésion en flux sont réalisées sur la station de vidéomicroscopie de la plateforme de cytométrie du Centre de Biophysique Moléculaire. La configuration présentée est en place au laboratoire depuis 2009. Elle est équipée d'un microscope inversé Zeiss Axiovert 200M, couplé à plusieurs éléments (figure 25):

- Une lampe COLIBRI permettant l'analyse en fluorescence grâce à 4 diodes électroluminescentes (DEL) émettant respectivement aux longueurs d'onde de 365 nm, 470 nm, 530 nm et 625 nm.
- Un système ApoTome servant à la réalisation d'images d'une définition proche de la confocalité

- Une chambre d'incubation thermostatée à atmosphère contrôlée (taux d'humidité, pourcentage de CO₂ et O₂)
- Une caméra numérique de haute définition
- Un système informatique avec le logiciel Axiovision permettant l'acquisition et le traitement des données.

Le système motorisé permet de réaliser des expériences multiparamétriques dans des conditions de température, d'atmosphère CO₂ et O₂, d'humidité contrôlées et ceci au cours du temps.

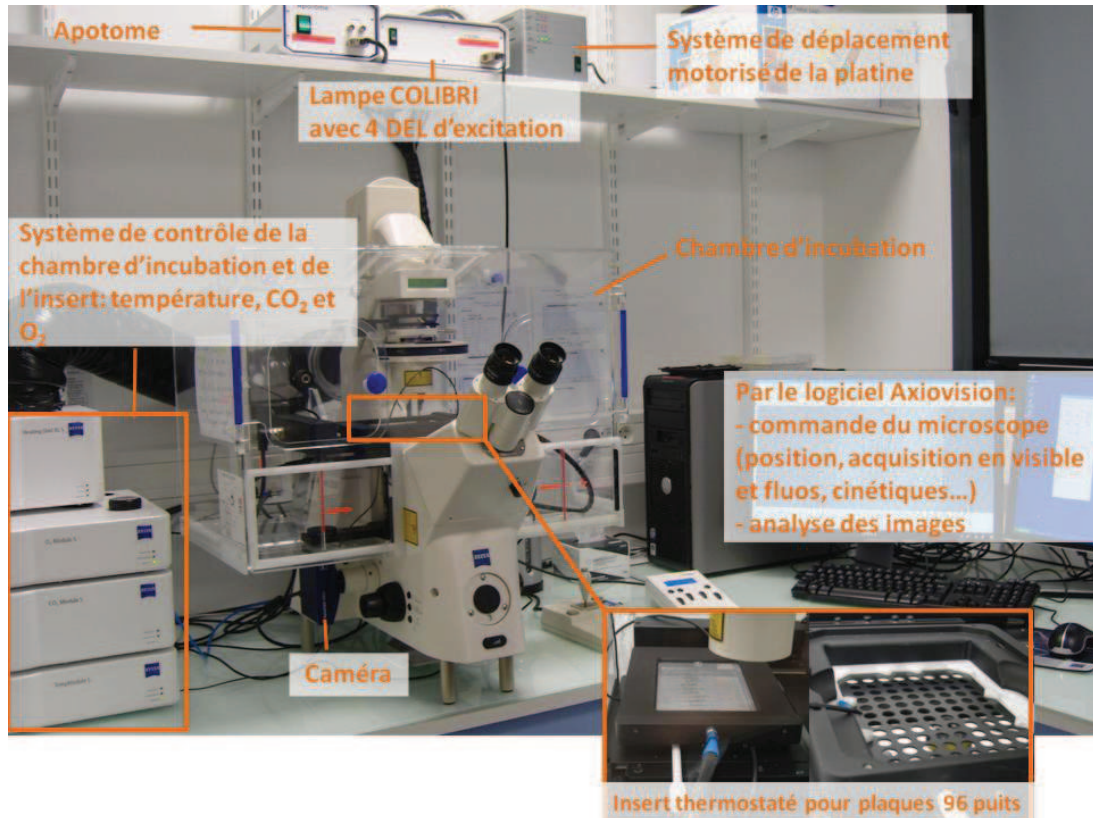


Figure 25 : Présentation des différents éléments de la station de vidéomicroscopie du Centre de Biophysique Moléculaire.

La station de vidéomicroscopie est couplée à un système de flux pour réaliser les expériences d'adhésion en flux (figure 26).

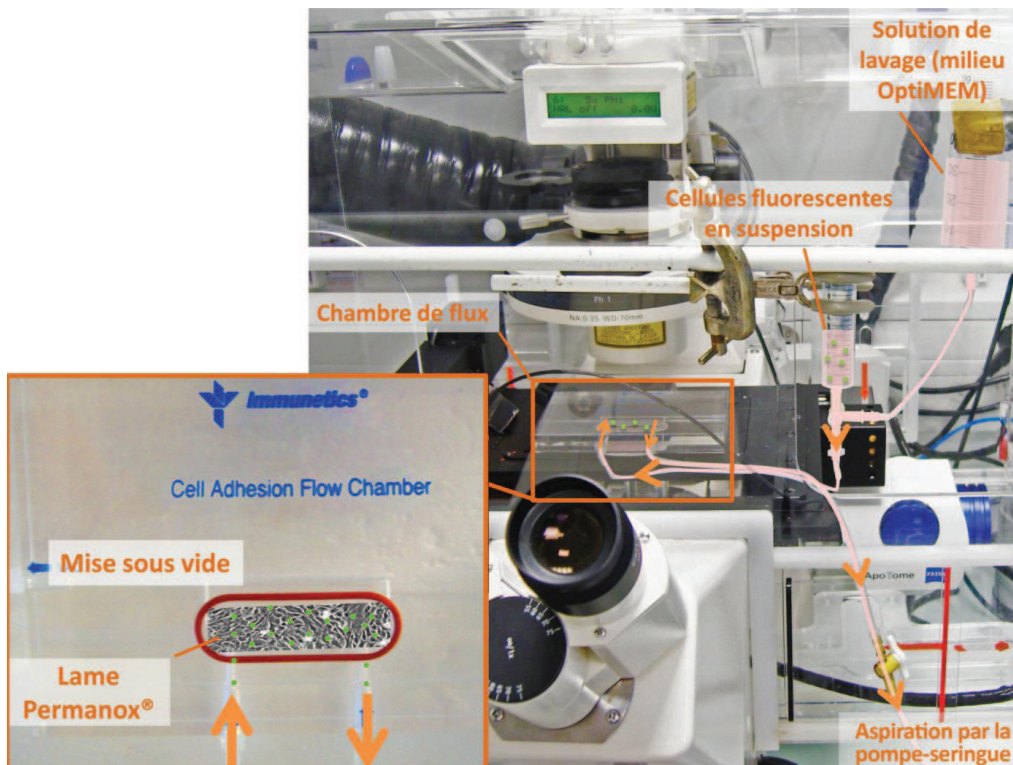


Figure 26 : Représentation des différents éléments du système de flux.

Le système de reconstitution du flux comprend :

- Une chambre de flux Immunetics, qui permet de faire passer une solution ou une suspension cellulaire sur une monocouche de cellules cultivées sur lame
- Un système d'aspiration par seringue (pompe-seringue) Harvard apparatus, qui crée le flux par aspiration
- Une pompe à vide permettant de faire le vide entre la lame support des cellules et la chambre de flux.

Ce système permet de visualiser différents phénomènes cellulaires dynamiques impliquant des cellules circulantes dans des conditions simulant le flux sanguin.

6. ANALYSE DES ARN MESSAGERS

La présence d'acides ribonucléiques messagers (ARNm) codant les NOS a été recherchée dans les CE. Après lyse des cellules, il s'agit d'extraire et d'isoler les ARNm, en utilisant un système de purification par colonne. Cette analyse a été réalisée en utilisant le kit commercial « Kit RNeasy Mini » (Qiagen, Courtaboeuf, France). Ensuite, les ARNm codant les NOS sont amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques, puis visualisés sur gel d'agarose.

Les CE sont ensemencées et incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5% CO₂. Après 48h de culture, les cellules sont lysées par le tampon commercial « RLT » (Qiagen), contenant du thiocyanate de guanidine, ce qui inactive les RNAses. Ensuite, le lysat est homogénéisé par agitation pendant 30 sec pour s'assurer de la destruction des structures cellulaires. Un volume d'éthanol à 70% est ajouté sur le lysat et l'échantillon est déposé dans une colonne de centrifugation, où l'ARN total se lie à la membrane de silice. La colonne est centrifugée et les contaminants sont éliminés par lavages et centrifugations successifs avec le tampon « RW1 » (Qiagen), puis avec le tampon « RPE » (Qiagen). A la fin de la procédure, l'ARN est élué par 30 à 50 µl d'eau. L'ARN est quantifié par mesure de l'absorbance à 230 nm, grâce au Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

Pour la transcription inverse, 1 µg d'ARN total est mis en présence de nucléotides (1 mM), d'ADN polyT (0.5 mM), d'amorces à séquences aléatoires (random primers 5 ng/ml) dilués dans de l'eau. Le mélange est incubé 5 min à 65°C, puis le tampon de transcription (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.01 mM DTT et 20 U d'inhibiteurs de ribonucléase) est ajouté. Enfin, la transcription est réalisée sur un cycle de température (25°C pendant 10 min, 42°C pendant 50 min et 70°C pendant 15 min), en présence de transcriptase inverse M-MLV (200 U) (Invitrogen).

L'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) obtenu est amplifié par réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Le milieu réactionnel est composé de 3 µl d'ADNc, 20 mM Tris pH8.4, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.3 mM de chaque nucléotide, 0.5 µM de chaque amorce et 1 U Taq polymérase. Les amorces utilisées amplifient spécifiquement les fragments nucléiques codant la NOS2 (amorces : GTGGAAGCGGTAACAAAGGA et TTGCCATTGTTGGTGGAGTA ; fragment amplifié de 221 pb) et la NOS3 (amorces : CCCTTCAGTGGCTGGTACAT et GCTCATTCTCCAGGTGCTTC; fragment amplifié de 250 pb). Après 3 min à 74°C, la PCR est réalisée par 40 cycles de température (1 min à 94°C, 30 sec à la température d'hybridation des amorces (59°C pour la NOS3 et 55°C pour la NOS2) et 1 min à 72°C). La polymérisation est terminée par 7 min à 74°C, puis le produit d'amplification est conservé à 4°C. Les fragments amplifiés sont déposés, puis analysés sur un gel d'agarose 1% dans un tampon Tris (89 mM)/Acide borique (89 mM)/EDTA (2 mM) pH8, complété de 0.5 µg/ml de bromure d'éthidium. La migration se fait à 90 V pendant 30 min. Chaque expérience a été réalisée 3 fois indépendamment; les résultats présentent une condition représentative de l'ensemble des expériences.

7. EXPRESSION DE PROTEINES

a. Par cytométrie en flux

L'expression cellulaire de plusieurs molécules d'adhésion ont été étudiés par la technique de cytométrie en flux. Il s'agit de marquer les CEs en suspension par un jeu d'anticorps spécifiques pour visualiser de façon individualisée chaque cellule et le taux d'expression de la protéine d'intérêt reconnue par les anticorps fluorescents, en comparaison d'un marquage par des anticorps non spécifiques.

Les CEs sontensemencées et incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5% CO₂. Après 48h de culture, divers traitements (donneurs de NO[•], inhibiteurs de NOS ou hypoxie) sont appliqués aux CEs, en comparaison d'un témoin non traité. A la fin du traitement, une solution de collagénase (0.5 mg/ml dans cPBS/0.5% de sérum albumine bovine (bovine serum albumin, BSA)) est utilisée pour décoller les CEs plutôt que la trypsine, pour éviter toute destruction des protéines d'intérêt. De l'azide à 0.1% est ajouté, ce qui évite l'internalisation des molécules de surface. Après plusieurs lavages, les cellules sont fixées et/ou perméabilisées, par le Cytofix ou le Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) respectivement, ou directement mises en présence de l'anticorps primaire dans une solution de cPBS complété par 0.5% de BSA (et de 0.1% de saponine pour les cellules perméabilisées). Les conditions d'expérience (temps, fixation, perméabilisation, concentrations, etc...) sont dépendantes du type d'anticorps étudié (épitope intra- ou extra-cellulaire) et ont été établies lors d'expérimentations préalables. Après 1h d'incubation en présence de l'anticorps primaire, les cellules sont lavées avec une solution de cPBS/0.5% BSA (+ 0.1% saponine pour les cellules perméabilisées) et mises en présence de l'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (λ excitation: 494 nm, λ émission: 521 nm), dans une solution de cPBS/0.5% BSA (+ 0.1% saponine pour les cellules perméabilisées), pendant 30min. Les cellules sont lavées par centrifugation (5 minutes à 400 g), puis le culot cellulaire est remis en suspension dans le cPBS pour l'analyse au cytomètre de flux.

L'étude au cytomètre en flux FACS-LSR ou FACSort (Becton Dickinson) est réalisée sur 10 000 événements et la fluorescence est quantifiée à l'aide du logiciel CellQuest (Becton Dickinson). Cette analyse a permis d'évaluer l'expression de :

- plusieurs molécules d'adhésion : PECAM-1/CD31, CD34, ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, ICAM-2/CD102, VE-cadhérine/CD144,
- plusieurs glycosaminoglycannes : Chondroïtine sulfatée et Héparane sulfatée,

- plusieurs récepteurs de chimiokines : CCR5, CCR7, CXCR4, CX₃CR1.

Les concentrations d'utilisation des anticorps dirigés contre les molécules d'intérêt sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux : concentration finale et fournisseur de chaque anticorps.

Molécule ciblée par l'anticorps	Concentration de l'anticorps (µg/ml)	Fournisseur
PECAM-1/CD31	8	Santa Cruz
CD34	8	Santa Cruz
ICAM-1/CD54	8	Santa Cruz
VCAM-1/CD106	8	Santa Cruz
ICAM-2/CD102	8	Santa Cruz
VE-cadhérine/CD144	15	BD biosciences
Chondroïtine Sulfate	9.5	Sigma
Héparane Sulfate	12.5	Seigakagu
CCR5	6.5	RnDsystems
CCR7	6.5	RnDsystems
CXCR4	12.4	RnDsystems
CX ₃ CR1	10	MBL International
Actine	8	Santa Cruz

Pour les marquages sur des cellules perméabilisées, les résultats des molécules d'adhésion ont été rapportés à l'expression de l'actine, utilisée comme contrôle interne de perméabilisation. De plus, le témoin de chaque expérience est considéré comme 100% d'expression de la molécule d'intérêt. Chaque expérience a été réalisée indépendamment au minimum 3 fois ; les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au témoin \pm SEM.

b. Par Western Blot

L'expression des NOS a été observée par Western Blot, au sein de l'institut de recherche Servier. De la même manière que précédemment, il s'agit de visualiser la présence d'une protéine par le marquage par un anticorps spécifique. Dans le cas du Western blot, les cellules sont lysées en présence d'un détergent et l'expérience est réalisée sur des protéines dénaturées, ce qui permet

d'améliorer la sensibilité de la technique. La révélation est faite par couplage d'un anticorps fluorescent et observée en proche infrarouge, pour améliorer encore la sensibilité.

Les CEs sontensemencées et incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5%CO₂. Après 48h de culture, les boîtes de culture sont plongées dans l'azote liquide et conservées à -80°C. Après décongélation sur glace, les cellules sont lysées dans un tampon acétate 0.05 M pH5.8, complété par des inhibiteurs de protéases et phosphates, 1% de triton X-100 et 10⁻⁴ M d'isobutylméthylxanthine (IBMX). Ces expériences ont été réalisées en même temps que celles de dosage du GMPc ; le tampon de lyse utilisé ici est celui préconisé pour le dosage du GMPc. Des expériences préliminaires ont montré que l'utilisation de ce tampon, complété par 1% de triton X-100, ne modifie pas le signal de Western Blot obtenu. Le taux de protéines dans le lysat est dosé par la méthode colorimétrique de Bradford. Brièvement, 160 µl d'échantillon à doser (gamme de protéine, lysat dilué au 1/200^e ou blanc) sont déposés dans une plaque 96 puits, puis 40 µl du réactif de Bradford (Bio-rad, Hercules, CA) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 595 nm par le Victor 3V (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de protéines dans chaque puits ; la concentration dans les lysats peut donc être évaluée en comparaison avec la gamme étalon.

Après dénaturation des échantillons pendant 5 min à 95°C en présence de tampon de Laemmli (Bio-rad), un volume correspondant à 40 µg de protéine pour chaque lysat est déposé sur un gel de polyacrylamide 4-20% (Bio-rad). La migration se fait pendant 2h à 100 V. Les protéines sont ensuite transférées par Western blot sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (polyvinylidene fluoride PVDF) spéciales fluorescence (GE Healthcare, Orsay, France) pendant 2h à 100 V dans la glace. Les tampons de migration et de transfert sont décrits dans l'annexe 1. Les membranes sont ensuite saturées pendant 1h à température ambiante dans du tampon « Odyssey® Blocking Buffer » (LI-COR, Lincoln, USA). Puis les anticorps primaires (tableau 3), dilués dans la solution « Odyssey® Blocking Buffer » (LI-COR) ½ complété par 0.1% de Tween 20, sont déposés sur les membranes. L'incubation primaire est réalisée à 4°C sur la nuit.

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour le Western blot : dilution finale et fournisseur de chaque anticorps.

Molécule ciblée par l'anticorps	Dilution de l'anticorps	Fournisseur
NOS3	500	Santa Cruz
NOS2	100	Santa Cruz
Actine	3000	Santa Cruz

Après plusieurs lavages dans 0.1% de Tween 20 dilué dans du tampon salin tris, les anticorps secondaires fluorescents IRDye®680 (λ excitation : 679 nm ; λ émission : 702 nm) et IRDye®800CW (λ excitation : 778 nm ; λ émission : 806 nm) de LICOR sont dilués dans la solution « Odyssey® Blocking Buffer » (LI-COR) ½ complété par 0.1% de Tween 20, puis incubés pendant 1h30 à température ambiante dans le noir. Après lavages, la fluorescence proche infrarouge est visualisée sur le système d'imagerie Odyssey®. Chaque expérience a été réalisée 2 fois indépendamment et en triplicat ; les résultats présentent une condition représentative de l'ensemble des expériences.

8. DOSAGE DU GMP_c

Comme indiqué dans l'introduction, le NO[•] active directement la GCs pour hydrolyser le GTP en GMPc. Le dosage de cette dernière molécule est donc lié à la production de NO[•]. Plus stable, la quantité de GMPc est donc plus facile à évaluer que le NO[•]. Le principe du test est basé sur la compétition de liaison entre le GMPc cellulaire et une quantité fixe de GMPc radioactif, marqué à l'iode 125, pour un anticorps spécifique dirigé contre le GMPc. Avec une quantité fixe d'anticorps et de ligand radioactif, le taux de ¹²⁵I-GMPc fixé à l'anticorps est inversement proportionnel au taux de GMPc endogène. Ce dosage a été réalisé en utilisant le kit commercial « cGMP [¹²⁵I] RIA kit » (Izotop, Budapest, Hongrie), au sein de l'Institut de Recherche Servier.

Les CEs sont ensemencées et incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5%CO₂. Après 48h de culture, divers traitements (donneurs de NO[•] ou inhibiteurs de NOS) sont appliqués aux CEs, en comparaison d'un témoin non traité. A la fin des traitements, les boîtes de culture sont plongées dans l'azote liquide et conservées à -80°C. Après décongélation sur glace, les cellules sont lysées dans un tampon d'acétate 0.05 M pH5.8, complété par des inhibiteurs de protéases et phosphates, 1% de triton X-100 et 10⁻⁴M d'IBMX. Le taux de protéines dans le lysat est dosé par la méthode colorimétrique de Bradford, comme expliqué dans le paragraphe précédent.

Pour le dosage en lui-même, un volume de 30µl pour chaque lysat est utilisé et dilué dans 70µl de tampon acétate 0.05 M pH5.8, complété par des inhibiteurs de protéases et phosphates et 10⁻⁴ M d'IBMX. Les échantillons sont acétylés par ajout de la solution d'anhydride acétique et de triéthylamine fournie dans le kit. Puis l'anticorps anti-GMPc (100µl) est ajouté dans chaque tube pendant 1h à température ambiante, pour que la liaison GMPc froid-anticorps soit privilégiée. 100µl de ¹²⁵I-GMPc sont ajoutés ensuite et incubés sur la nuit à 4°C. L'anticorps secondaire couplé à des billes magnétiques (500 µl) est distribué dans les tubes. Après 10 min à température ambiante, les tubes sont posés sur des portoirs magnétiques, puis les surnageants sont jetés. A la fin de l'expérience, la radioactivité de tous les tubes est comptée pendant 60 sec dans un scintillateur

gamma. Toute l'expérience est réalisée en comparaison avec une gamme étalon de GMPc froid et d'un blanc sans GMPc froid, ce qui permet de quantifier le GMPc endogène de chaque échantillon. Le taux de GMPc est rapporté à la quantité de protéine pour comparer les différentes conditions de l'expérience. Chaque expérience a été réalisée 2 fois indépendamment et en triplicat ; les résultats sont présentés en fmol de GMPc/ μ g de protéine \pm SEM.

9. CYTOTOXICITE

L'analyse de la toxicité cellulaire est une étape préliminaire à toute étude de l'effet de molécules endogènes ou exogènes sur la biologie des cellules. En effet, les doses choisies pour ces molécules doivent être non ou peu toxiques pour s'assurer que l'effet observé correspond bien à la réponse de la cellule à l'activité et non à la cytotoxicité de la molécule.

Les tests de toxicité cellulaire sont réalisés avec une molécule non toxique, stable et soluble dans le milieu de culture : l'Alamar Blue™ (Invitrogen). Le test est basé sur la détection de l'activité métabolique des cellules : les cellules vivantes maintiennent un environnement réducteur, ce qui n'est plus le cas lorsque la croissance des cellules est inhibée ou que les cellules sont mortes. Le principe du test à l'Alamar Blue™ utilise la capacité réductrice des cellules pour convertir le resazurin en une molécule fluorescente, le resofurin. Ainsi, la quantité de fluorescence produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu de culture, donc à la viabilité.

Dans des plaques de 96 puits, les cellules sontensemencées à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules/ml dans 100 μ L, puis incubées à des temps variables (24 et 48 heures) en présence ou non des molécules à tester dans une gamme de concentrations données. A la fin de chaque incubation, 10 μ l d'une solution d'Alamar blue™, diluée au 1/2 dans de l'OptiMEM, sont ajoutés par puits et sont incubés 4 heures à 37°C sous atmosphère humide de 5%CO₂.

Les résultats sont analysés par lecture des microplaques au spectrofluorimètre Victor 3V (Perkin Elmer) (λ excitation : 560 nm, λ émission : 590 nm). Chaque expérience est réalisée en triplicat par concentration et par molécule à tester. Les résultats sont rapportés en pourcentage de viabilité du témoin.

10. DETECTION DE L'APOPTOSE

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. Ce mécanisme est gouverné soit par une voie impliquant la superfamille des récepteurs au TNF, soit une voie mettant en jeu la mitochondrie et les protéines Bcl-2. Ces deux voies conduisent à l'activation de protéases à cystéine : les caspases. Cela

provoque l'entrée en apoptose et induit une cascade d'événements cellulaires aboutissant à la fragmentation de l'ADN, ce qui entraîne la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes²⁰⁶.

L'étape finale est la fragmentation de l'ADN ce qui entraîne la formation de corps apoptotiques. La dégradation par les nucléases nucléaires génère des extrémités 3' OH libres sur les brins d'ADN. La technique « Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling » (TUNEL) permet la détection de ces extrémités libres par la Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) par incorporation de nucléotides de deoxyuridine triphosphate (dUTP) fluorescents.

Nous avons utilisé le kit de détection de l'apoptose « In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein » (Roche applied science, Meylan, France). Dans des plaques de 96 puits, les cellules sontensemencées à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules/ml dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide de 5% CO₂/ 95% air. Après 48 heures de culture dans ces conditions, elles sont incubées en présence des molécules à tester. Les temps d'incubation sont variables selon la molécule étudiée et de 6h de plus que le temps maximal utilisé pour les autres expérimentations (soit 30h pour la Spermine-NONOate, 54h pour le DPTA-NONOate et le DETA-NONOate), car la fragmentation de l'ADN est un phénomène tardif de l'apoptose.

Après un lavage au cPBS, les cellules sont fixées par une solution de 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 30min à température ambiante, puis perméabilisées par 0.1% de triton X-100 dans une solution à 0.1% de sodium de citrate pendant 10 min à 4°C. Enfin, les cellules sont mises en présence du tampon de réaction TUNEL contenant la Tdt et les dUTP marqués à la fluorescéine pendant 45min à 37°C dans le noir. Après 3 lavages au cPBS, la fluorescence (λ excitation: 450-500 nm, λ émission: 515-565 nm) des échantillons traités est visualisée. Au minimum 6 photos dans deux expériences indépendantes ont été prises grâce au microscope inversé à fluorescence Axiovert 200M (Zeiss). Les photos des cellules traitées en comparaison avec un témoin non traité et un témoin négatif sans Tdt sont présentées.

11. L'ANGIOGENESE

L'étude de l'angiogenèse *in vitro* a pour but de tester l'impact de diverses molécules sur la capacité intrinsèque des CEs à former des pseudo-vaisseaux sur une matrice appropriée : le Matrigel™. L'angiogenèse a été évaluée par la formation de pseudovessels sur cette matrice, parce que c'est un processus hautement spécifique²⁰⁷, même si la formation de lumen n'est pas toujours observée dans ce système²⁰⁸.

Le Matrigel™ est une matrice biologiquement active qui permet de mimer la lame basale des mammifères. Cette préparation solubilisée est extraite du sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm, une tumeur particulièrement riche en protéines de matrice extracellulaire et en facteurs de croissance. Ses principaux composants sont la laminine (≈56%), le collagène de type IV (≈31%), des protéoglycannes à héparannes sulfates, de l'entactine (≈8%) et du nidogène. Le Matrigel™ contient également des facteurs de croissance tels que le TGF-β (≈2.3 ng/ml), le bFGF (0-0.1 pg/ml), le PDGF (≈12 pg/ml) ... indispensables à l'activation des CEs. Celui-ci, étant préparé à partir d'ascite de tumeurs *in vivo*, sa composition est variable selon le lot. Les CEs en culture forment naturellement des pseudo-vaisseaux sur cette matrice à une vitesse dépendante, entre autres, de la composition en protéines du Matrigel™ utilisé. Au laboratoire, nous utilisons des lots de Matrigel™ dont la concentration en protéine se situe entre 10 et 12 mg/ml.

Alors que le Matrigel™ est liquide à 4°C, il se polymérise en 30 min à 37°C. Sa manipulation se fait donc sur la glace et le matériel de culture cellulaire utilisé est placé préalablement à 4°C. Le revêtement des puits de 0.36 cm² (96 puits) est réalisé avec 40 µl de Matrigel™. Après polymérisation, les CEs sont déposées sur la matrice à raison de 1.10⁵ cellules/ml dans 100 µl d'OptiMEM.

La visualisation en temps réel du réarrangement des CEs et de la formation de pseudo-vaisseaux est réalisée pendant 24h sous microscope inversé à fluorescence Axiovert 200M (Zeiss), sous atmosphère contrôlée. Une photo est prise toutes les 30 min et le logiciel Axiovision est capable de les réassocier pour obtenir un film montrant l'angiogenèse par les CEs dans chaque condition expérimentale. La comparaison entre l'angiogenèse sans et après traitement peut se faire par observation des films en simultané ou à un temps donné.

La morphologie, le réarrangement, la cinétique de formation des pseudo-vaisseaux sont ainsi analysés. L'étude qualitative est complétée en dénombrant les pseudo-vaisseaux et en calculant leur taille moyenne. Ces critères vont permettre d'évaluer qualitativement et quantitativement l'effet des divers traitements sur l'angiogenèse *in vitro*.

12. ADHESION

Les expériences d'adhésion cellulaire permettent d'évaluer les interactions entre 2 types cellulaires. Il est possible de réaliser ces études dans un environnement statique ou en faisant passer les cellules en suspension en flux contrôlé sur une monocouche de cellules adhérentes. La première technique a l'avantage de tester un grand nombre de conditions en une seule expérience et la deuxième permet de se rapprocher des conditions *in vivo* de flux sanguin.

Dans notre étude, il s'agit de déterminer si les traitements imposés ont une influence sur les interactions cellulaires entre CEs et entre CEs et lymphoïdes (CEMT4).

a. Adhésion en conditions statiques

Les CEs sontensemencées dans du milieu complet en plaques de 12 puits à raison de 1.10^4 cellules par cm^2 . Après 48 heures de culture à 37°C sous atmosphère humide de 5% CO_2 /95% air, les cellules sont incubées en présence des traitements désirés (donneur de NO^* ou hypoxie) pendant 24 à 48h, en comparaison d'un témoin non traité. Pour chaque condition, un puits supplémentaire estensemencé qui servira à comptabiliser le nombre de cellules adhérentes, le jour de l'expérience.

Extemporément, des lymphocytes CEMT4 ou des CEs sont marqués par le PKH-26 (Sigma, St. Louis, MO). Ce dérivé fluorescent de l'acridine orange substituée par une queue lipidique permettant à la molécule de s'insérer instantanément et irréversiblement dans la couche lipidique de la membrane des cellules. Le PKH-26 est un composé stable qui n'a aucun effet secondaire toxique sur les cellules lesquelles conservent leurs activités biologiques et prolifératives. Les cellules sont lavées par du milieu de culture sans sérum, puis le culot cellulaire est repris dans le tampon commercial « Diluent C » (Sigma), à raison de 2.10^7 cellules/mL. Cette suspension est transférée dans un tube de polypropylène contenant une solution de PKH-26 (7 μ l + 1 ml de « Diluent C »/mL de la suspension cellulaire), puis rapidement incubée précisément 3min à 37°C sous agitation douce. Les cellules sont lavées en présence de SVF, puis reprises dans le tampon adéquat pour l'expérimentation suivante.

Les cellules préalablement marquées sont reprises dans du cPBS/0.1% BSA à une concentration telle que soient respectés les rapports de 5 cellules en suspension pour une cellule adhérente dans le cas des lymphocytes ou 6 cellules en suspension pour une cellule adhérente dans le cas des CEs. 600 μ L de cette suspension cellulaire sont déposés sur la monocouche de CEs. Après 30 min d'incubation à 37°C, les cellules en suspension non adhérentes aux CEs sont éliminées par trois lavages doux avec une solution de cPBS. Enfin, les cellules en monocouche et adhérentes sont décollées par une solution de trypsine/0.02% EDTA et lavées par du cPBS. Après 5 minutes de centrifugation à 400 g, le culot cellulaire est remis en suspension dans le cPBS pour l'analyse au cytomètre de flux.

Le marquage des cellules en suspension par le PKH-26 (λ excitation: 551 nm, λ émission: 567 nm) permet de discriminer les CEs non fluorescentes de la monocouche et les cellules fluorescentes venant des cellules en suspension en utilisant le cytomètre en flux. Ainsi on peut évaluer le ratio entre les deux populations. Ceci correspond au taux d'adhésion, exprimé en nombre de cellules en suspension fixées par CE. Chaque condition est réalisée en triplicat et dans 2 expériences indépendantes.

b. Adhésion en conditions de flux

Pour une meilleure adhésion au support, les CEs sontensemencées sur des lames en plastique Permanox®. Il s'agit d'un polymère spécifique de la famille des polyoléfinés ; les lames Permanox® sont particulièrement adaptées à l'étude des cellules en flux car cette résine, traitée pour la culture cellulaire, répond aux besoins d'ancrage des cellules adhérentes.

Les CEs sontensemencées dans du milieu complet sur plaques Permanox® à raison de $1.4 \cdot 10^5$ cellules/mL et incubées directement ou après 24h en présence des traitements désirés (donneur de NO[•] ou hypoxie) pendant 24 à 48h, pour que les CEs soient 48h en culture, au final.

Le jour de l'expérience, des lymphocytes CEMT4 ou des CEs sont marqués par le PKH-67, de la même manière que pour le PKH-26. Pour cette expérience, le PKH-67 (λ excitation: 490 nm, λ émission:502 nm) est préféré au PKH-26 (λ excitation: 551 nm, λ émission: 567 nm), car les paramètres de fluorescence du microscope étaient plus adaptés à sa visualisation au début de la série d'expériences. Ce marqueur cellulaire fluorescent vert se fixe instantanément et irréversiblement dans la couche lipidique des cellules. Les cellules sont ensuite reprises dans du milieu de culture à une concentration de 1 million/mL.

Pour générer le flux, la chambre de flux est positionnée sur la lame de CEs, maintenue en faisant le vide dans le joint autour de la zone de cellules. L'ensemble est connecté au système pompe-seringue et au réservoir contenant la suspension de CEs ou lymphoïdes, le flux est alors généré par activation de la pompe-seringue (figure 26). Le passage des cellules en suspension sur la monocouche endothéliale peut être observé sous microscope inversé à fluorescence Axiovert 200M (Zeiss). Le débit du flux est contrôlé afin de ne pas endommager la monocouche de CEs de la lame : les cellules en suspension sont injectées dans la chambre de flux à la vitesse de 50 μ l/min pendant 5 min, puis la monocouche est lavée par du milieu pendant 10min à la vitesse de 150 μ l/min, afin d'éliminer les cellules non adhérentes spécifiquement.

Le marquage des cellules en suspension par le PKH-67 (λ excitation: 490 nm, λ émission:502 nm) permet de discriminer les cellules de la monocouche et en suspension par leur fluorescence et ainsi de dénombrer les deux populations. Ainsi, il est possible de calculer le taux d'adhésion, exprimé en nombre de cellules en suspension fixées par CE. Chaque condition est réalisée en duplicat et dans 2 expériences indépendantes. Au minimum 10 photos par lame sont prises en visible et en fluorescence sur la zone d'adhésion (une photo présente approximativement 600 CEs adhérentes), en utilisant le logiciel d'acquisition d'image Axiovision (Zeiss).

13. MIGRATION CELLULAIRE

La migration des CE sur leur matrice est la première étape de l'angiogenèse. Elle est primordiale afin que les cellules se regroupent et forment par la suite des pseudo-vaisseaux, ce qui fait que l'étude de la motilité cellulaire est d'un intérêt particulier lors des recherches sur le cancer. Plusieurs techniques existent pour évaluer la migration des CE en réponse à divers facteurs dont la cicatrisation et le test par les inserts.

a. Cicatrisation

Cette technique est très couramment utilisée car elle est très simple à mettre en place. Les CE sont ensemencées dans du milieu complet en plaques de 24 puits à raison de 1.6×10^4 cellules/cm². Après 48 heures de culture à 37°C sous atmosphère humide de 5%CO₂/95% air, une cicatrice est réalisée au milieu du tapis cellulaire à l'aide d'un cône de P200, puis le milieu de culture est changé pour les traitements désirés. La fermeture de la cicatrice est observée en temps réel sous microscope inversé à fluorescence Axiovert 200M (Zeiss), sous atmosphère contrôlée. Pour chaque condition, au minimum 2 photos par temps sont prises. Deux expériences indépendantes ont été réalisées en duplicat. La taille de la cicatrice est calculée par le logiciel Axiovision (Zeiss), au début de l'expérience et en cours de cicatrisation.

Cette technique a le désavantage de ne pas s'affranchir de la multiplication cellulaire, puisque les temps de cicatrisations peuvent être assez longs (de 24h à plus de 48h selon le type cellulaire). De plus, afin d'obtenir les résultats les plus reproductibles possibles il faut réaliser des cicatrices de largeur équivalente et/ou ne comparer que des cicatrices de largeur équivalente, entre 2 traitements.

b. Technique des inserts

L'étude de la migration cellulaire a été révolutionnée en 1962 par Stephen Boyden²⁰⁹ par l'utilisation de filtres poreux que traversent les cellules. Depuis lors, la méthode utilisant des inserts est aussi connue comme la technique de la chambre de Boyden modifiée. Cette technique largement décrite dans la littérature sert de test de la capacité de migration des cellules, mais aussi de leur capacité d'invasion selon la matrice déposée à la surface de la membrane de l'insert.

Au laboratoire, nous avons choisi d'utiliser des inserts ayant des pores de 8µm et une membrane de polyéthylène téréphtalate, opaque à la fluorescence (Inserts individuels BD Fluoroblock™, BD

Bioscience, San Jose, USA), et de travailler en plaques 24 puits. La membrane bleue opaque permet de ne visualiser que les cellules ayant déjà traversé la membrane, avec un microscope inversé.

Les CEs doivent avoir été privées de sérum pendant 18h avant l'expérimentation. Le jour de la manipulation, les cellules sont marquées par le PKH-26, puis 100 000 cellules dans 100µL de milieu de base sont déposées dans le compartiment supérieur de l'insert. Afin d'attirer les CEs vers le compartiment inférieur, nous avons placé du milieu contenant 10% de SVF ou cultivé des cellules cancéreuses (dans notre cas, il s'agit de cellules tumorales de mélanomes, notées MIV Clone M).

Les traitements des CEs par les molécules d'intérêt sont réalisés 6h avant le début et pendant toute l'expérience dans le compartiment supérieur.

La migration des CEs au travers la membrane est observée en temps réel sous microscope inversé à fluorescence Axiovert 200M (Zeiss), à 37°C sous atmosphère humide de 5%CO₂/95% air. Pour chaque condition, au minimum 3 photos sont prises. Deux expériences indépendantes ont été réalisées en duplicat. Cette technique est plus facilement quantifiable que la cicatrisation, puisque le comptage des cellules du compartiment inférieur peut être automatisé par ImageJ.

14. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats quantifiés sont exprimés en moyenne \pm l'erreur type (standard error of the mean, SEM). Les comparaisons statistiques entre les conditions expérimentales sont testées en réalisant le test t de Student. Les valeurs calculées de p inférieures à 0.05 sont indiquées par un astérisque sur les figures.

RESULTATS & DISCUSSION

Tenant compte de l'importance du NO[•] lors d'un cancer, nous avons tenté de préciser son rôle lors de l'angiogenèse et le recrutement leucocytaire, mécanismes basés sur la reconnaissance cellulaire avec l'endothélium. Sur des CEMs de peau et de ganglions lymphatiques périphériques, les effets cellulaires et moléculaires du NO[•] ont été comparés à ceux de l'hypoxie, mime de l'environnement tumoral et activateur de la production de NO[•] endogène.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre suivant du manuscrit en 4 parties :

- une présentation des lignées endothéliales montrera leurs différences selon leur organe d'origine et leur statut vis-à-vis du NO[•] et des NOS,
- les expérimentations qui ont permis de déterminer les conditions d'utilisation de toutes les molécules exogènes seront analysées,
- l'étude précise du rôle du NO[•] lors de chaque étape de l'angiogenèse tumorale sera réalisée,
- les effets cellulaires et moléculaires du NO[•] lors du recrutement leucocytaire seront considérés.

Dans ces deux dernières parties, l'expression de plusieurs molécules de surface a été analysée. Lors de l'étude de l'angiogenèse, nous nous sommes focalisés sur des molécules d'adhésion fortement impliquées dans le phénomène : PECAM-1/CD31, ICAM-1/CD54 et VE-cadhérine. Les molécules de surface CD34, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, la chondroïtine sulfate, l'héparane sulfate et les récepteurs de chimiokines CCR5, CCR7, CXCR4 et CX₃CR1 ont aussi été étudié pour leur implication dans l'adhésion des CEMs avec les leucocytes et dans la formation du gradient de chimiokines.

Une partie de ses travaux font l'objet d'une publication (Annexe 2): Carreau, A., Kieda, C. & Grillon, C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Experimental Cell Research in press*, (2010)²¹⁰.

RESULTATS & DISCUSSION

1. LES LIGNEES ENDOTHELIALES

a. Présentation

Tous les vaisseaux sanguins, des plus grandes artères et veines aux plus petites veinules, sont tapissés de CEs. La fonction de ces cellules est multiple et peut varier considérablement selon la localisation et la taille des vaisseaux. Elles sont impliquées dans la régulation de la pression sanguine, la coagulation, le recrutement leucocytaire, l'angiogenèse... Au vu de l'importance de ces cellules, il a été entrepris de développer des modèles d'endothélium qui permettent des expériences *in vitro* représentatives de la biologie de l'endothélium *in vivo*. Une grande part de nos connaissances sur les fonctions endothéliales vient d'expérimentations réalisées sur les HUVEC primaires. Cependant, ces CEs macrovasculaires ont de nombreux inconvénients (approvisionnement en cordons ombilicaux pour leur isolement, courte stabilité du phénotype, variabilité selon le donneur, non représentative de l'endothélium microvasculaire...). Plusieurs laboratoires ont donc décidé d'isoler et d'immortaliser des CEs, pour obtenir des lignées stables, tout en conservant leurs caractéristiques endothéliales. A partir de biopsies, le laboratoire de Claudine Kieda a ainsi établi des lignées endothéliales humaines de divers organes lymphoïdes primaires et secondaires, et de tissus périphériques (peau, cerveau, intestin, poumons...-brevet CNRS 99-16169). Plus précisément, l'idée était de développer une lignée à partir de chaque organe et ainsi obtenir plusieurs modèles microvasculaires de la physiologie de l'endothélium, en conservant le phénotype original. En les caractérisant, il a été confirmé que ces lignées ont conservé leurs caractéristiques endothéliales et présentent des différences de phénotypes selon leur organe d'origine²⁰⁵. En effet, l'immortalisation par transfection de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (human telomerase reverse transcriptase hTERT) permet de conserver le phénotype différencié et les caractéristiques des cellules parentales. Ainsi, la morphologie, la capacité à former des tubes, l'expression de la majorité des molécules de surface et l'anoïkie des cellules immortalisées sont similaires à celles des cellules primaires quiescentes²¹¹⁻²¹³. Nos modèles cellulaires sont donc représentatifs des tissus sources²⁰⁵.

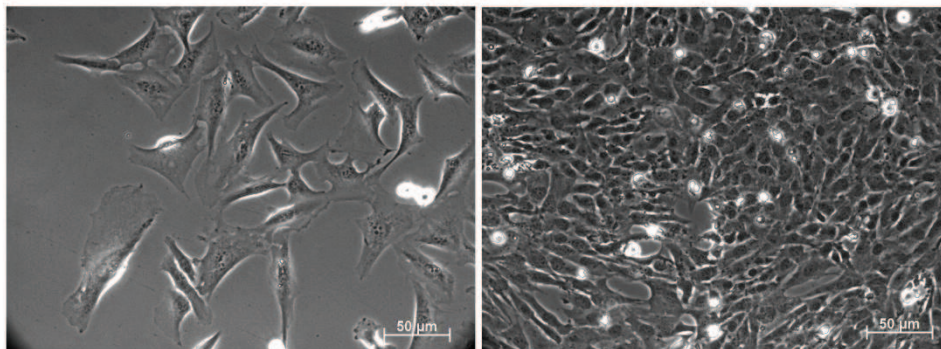
Lors de cette étude, nous avons utilisé deux lignées représentatives des CEMs de la peau et des ganglions périphériques, tissus impliqués dans la progression du mélanome. Afin de bien connaître ces cellules, nous avons réalisé une comparaison des deux lignées au niveau de leur morphologie,

ainsi que de leurs propriétés à former l'angiogenèse, à exprimer des molécules de surface et à activer la voie du NO[•], les trois axes majeurs de cette étude.

b. Morphologie

Si les HSkMEC et les HPLNEC.B3 présentent des propriétés propres selon leur origine tissulaire²⁰⁵, elles ont aussi un aspect différent. La figure 27 montre la morphologie de ces deux types cellulaires.

A HSkMEC



B HPLNEC.B3

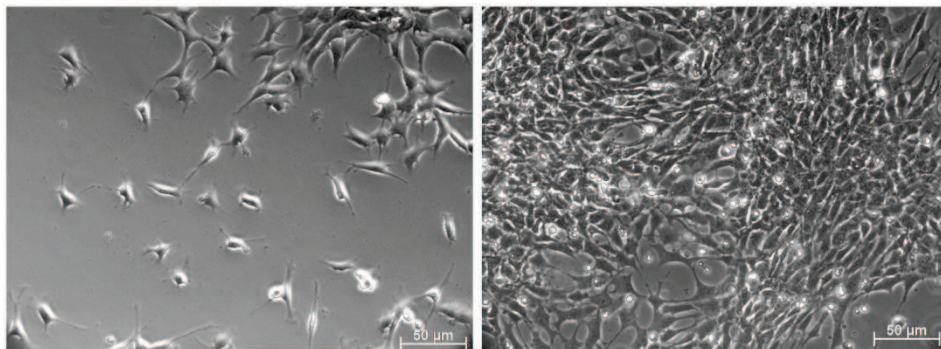


Figure 27 : Les cellules HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B) isolées (à droite) et à confluence (à gauche). Les CEMs sont cultivées sur plastique dans du milieu OptiMEM supplémenté de 2% de SVF, à 37°C sous atmosphère humide enrichie de 5% de CO₂.

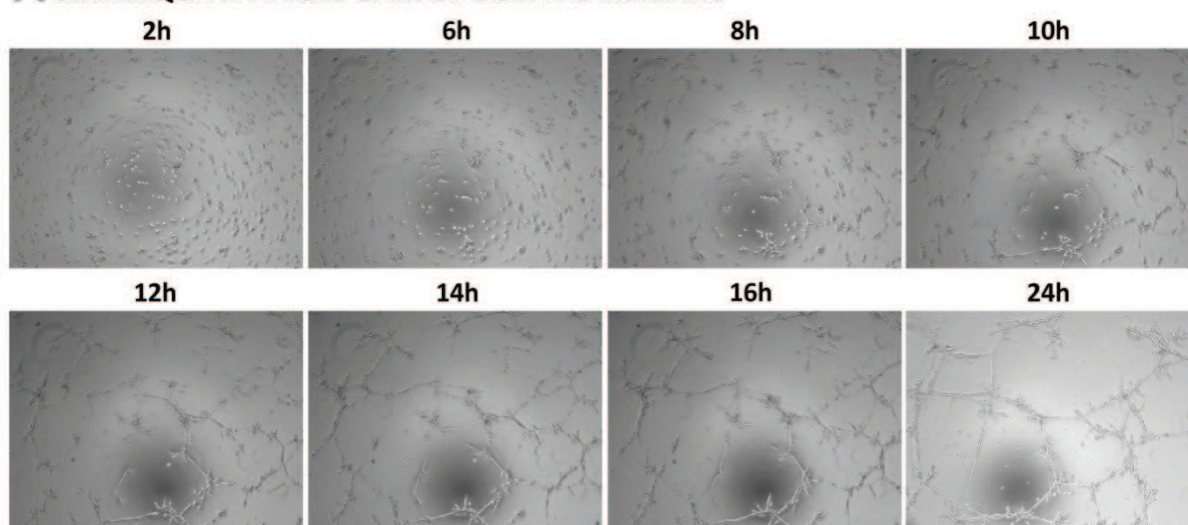
Les HSkMEC sont de plus grande taille ($\approx 55 \mu\text{m}$) que celles de ganglions lymphatiques périphériques ($\approx 40 \mu\text{m}$) et paraissent plus étalées. Les HPLNEC.B3 ont, quant à elles, des bords nets et présentent une forme moins arrondie, voire tétraédrique.

De plus, ces deux types cellulaires se développent à des vitesses différentes : les HSkMEC ont un cycle cellulaire plus lent ($\approx 32\text{h}$) que celui des HPLNEC.B3 ($\approx 19\text{h}$).

c. Angiogenèse

In vivo, une des fonctions principales des CE est de pouvoir former des vaisseaux sanguins. *In vitro*, cela peut se mimer en cultivant les cellules sur une matrice riche en facteurs de croissance et protéines de la matrice extra-cellulaire : le Matrigel™. La figure 28 montre la formation de pseudo-vaisseaux par les HSkMEC, en fonction du temps et une comparaison de l'angiogenèse à 24h, pour les deux types de cellules étudiés.

A CINÉTIQUE D'ANGIOGENESE SUR LES HSkMEC



B COMPARAISON A 24h

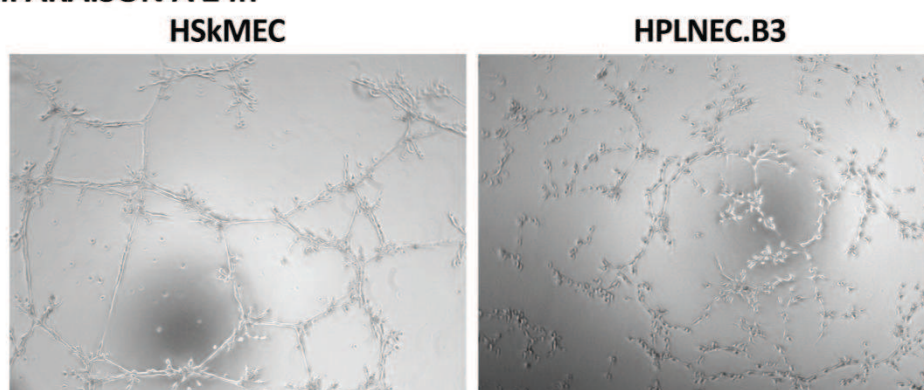


Figure 28 : Exemple de cinétique de l'angiogenèse des HSkMEC en normoxie (A) et comparaison de la structure finale des réseaux sur les HSkMEC et HPLNEC.B3 (B). Les CEMs sont déposées sur une fine couche de Matrigel™ à T0. La formation des pseudo-vaisseaux a été visualisée à l'aide du microscope inversé Zeiss Axiovert 200M et suivie pendant 24h en temps réel.

Au début de la cinétique, les CE migrent rapidement les unes vers les autres et se regroupent en amas. A partir de 10h après dépôt des CEMs sur le Matrigel™, les cellules s'étirent. Les amas indépendants sont joints par des pseudo-vaisseaux : c'est la formation des ramifications ou « branching ». On observe alors un réseau de CEM organisé et complexe (figure 28A). A la fin de la cinétique, il apparaît que l'angiogenèse des deux types cellulaires est légèrement différente : les

HSkMEC, par rapport aux HPLNEC.B3, ont tendance à former des réseaux plus importants avec des structures tubulaires longues et très organisées (figure 28B). Par cette technique, l'angiogenèse n'est pas stable longtemps, car après 24h, les réseaux ont tendance à se désagréger.

d. Les molécules de surface

Nous avons ciblé cette étude sur les molécules fortement impliquées dans l'angiogenèse, le recrutement leucocytaire et la liaison des chimiokines.

La figure 29 permet de visualiser le phénotype des HSkMEC et HPLNEC.B3 pour plusieurs molécules d'adhésion qui seront étudiées par la suite: PECAM-1/CD31, CD34, ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106 et VE-cadhérine/CD144.

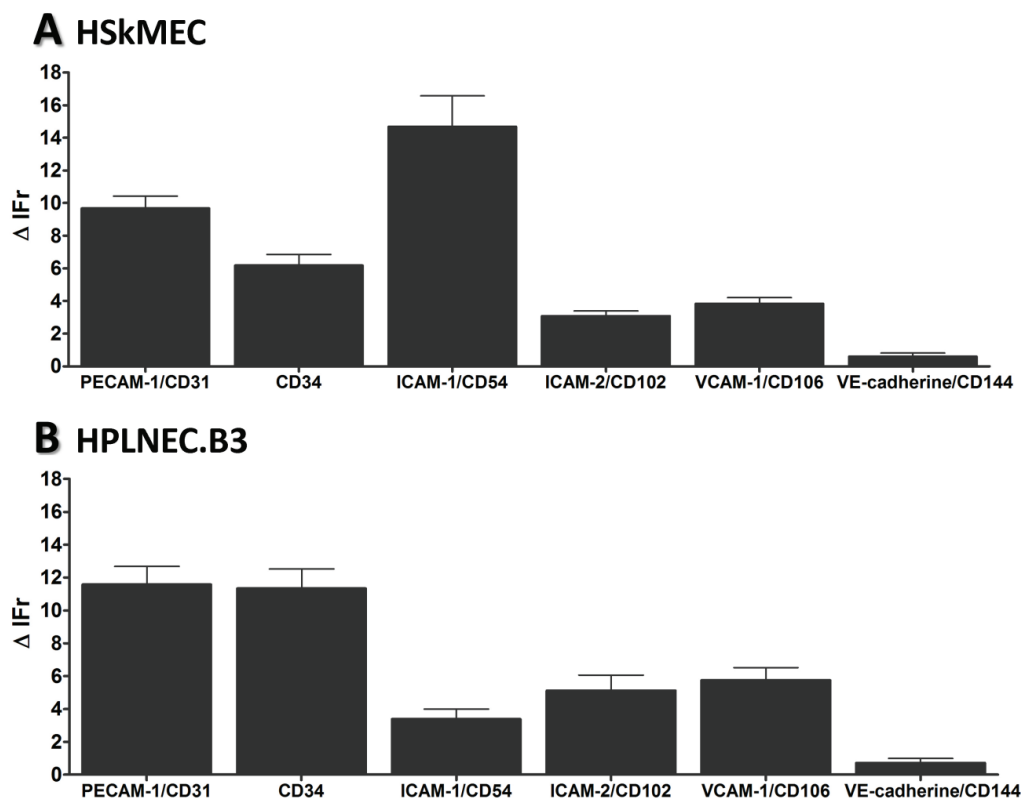


Figure 29 : Profil d'expression des molécules d'adhésion étudiées sur les lignées cellulaires HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B). Les niveaux d'expression ont été révélés par immuno-marquage et analysés par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en intensité de fluorescence relative (intensité de fluorescence pour le couple d'anticorps dirigé contre la molécule d'intérêt à laquelle est soustraite l'intensité de fluorescence de l'isotype correspondant). Moyenne de 7 à 42 expériences \pm SEM.

PECAM-1/CD31, marqueur spécifique des CEMs, est largement présent sur ces lignées. Ceci démontre, de nouveau²⁰⁵, que ces lignées ont conservé leur caractère endothélial. Les principales différences de profil d'expression viennent des autres molécules. CD34, une addressine ligand de la

L-selectine, présente une expression plus forte pour les HPLNEC.B3 ; le rôle de cet organe dans la domiciliation et le recrutement des lymphocytes tend à expliquer cette observation. ICAM-1/CD54 présente, à l'inverse, une expression plus importante sur les HSkMEC que les HPLNEC.B3. Cette molécule est largement impliquée dans les phénomènes d'inflammation, notamment de la peau. Deux des membres de la superfamille des immunoglobulines : ICAM-2/CD102 et VCAM-1/CD106 ont une expression 2 fois supérieure sur la lignée HPLNEC.B3 par rapport à HSkMEC. Par contre, VE-cadhérine/CD144 n'est quasiment pas exprimé à la surface des 2 types cellulaires ou les conditions expérimentales utilisées ne permettent pas de visualiser cette molécule d'adhésion.

De même, nous avons étudié plusieurs molécules impliquées dans la liaison aux chimiokines : les glycosaminoglycannes chondroïtine sulfate (CS) et héparanne sulfate (HS), ainsi que les récepteurs de chimiokines CCR5, CX₃CR1, CXCR4 et CCR7 (figure 30).

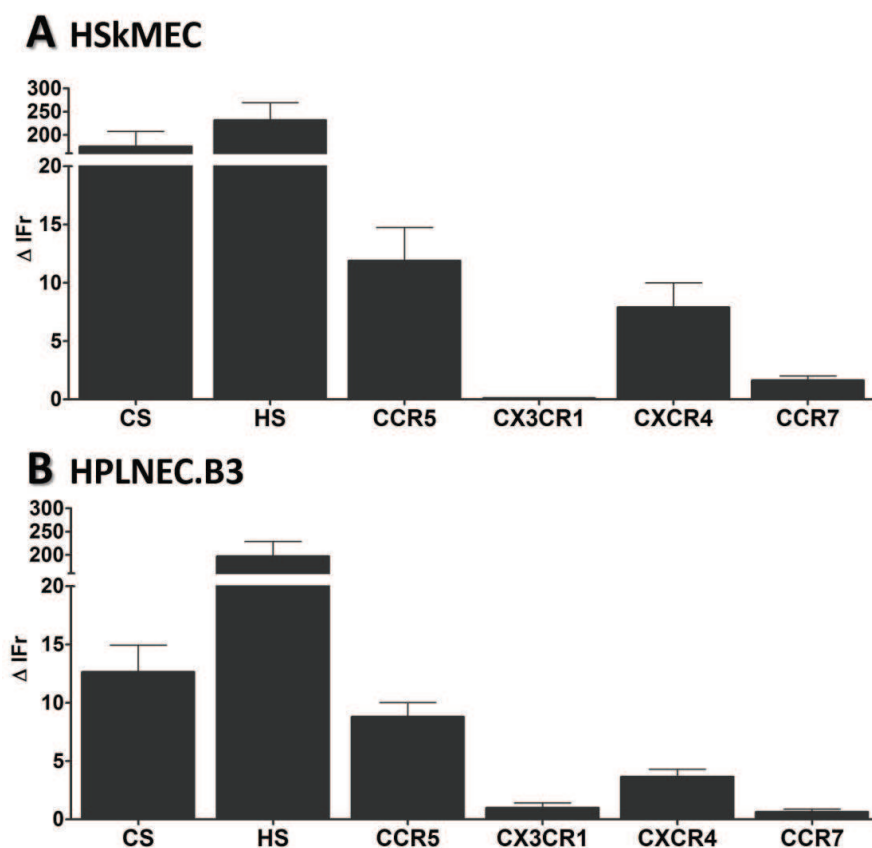


Figure 30 : Profil d'expression des molécules de liaison aux chimiokines étudiées sur les lignées cellulaires HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B). Les niveaux d'expression ont été révélés par immunomarquage et analysés par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en intensité de fluorescence relative (intensité de fluorescence pour le couple d'anticorps dirigé contre la molécule d'intérêt à laquelle est soustraite l'intensité de fluorescence de l'isotype correspondant). Moyenne de 9 à 17 expériences \pm SEM.

La CS est très exprimée sur la lignée HSkMEC uniquement, ce qui pourrait indiquer un recrutement leucocytaire augmenté dans la peau, grâce aux chimiokines liant ce GAG. En revanche, le taux de HS

est important et identique dans les 2 lignées. Pour les récepteurs de chimiokines, les profils présentés sont assez similaires, avec expression prédominante de CCR5, récepteur de RANTES, et CXCR4, récepteur de SDF-1.

e. La voie du NO[•]

Le monoxyde d'azote est un point central de cette étude. Par conséquent, nous avons étudié le statut des lignées HSkMEC et HPLNEC.B3 vis-à-vis de cette molécule et de sa voie de synthèse.

i. Les enzymes de production du NO[•]: les NO Synthases

Dans un premier temps, nous avons évalué la présence de deux des enzymes responsables de la production du NO[•] : la forme constitutive dans les CEs NOS3 et la forme inducible NOS2. Cette détection a été réalisée pour les ARNm et les protéines des NOS.

Expression des ARNm

La présence des ARN messagers codant ces protéines a été détectée pour les deux lignées (figure 31).

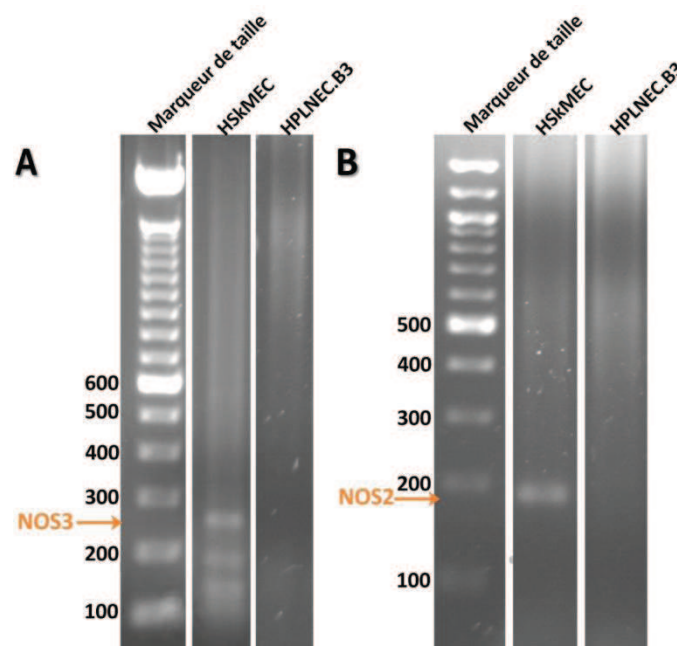


Figure 31 : Expression des ARN messagers de la NOS3 (A) et de la NOS2 (B) sur les lignées HSkMEC et HPLNEC.B3. Les ARN sont purifiés, puis transformés en ADN complémentaire, par transcription inverse. La séquence d'intérêt de l'ADNc est amplifiée en utilisant des amorces spécifiques, par PCR. Les produits de PCR sont visualisés sur gel d'agarose, additionné de BET, sous lampe à ultraviolets.

Il apparaît que les ARNm des deux NOS sont détectables dans les HSkMEC, alors que cela n'est pas le cas pour les HPLNEC.B3.

Expression protéique

Pour confirmer ces résultats, des Western blot ont été réalisés pour visualiser les protéines de la NOS3 (figure 32A) et de la NOS2 (figure 32B) dans les deux lignées en comparaison avec des cellules primaires HUVEC.

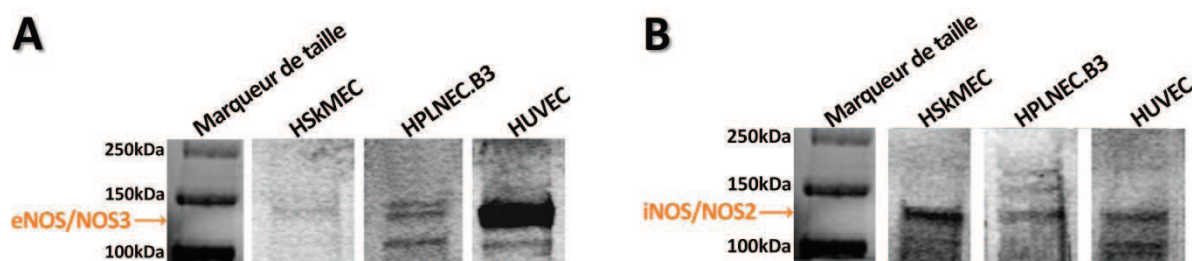


Figure 32 : Expression protéique de la NOS3 (A) et de la NOS2 (B) sur les lignées HSkMEC et HPLNEC.B3 en comparaison d'une primoculture d'HUVEC (2^{ème} passage). La détection est faite par Western blot. La fluorescence est quantifiée à l'aide du système d'acquisition d'image Odyssey[®] de LICOR. Les photos présentées ont été traitées de la même manière, hormis pour le marqueur de taille. Les résultats présentés correspondent à une culture cellulaire représentative sur les 6 réalisées.

La NOS3 a été mise en évidence dans les 2 lignées, mais plus faiblement que dans la lignée primaire d'HUVEC. En quantifiant les résultats par le logiciel ImageJ, nous avons évalué que la protéine était présente environ 20 fois moins dans les HSkMEC et 15 fois moins dans les HPLNEC.B3, que dans les HUVEC. La NOS2, par contre, est présente dans les trois types cellulaires avec une expression plus proche : les HPLNEC.B3 et HUVEC ont des taux similaires et HSkMEC présente environ 2 fois plus de NOS2 que les deux autres types cellulaires.

La différence au niveau ARNm entre HSKMEC et HPLNEC.B3 n'est pas retrouvée au niveau expression protéique. Au contraire, elle semble plus exprimée dans les HPLNEC.B3. Pour trancher sur ces différences, nous allons réaliser prochainement des expériences de PCR quantitative, permettant de visualiser la présence des ARNm codant la NOS3 dans les deux types cellulaires.

ii. La production de NO[•]

Dans un second temps, nous avons analysé la production de NO[•] par ces cellules, car bien que présentes, les NOS peuvent être dysfonctionnelles. Pour ce faire, nous avons utilisé la propriété du NO[•] à activer la GCs pour produire du GMPc. La détection de cette dernière molécule est plus facile que celle du NO[•], car le GMPc est plus stable. De plus, en utilisant le kit « cGMP [¹²⁵I] RIA » (Izotop), la détermination est quantitative et très sensible (à partir de 2 fmol par tube).

La figure 33A présente les résultats de quantification de GMPc dans les lignées cellulaires HSKMEC et HPLNEC.B3 en comparaison de culture primaire d'HUVEC.

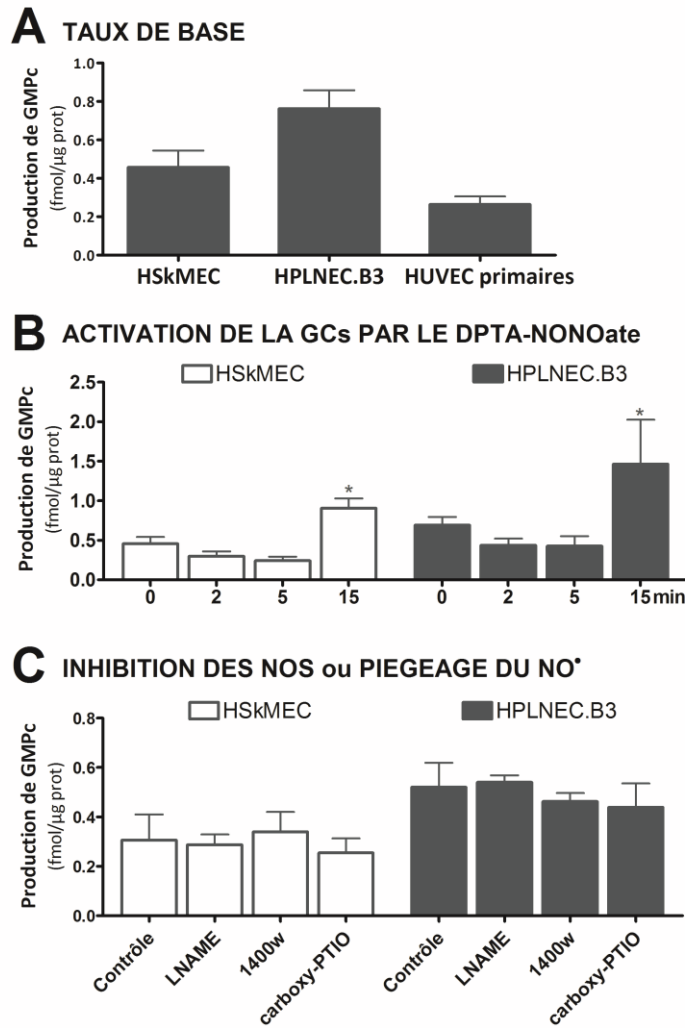


Figure 33 : Production de GMP cyclique par les lignées cellulaires HSkMEC et HPLNEC.B3. Taux de base, en comparaison avec des HUVEC primaires à p2 (moyenne de 2 expériences chacune en triplicat \pm SEM) (A) ; après traitement par le DPTA-NONOates pendant 2-15min (moyenne de 2 expériences chacune en triplicat \pm SEM) (B) et après diminution du taux cellulaire de NO^{*}, par inhibition des NOS (LNAME 0.1 mM et 1400w 1 μ M) pendant 24h ou piégeage du NO^{*} (carboxy-PTIO 0.2 mM) pendant 30 min (moyenne d'une expérience en triplicat \pm SEM) (C). Les résultats sont présentés en femtomoles de GMPc par microgramme de protéines.

Les taux de GMPc mesurés sont supérieurs dans les CEMs que dans les cultures primaires (figure 33A), en particulier dans les HPLNEC.B3, où cela est corrélé avec l'expression plus importante de la NOS3 que dans les HSkMEC. La présence de GMPc suppose une activation de la GCs par le NO^{*}.

Pour vérifier que le NO^{*} est capable d'activer la production de GMPc dans les lignées nous avons préalablement traité les cellules par le DPTA-NONOate à des temps courts (de 2 à 15 minutes), mais suffisants pour l'activation de la GCs. Les taux de GMPc comparés dans ces conditions sont présentés sur la figure 33B. Pour les deux lignées endothéliales, la production de GMPc est augmentée après 15 min en présence du NONOate. Dans notre système cellulaire, le NO^{*} est donc bien capable d'activer

la GCs, laissant supposer que le NO[•] est à l'origine de la production basale de GMPc observée précédemment (figure 33A).

Enfin, nous avons essayé de mettre en évidence l'implication du NO[•] dans la formation de GMPc observée, en inhibant les NOS ou en piégeant le NO[•] (figure 33C). Nous avons été surpris de voir que, pour aucune des deux lignées, les différentes molécules testées ne diminuent la production de GMPc. Dans notre modèle, la production basale de GMPc observée n'est donc peut-être pas dépendante de la production de NO[•]. Le même type d'expérience a été réalisé par les chercheurs de l'institut de recherche Servier : sur les HUVEC primaires, en inhibant les NOS par 10⁻⁴M de N-nitro-L-arginine, la production de GMPc est diminuée d'environ 30%. Le milieu de culture des HUVEC étant riche en L-Arginine, l'inhibition compétitive des NOS par le N-nitro-L-arginine n'est pas suffisante pour abolir totalement la synthèse de NO[•]. Dans notre système, il ne nous a pas été possible de connaître la composition exacte du milieu de culture, mais le même type d'explication reste possible.

iii. Discussion sur l'étude de la voie du NO[•]

Les passages successifs des cellules en culture sont souvent utilisés comme modèle de vieillissement et de dysfonction de l'endothélium. En effet, les CEs sénescents présentent une diminution de la production de NO[•]²¹⁴, une expression en NOS3 plus faible et un recrutement leucocytaire augmenté par rapport aux CEs à faibles nombres de passages²¹⁵. Cependant, Matsushita *et al.* ont montré que l'immortalisation de CEs par hTERT permet de préserver l'activité de la NOS3, la production de NO[•] et l'adhésion monocyttaire à des niveaux similaires à ceux des cellules primaires n'ayant subi que peu de passages en culture²¹⁵. Dans nos modèles cellulaires, nous avons montré que les NOS sont présentes, la NOS3 étant en plus faible quantité que dans les HUVEC primaires. Les résultats du dosage de GMPc attestent que nos modèles cellulaires produisent du GMPc, en quantité plus importante que les HUVEC et que la voie du GMPc est bien activée par un apport de NO[•] exogène. Cependant, il ne nous a pas été possible de montrer directement l'implication du NO[•] endogène dans ce processus car ni les inhibiteurs de NOS, ni un piègeur de NO[•] n'ont été capables d'inhiber cette production. Cette expérience n'ayant pu être réalisée qu'une seule fois, ce dernier point reste à confirmer. Dans la suite de ce travail, à l'inverse, nous vous présenterons des résultats qui montrent, indirectement, la production de NO[•] par les CEMs. Sachant que la cinétique de dosage du GMPc est très importante, les conditions expérimentales de mesure sont-elles idéales? Le milieu de culture est-il trop riche en L-Arginine pour permettre une inhibition importante de la production de NO[•]? L'activation de la guanylate cyclase est-elle attribuable à d'autres molécules, comme le monoxyde de carbone par exemple? Autant de questions restées en suspens, pour lesquelles des études complémentaires seraient nécessaires.

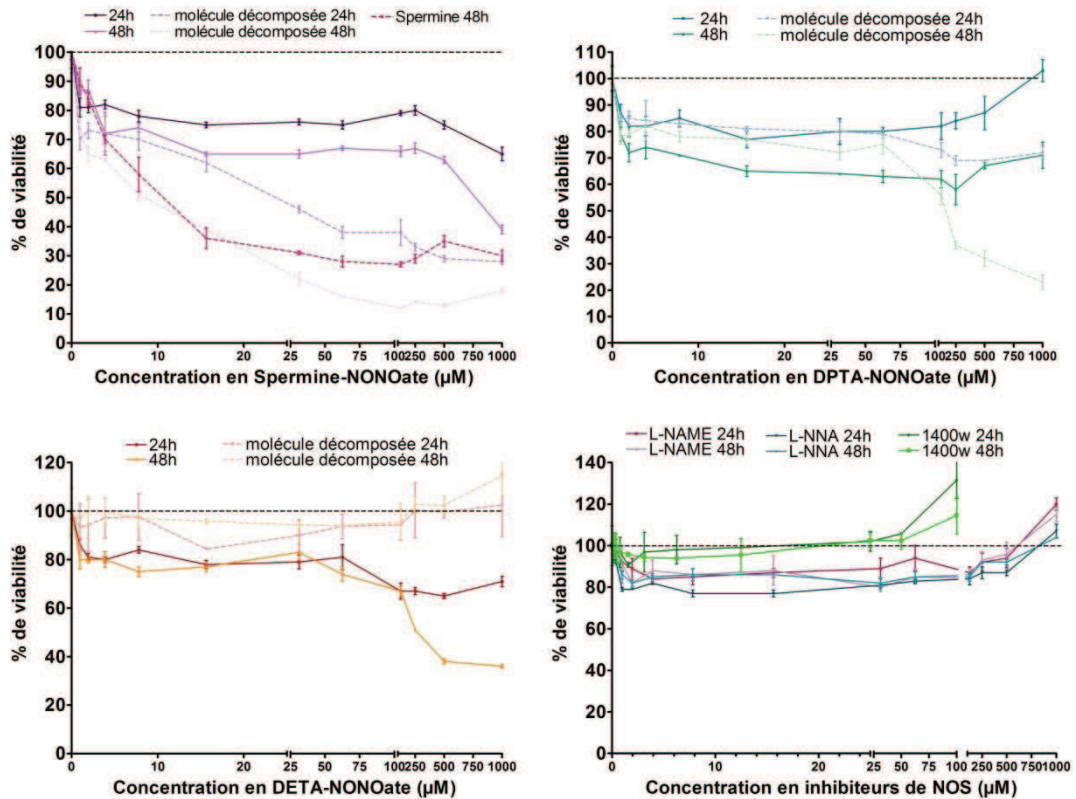
2. EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES UTILISEES POUR L'ETUDE

Pour étudier l'effet du NO[•], nous utilisons plusieurs molécules (donneurs de NO[•], inhibiteurs de NOS) qui sont susceptibles d'avoir un effet sur la viabilité des cellules. D'après la littérature, les concentrations classiquement utilisées pour les donneurs de NO[•] sont de 0.1 mM et pour les inhibiteurs de NOS de 0.1 mM pour le LNAME et LNNA et de 1-10 µM pour le 1400w. Afin de s'assurer que ces doses n'induisent pas de toxicité sur nos modèles cellulaires, nous avons réalisé une étude de la cytotoxicité, par la technique à l'Alamar Blue, ainsi que de l'apoptose, par la méthode TUNEL.

a. Evaluation de la toxicité cellulaire

Comme montré sur la figure 34, les donneurs de NO[•] ne présentent pas de toxicité à des doses faibles et moyennes. Seules les doses les plus fortes provoquent une diminution importante de la viabilité des CEMs.

A HSkMEC



B HPLNEC.B3

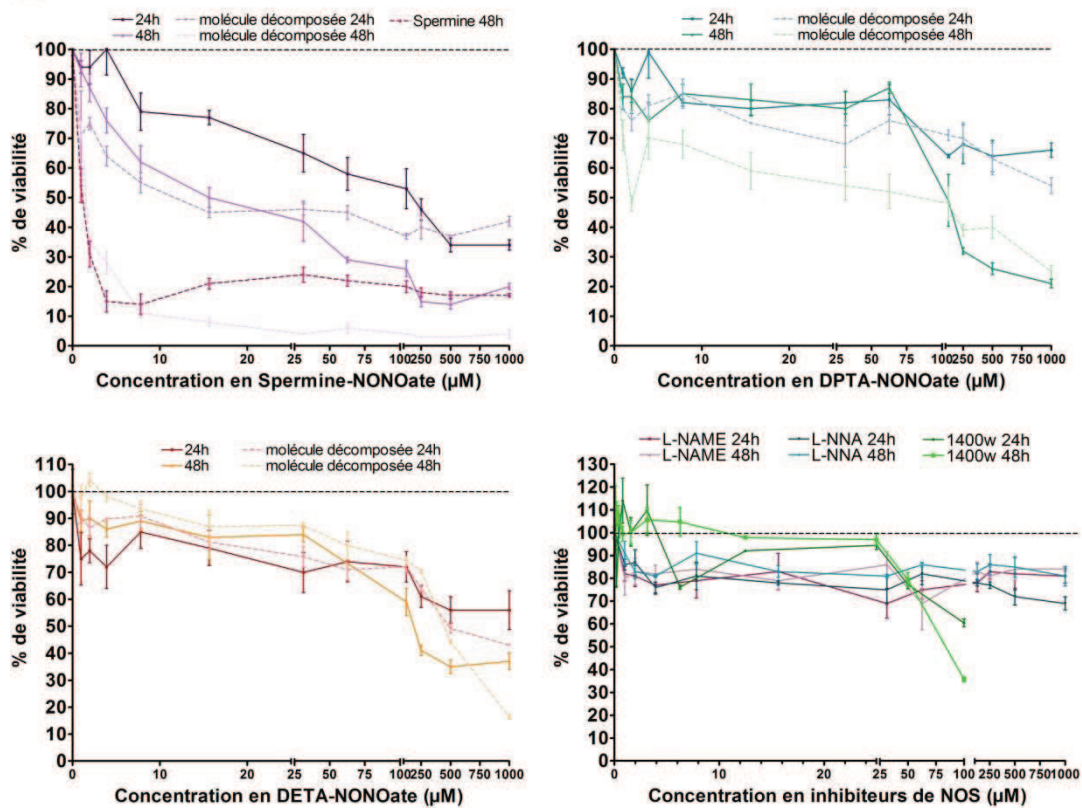


Figure 34 : Evaluation de la cytotoxicité des donneurs de NO° et inhibiteurs de NOS sur la lignée HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B), par la technique à l'Alamar BlueTM. Les résultats sont présentés en pourcentage de viabilité par rapport au témoin sans traitement (moyenne \pm SEM). Chaque expérience est réalisée en triplicat pour chaque concentration et chaque molécule à tester.

Plus précisément, les donneurs de NO^{*} actifs ont des toxicités faibles. Le NO^{*} libéré ne provoque pas ou peu, de lui-même, la mort des CEs, mais l'effet vient plutôt des produits de décomposition du donneur et s'accroît avec la durée du traitement. Dans les conditions utilisées et quel que soit le temps de culture, les inhibiteurs de NOS n'ont qu'une faible cytotoxicité.

Parmi les donneurs de NO^{*}, la spermine-NONOate est la molécule la plus toxique, puis la mortalité va en diminuant pour les molécules ayant des flux de NO^{*} plus faibles. La haute toxicité de la spermine-NONOate, autant active que décomposée, s'explique car le principal produit de décomposition de ce donneur est la spermine. En réalisant l'étude avec la spermine seule, nous avons montré que cette polyamine a un fort pouvoir cytotoxique sur nos cellules. En effet, la spermine affecte la structure secondaire et tertiaire de macromolécules et provoque la formation de catabolites toxiques. Ainsi, l'ajout exogène de polyamines est capable de perturber le métabolisme cellulaire et d'induire l'apoptose²¹⁶. Certains analogues des polyamines sont d'ailleurs utilisés pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses^{217,218}.

Classiquement, les études expérimentales utilisent les donneurs de NO^{*} et les inhibiteurs de NOS (L-NAME et L-NNA) à une concentration de 0.1 mM. Sur les HSkMEC, le pourcentage de viabilité des molécules testées à cette dose est évalué à :

- 70% à 24h et 48h pour le DETA-NONOate
- 80% à 24h et 62% à 48h pour le DPTA-NONOate
- 77% à 24h et 67% à 48h pour la Spermine-NONOate
- >80% à 24h et 48h pour les inhibiteurs de NOS (L-NAME et L-NNA)

Le 1400w est utilisé à des doses de 1 à 10 µM pour inhiber spécifiquement l'action de la NOS2. A ces concentrations, la viabilité des HSkMEC est supérieure à 90%.

Pour les HPLNEC.B3, la viabilité en présence des molécules à tester à 0.1 mM est évaluée à :

- 73% à 24h et ≈70% à 48h pour le DETA-NONOate
- ≈70% à 24 et 48h pour le DPTA-NONOate
- 55% à 24h et 27% à 48h pour la Spermine-NONOate
- >80% à 24h et 48h pour les inhibiteurs de NOS (L-NAME et L-NNA)

Le 1400w est utilisé à des doses de 1 à 10 µM pour inhiber spécifiquement l'action de la NOS2. A ces concentrations, la viabilité des HPLNEC.B3 est supérieure à 90%.

Les diminutions d'intensité de fluorescence de l'Alamar BlueTM, c'est-à-dire de viabilité, en présence de ces molécules sont certainement dues à une mort cellulaire et/ou une diminution de la prolifération cellulaire. En effet, le test est basé sur la réduction de l'Alamar BlueTM par les cellules

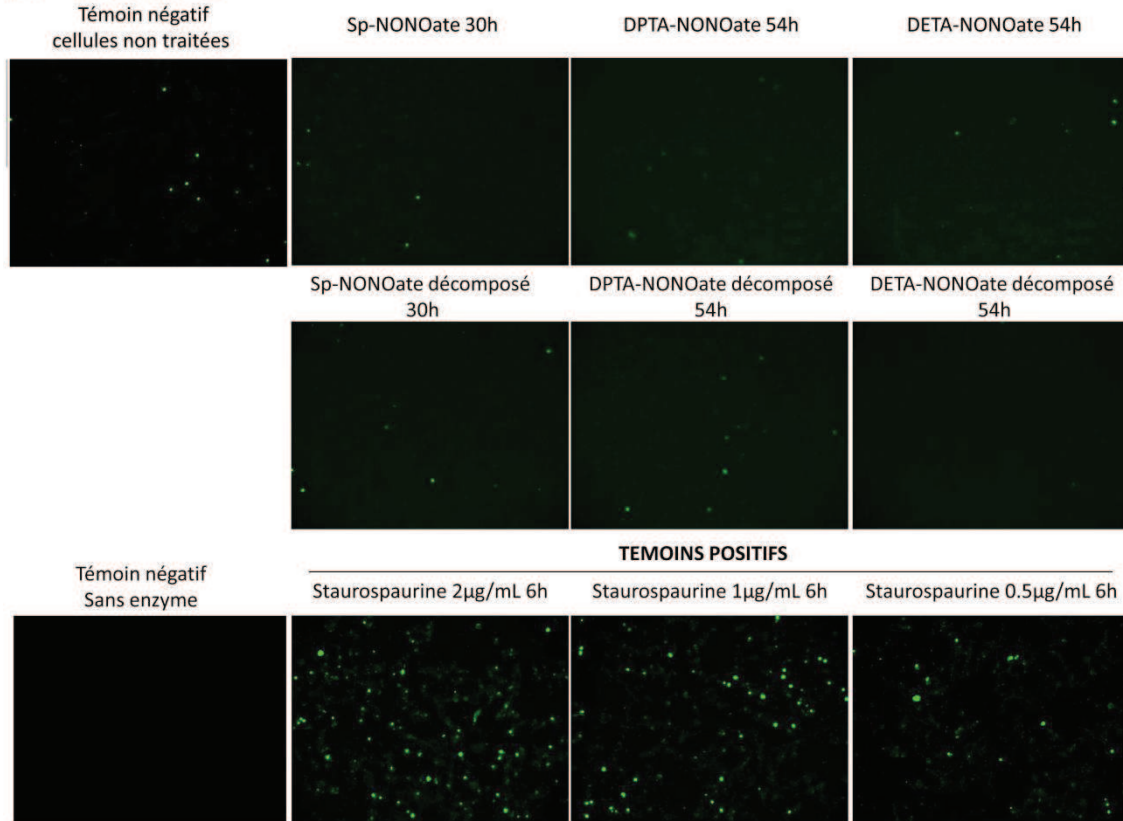
vivantes, ce qui fait qu'il n'est pas possible de discriminer la mortalité d'une inhibition de la croissance cellulaire.

En conclusion, l'analyse de la cytotoxicité nous a permis de définir les conditions expérimentales pour la mise en place des études suivantes. Les traitements par les donneurs de NO[•] iront jusqu'à 48h, hormis pour la spermine-NONOate, qui sera utilisée à 0.1 mM pendant 24h, du fait de sa forte toxicité. Pour les inhibiteurs de NOS, L-NAME et L-NNA seront employés à 0.1 mM et le 1400w à 1 ou 10 µM jusqu'à 48h.

b. Evaluation de l'apoptose

Dans les expériences précédentes de toxicité, nous avons observé une diminution de la viabilité et/ou de la prolifération cellulaire, principalement pour les donneurs de NO[•]. Afin de vérifier que, dans les conditions définies, les NONOates n'induisent pas l'apoptose des CEMs, nous avons mis en place une technique très sensible de détection de l'apoptose : la méthode TUNEL. Pour ces expériences, nous nous sommes placés à des temps supérieurs de 6h à ceux des conditions précédemment définies. En effet, il faut environ 6h à une cellule saine de notre modèle cellulaire pour arriver au stade de l'apoptose auquel l'ADN est fragmenté. Ainsi nous nous assurons que les cellules n'entrent pas en apoptose jusqu'à la fin du traitement. Les résultats sont présentés sur la figure 35.

A HSkMEC



B HPLNEC.B3

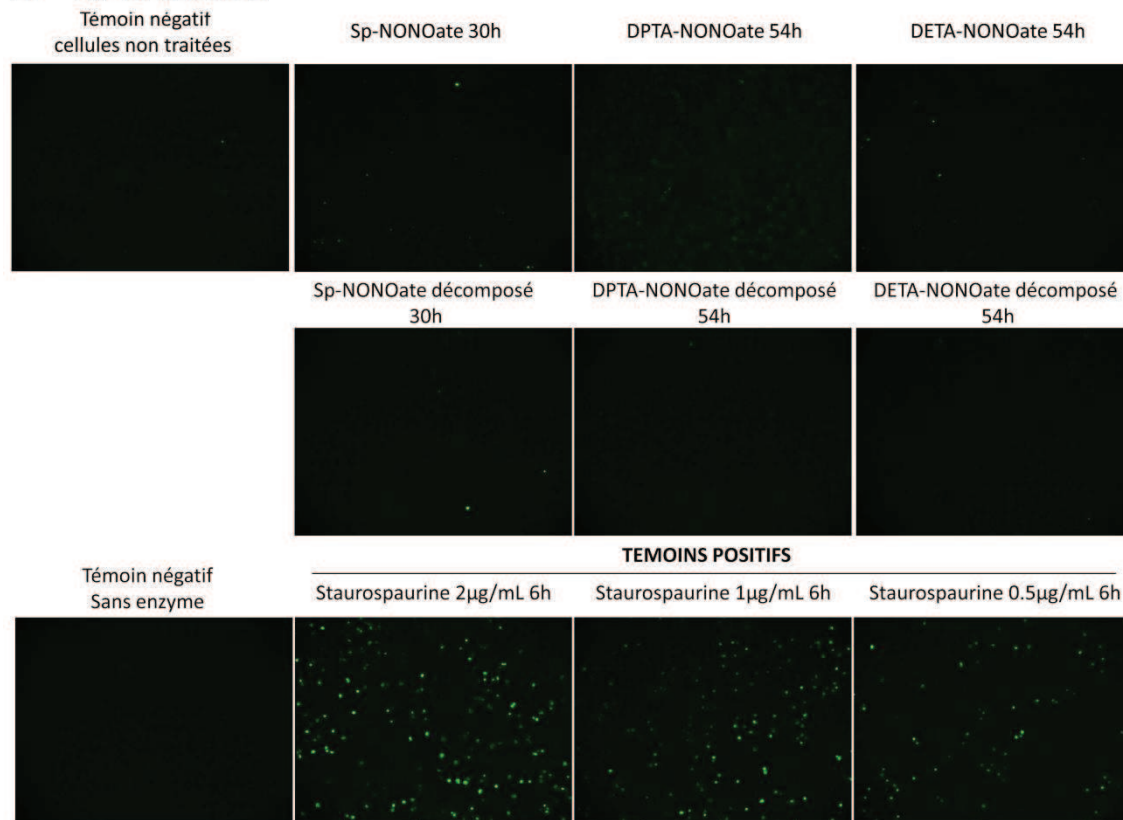


Figure 35 : Evaluation de l'induction de l'apoptose par les donneurs de NO sur les lignées HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B), par la technique TUNEL. Les CEMs sont incubées en présence ou non des molécules à tester pendant les temps indiqués. La fluorescence des échantillons est visualisée au microscope inversé à fluorescence Zeiss Axiovert 200M, en comparaison d'un témoin non traité et des témoins négatifs sans l'enzyme Tdt. Le résultat présenté correspond à une expérience représentative des 2 réalisées chacune en duplicat.

Pour les deux lignées, le témoin avec cellules non traitées n'a que quelques points fluorescents, marqueur de cellules en apoptose. Aucun des donneurs de NO[•] ne montre une induction de l'apoptose comparativement au témoin sans traitement. Cette observation est vraie autant pour les donneurs de NO[•] actifs que pour les molécules entièrement décomposées, qui, dans l'ensemble, provoquent une plus forte cytotoxicité. La staurosporine, un puissant inducteur de l'apoptose utilisé comme ici comme témoin positif, a effectivement provoqué une apoptose bien visible des CEMs. Le nombre de cellules touchées augmente avec la concentration en staurosporine. Comme marqueur de la spécificité de la réaction, un témoin sans Tdt, enzyme permettant l'intégration des dUDP fluorescents dans l'ADN génomique, est utilisé. Ce témoin ne présente aucun point fluorescent.

c. Conclusion sur la toxicité et l'apoptose induites par le NO[•]

Le NO[•] joue un rôle central dans les voies de signalisations de mort cellulaire et de survie. Selon le type cellulaire et la concentration, le NO[•] peut être anti- ou pro-apoptotique. A faible concentration, le NO[•] inhibe l'apoptose par des actions protectrices : il limite la peroxydation lipidique, empêche la dépolarisation mitochondriale et induit l'expression de certaines protéines de contrôle du stress oxydant (glutathion et metallothionéine). De plus, le NO[•] peut avoir une action inhibitrice sur les caspases par S-nitrosation. A l'inverse, le NO[•] induit l'apoptose à forte concentration, principalement en provoquant des dommages sur l'ADN, ce qui déclenche l'activation des caspases, via p53. Le NO[•] peut aussi avoir des effets délétères directement sur les mitochondries²¹⁹. Récemment, Thomas *et al.* ont évalué les concentrations en NO[•] responsables de chacune de ces actions biologiques. Sur des cellules de carcinome de sein MCF7, les doses faibles de NO[•] (1-30 nM) induisent une prolifération cellulaire, par des effets dépendants du GMPc. En revanche, 400 nM de NO[•] est le seuil de concentration locale à partir duquel des effets cytostatiques et apoptotiques sont observés¹⁸⁷. Dans notre modèle, les donneurs de NO[•] utilisés n'induisent pas l'apoptose, dans les conditions de l'expérience. Par conséquent, les diminutions d'intensité de fluorescence de l'Alamar BlueTM en présence des donneurs de NO[•] sont certainement dues à une diminution de la prolifération cellulaire et/ou éventuellement à une nécrose.

En conclusion, les résultats des expériences de toxicité cellulaire et de détection de l'apoptose permettent de définir les conditions optimales d'utilisation pour chaque donneur de NO[•]. Une concentration de 0.1 mM pendant 48h pour le DPTA-NONOate et le DETA-NONOate et pendant 24h pour la Spermine-NONOate se révèlent n'être ni trop fortement cytotoxique ni pro-apoptotique. Nous utiliserons donc ces conditions de concentration et de temps pour les expériences ultérieures.

3. NO[•] & ANGIOGENÈSE

La reconnaissance cellulaire est un mécanisme clef de l'angiogenèse. En effet, deux CEs sont attirées l'une vers l'autre, entrent en contact, sont reconnues l'une par l'autre ce qui induit un mécanisme cellulaire commun: la formation de pseudo-vaisseaux. Les molécules clefs de ce processus sont les molécules d'adhésion à la surface des cellules, car elles permettent le contact et une reconnaissance spécifique des deux types cellulaires.

Nous avons vu dans l'introduction de cette thèse que le NO[•] est fortement impliqué à plusieurs stades de la cancérogenèse. Néanmoins sa fonction exacte reste, pour le moment, imprécise. A la suite de cet état des lieux, nous avons posé l'hypothèse que le NO[•] pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance cellulaire, expliquant qu'il ait des actions multiples. Plusieurs équipes ont déjà travaillé dans ce sens, mais les résultats sont souvent contradictoires selon le microenvironnement et le type cellulaire. Par exemple, Waldow *et al.*²²⁰ ont montré qu'une préincubation avec le S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) inhibe l'induction de VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54 et E-sélectine/CD62E par le TNF α , dans un modèle de cellules macrovasculaires. En revanche, Jiang *et al.*^{221,222} n'observent aucune modification d'expression de ces mêmes molécules sur des CEMs de peau et de poumon. En conséquence, pour élucider ces différences, l'utilisation de modèles cellulaires ayant une organo-spécificité préservée, comme les HPLNEC.B3 et HSkMEC, est primordiale.

Dans une première partie, nous avons donc tenté d'élucider le rôle du NO[•] lors de l'angiogenèse tumorale. Cela a été réalisé en partant de l'observation de son effet sur le phénomène d'angiogenèse (*in vitro*, sur MatrigelTM). Puis, nous avons étudié les deux étapes principales de ce mécanisme : la migration des CEs et les interactions entre CEs. Enfin, les résultats nous ont amené à nous focaliser sur l'adhésion entre les cellules, pour enfin étudier ses aspects moléculaires : l'expression des molécules d'adhésion impliquées lors de l'angiogenèse. Pour apporter du NO[•] exogène à des concentrations distinctes dans le microenvironnement et mimer des flux différents de NO[•], nous avons utilisé trois donneurs de NO[•] : la spermine-NONOate, le DPTA-NONOate et le DETA-NONOate.

a. Effet du NO[•] sur la formation de pseudo-vaisseaux

Dans un premier temps, pour connaître le rôle du NO[•] lors de l'angiogenèse, nous avons mis en place une technique de visualisation de la formation de néo-vaisseaux sur une matrice spécifique : le MatrigelTM.

i. Effet d'un apport de NO[•] exogène par les NONOates sur l'angiogénèse

L'impact d'un apport exogène de NO[•], par plusieurs donneurs de NO[•], lors de la formation de pseudo-vaisseaux, a été évalué. Les résultats en présence de spermine-NONOate et de DPTA-NONOate sont présentés sur la figure 36.

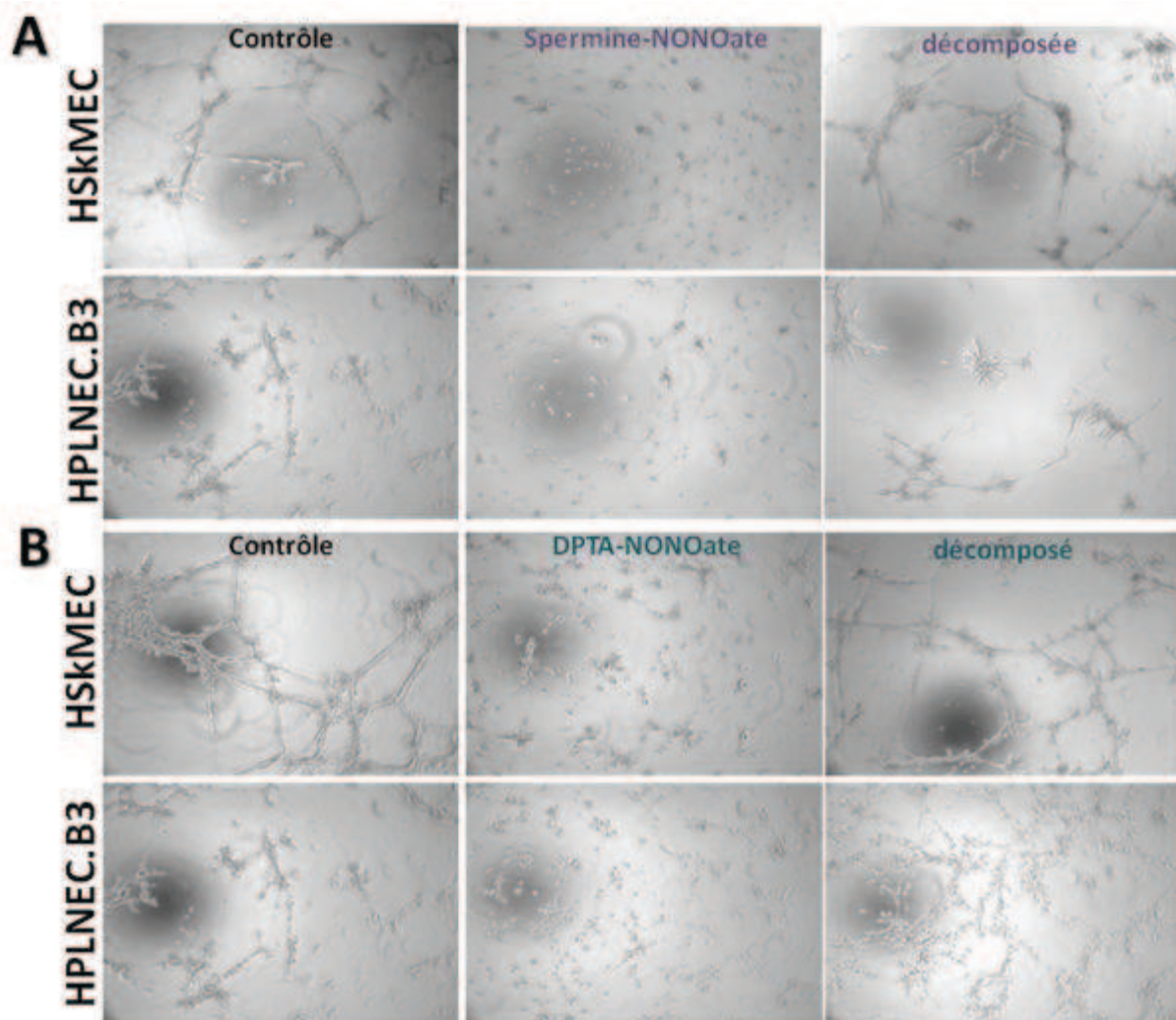


Figure 36 : Effet de deux flux de NO[•], mimé par des donneurs de la famille des NONOates : Spermine-NONOate (A) et DPTA-NONOate (B), sur l'angiogénèse des lignées HSkMEC et HPLNEC.B3. Les CEMs ont été préincubées en présence de donneurs de NO[•] actifs ou décomposés (0.1 mM) pendant 6h pour la spermine-NONOate et 24h pour le DPTA-NONOate. La formation des pseudo-vaisseaux en présence des mêmes molécules a été visualisée sur le microscope inversé Zeiss Axiovert 200M et suivie pendant 24h. Les résultats à 18h (Spermine-NONOate, A) et à 24h (DPTA-NONOate, B) d'angiogénèse sont présentés et correspondent à une expérience représentative des 3 réalisées chacune en duplicat.

Les résultats ont été analysés en comptant le nombre de vaisseaux de plus de 50 µm, présents pour chaque condition. De plus, la taille moyenne de tous les pseudo-vaisseaux a été calculée par condition. Les quantifications sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Effet de deux donneurs de NO^o sur l'angiogenèse des lignées HSkMEC et HPLNEC.B3 – Quantification de l'angiogenèse par la détermination du nombre et de la taille moyenne des pseudo-vaisseaux. Les valeurs en couleurs sont significativement différentes des témoins.

Traitement des cellules	HSkMEC				HPLNEC.B3			
	Nombre de vaisseaux (>50 µm) % du contrôle		Taille moyenne des vaisseaux (en µm) Moyenne ±SEM % du contrôle		Nombre de vaisseaux (>50 µm) % du contrôle		Taille moyenne des vaisseaux (en µm) Moyenne ±SEM % du contrôle	
Témoin	35	100	172±10	100	22	100	172±19	100
Sp-NONOate	0	0	33±5	19	2	9	51±17	30
Sp-NONOate décomposé	25	72	211±27	123	22	100	211±32	122
DPTA-NONOate	38	110	77±6	45	15	68	46±4	27
DPTA-NONOate décomposé	60	173	149±11	87	106	482	119±6	69

La mesure de la taille moyenne des vaisseaux est reprise et est présentée dans la figure 37 sous la forme d'histogrammes, pour une meilleure visualisation des résultats.

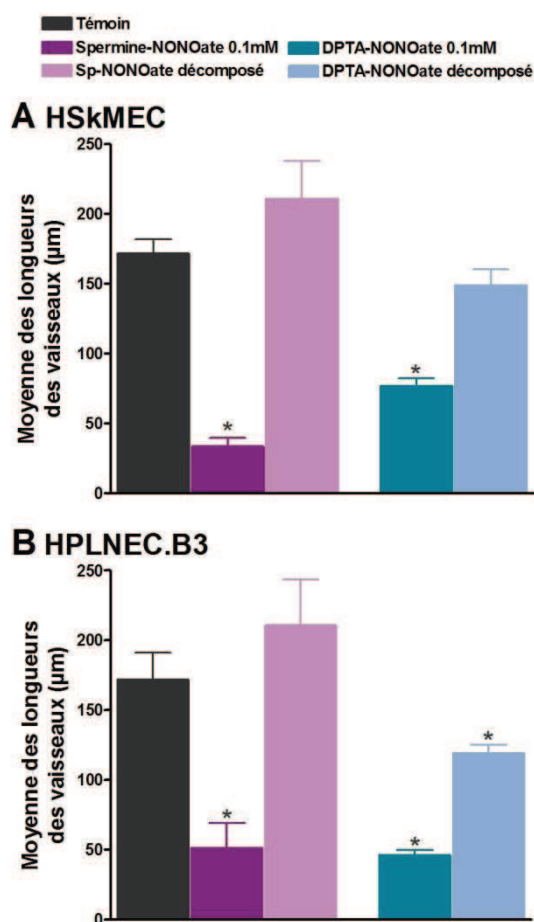


Figure 37 : Effet de deux donneurs de NO^o sur l'angiogenèse des lignées HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B) – Quantification de l'angiogenèse par la mesure de la taille moyenne des pseudo-vaisseaux (moyenne ±SEM).

Pour les deux types cellulaires, la formation des pseudo-vaisseaux est largement inhibée par les donneurs de NO[•]. Les CEMs sont restées arrondies sur la matrice, il n'y a pas ou peu de regroupements cellulaires, donc la migration cellulaire et/ou les interactions cellulaires sont diminuées. En conséquence, les cellules ne sont peu/pas interconnectées par des pseudo-vaisseaux. Les quantifications réalisées confirment ces observations : les HSkMEC présentent une diminution de 81% et 55% de la longueur moyenne des vaisseaux après un traitement par la spermine-NONOate et le DPTA-NONOate, respectivement. Pour les HPLNEC.B3, les inhibitions sont supérieures à 70% pour les deux donneurs de NO[•]. Le nombre de pseudo-vaisseaux d'une taille supérieure à 50 µm est aussi largement diminué après les traitements, sauf sur les HSkMEC en présence de DPTA-NONOate. L'effet observé vient bien du NO[•] et non des autres produits de dégradation des NONOates, puisque les donneurs de NO[•] décomposés n'ont pas/peu d'effet sur l'angiogenèse. La même expérience réalisée avec le DETA-NONOate n'a montré aucun effet sur l'angiogenèse (résultats non présentés).

La spermine-NONOate (figure 36A) a un effet plus intense que le DPTA-NONOate (figure 36B), tant par la diminution de la taille que du nombre de pseudo-vaisseaux. L'angiogenèse est donc d'autant plus inhibée que le flux de NO[•] est fort. Pour une même quantité totale de NO[•] fourni, une libération intense et courte semble plus efficace pour empêcher toute angiogenèse qu'une libération plus longue mais moins importante.

En conclusion, nous avons montré que l'apport de NO[•] exogène, par des NONOates générant un flux modéré ou important de NO[•], inhibe fortement l'angiogenèse.

ii. Effet du NO[•] endogène sur l'angiogenèse

Après avoir évalué l'effet d'un apport de NO[•] exogène sur l'angiogenèse, nous avons voulu définir le rôle du NO[•] endogène. Pour cela, nous avons poursuivi l'étude en utilisant des inhibiteurs de NOS : L-NAME et L-NNA, inhibiteurs constitutifs des NOS, et 1400w, inhibiteur sélectif de la NOS2 (Figure 38A). Dans un second temps et pour se rapprocher des conditions physiologiques de l'angiogenèse tumorale, nous avons réalisé la même expérience non plus en normoxie (21% O₂), mais en hypoxie (1% O₂) (Figure 38B).

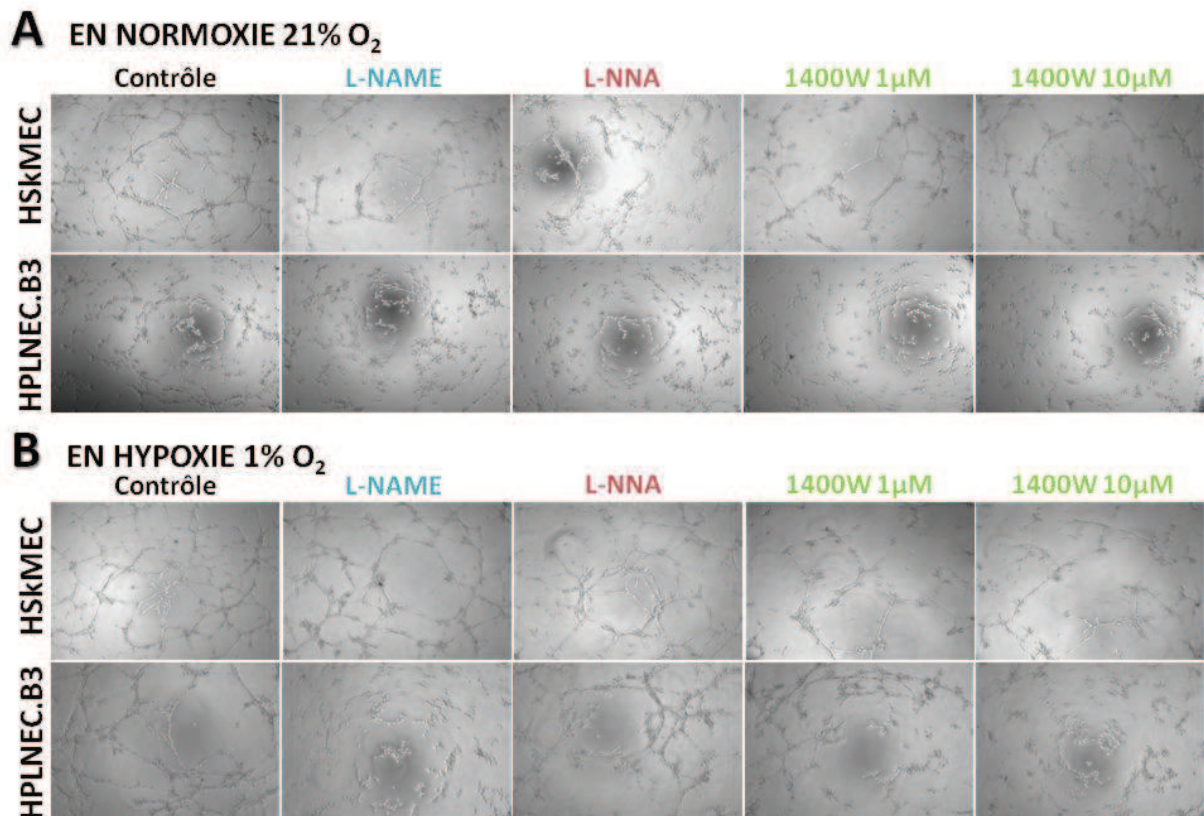


Figure 38 : Rôle du NO[•] endogène lors de l'angiogenèse en normoxie (21% O₂, A) et en hypoxie (1% O₂, B), visualisé par les inhibiteurs de NOS : L-NAME, L-NNA et 1400w. HPLNEC.B3 ou HSkMEC ont été préincubées en présence des inhibiteurs de NOS (L-NAME et L-NNA, 0.1 mM; 1400w, 1 et 10 μ M) pendant 24 h. La formation des pseudo-vaisseaux en présence des mêmes molécules a été visualisée sur le microscope inversé Zeiss Axiovert 200M et suivie pendant 24h. Les résultats à 8h (en hypoxie, B) et à 24h (en normoxie, A) de culture sont présentés et correspondent à une expérience représentative des 3 réalisées chacune en duplicat.

Même si l'organisation des CEMs en réseau est approximativement la même entre la normoxie et l'hypoxie, les cinétiques sont différentes. En hypoxie, elle est accélérée et au bout de 8h seulement, on peut observer des réseaux similaires à ceux obtenus après 24h de normoxie. En effet, la forte hypoxie stabilise la molécule HIF1 α , qui, en se complexant à HIF1 β , se lie aux éléments de réponse à l'hypoxie induisant la transcription de divers gènes. Plusieurs facteurs de croissance, dont le VEGF, sont ainsi surexprimés. Cela a pour conséquence d'activer intensivement les CE à former des pseudo-vaisseaux. Par ailleurs, lors de l'introduction, nous avons vu que les expressions de NOS2 et NOS3 sont activées par l'hypoxie. De plus, il a été démontré récemment que les nitrites peuvent être réduits en NO[•]. Les enzymes responsables sont la xanthine oxidase¹⁷⁰ et la NOS3²²³, respectivement en hypoxie et en anoxie. En condition hypoxique, la production de NO[•] est donc accrue.

Les résultats d'angiogenèse ont été analysés en comptant le nombre de vaisseaux de plus de 50 μ m, présents pour chaque condition. De plus, la taille moyenne de tous les pseudo-vaisseaux a été calculée par condition. Les quantifications sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Rôle du NO[•] endogène lors de l'angiogenèse des HSkMEC et HPLNEC.B3, en normoxie (21% O₂) et en hypoxie (1% O₂), visualisé par des inhibiteurs de NOS – Quantification de l'angiogenèse par la détermination du nombre et de la taille moyenne des pseudo-vaisseaux. Les valeurs en couleurs sont significativement différentes des témoins.

Traitement des cellules	HSkMEC				HPLNEC.B3			
	Nombre de vaisseaux (>50 µm)		Taille moyenne des vaisseaux (en µm)		Nombre de vaisseaux (>50 µm)		Taille moyenne des vaisseaux (en µm)	
	% du contrôle		Moyenne ±SEM	% du contrôle	% du contrôle		Moyenne ±SEM	% du contrôle
EN NORMOXIE								
Témoin	99	100	110±7	100	109	100	87±4	100
LNAME	71	72	108±9	98	79	72	62±4	71
LNNA	46	46	87±7	79	59	54	53±3	61
1400w 1µM	46	46	92±8	84	48	44	75±6	86
1400w 10µM	61	62	89±7	81	15	14	38±3	43
EN HYPOXIE								
Témoin	131	100	108±5	100	70	100	145±13	100
LNAME	114	87	110±5	102	49	70	61±3	42
LNNA	89	68	112±7	104	81	116	102±6	70
1400w 1µM	43	33	122±11	113	59	84	77±5	53
1400w 10µM	54	41	119±10	110	20	29	45±3	31

Ces mesures sont présentées dans la figure 39 sous la forme d'histogrammes, pour une meilleure visualisation des résultats.

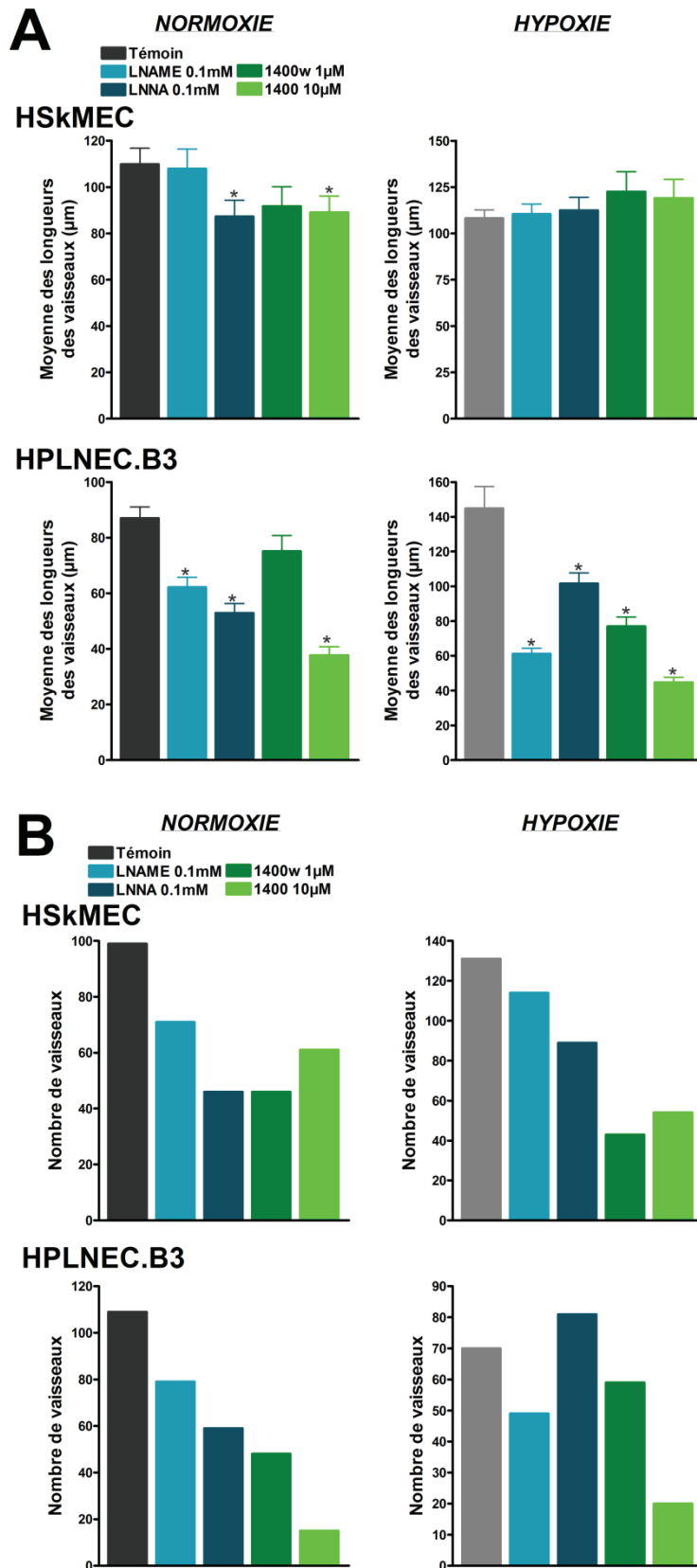


Figure 39 : Rôle du NO^e endogène lors de l'angiogenèse des HSkMEC et HPLNEC.B3, en normoxie (21% O₂) et en hypoxie (1% O₂), visualisé par des inhibiteurs de NOS. A : Quantification de l'angiogenèse par la mesure de la taille moyenne des pseudo-vaisseaux (moyenne ±SEM). B : Quantification de l'angiogenèse par décombrement des pseudo-vaisseaux.

En normoxie, le L-NAME et/ou le L-NNA induisent une inhibition de l'angiogénèse. Cet effet est très marqué sur les HPLNEC.B3 avec une forte diminution de la taille (-29% et -39% pour le L-NAME et le L-NNA, respectivement) et du nombre des pseudo-vaisseaux (-58% pour le L-NAME et -30% pour le L-NNA). Sur les HSkMEC, les modulations sur le nombre de pseudo-vaisseaux sont proches de celles des HPLNEC.B3 (-28% pour le L-NAME et -54% pour le L-NNA) mais beaucoup moins fortes en considérant la taille des vaisseaux. Le 1400w, quant à lui, montre un pouvoir inhibiteur fort (-54% au maximum pour les HSkMEC et -84% au maximum pour les HPLNEC.B3), indiquant l'implication de la NOS2 dans l'angiogénèse.

En hypoxie, il est intéressant de remarquer que, lors de l'angiogénèse des HSkMEC, seul le nombre de vaisseaux est modulé par les inhibiteurs de NOS (de -13 à -67%), alors que leur taille reste équivalente avec ou sans traitement. L'angiogénèse des HPLNEC.B3 en hypoxie est fortement inhibée par les inhibiteurs de NOS. Cela se traduit autant par une diminution du nombre de vaisseaux (de -16% à -71%) que de leur taille moyenne (de -30% à -69%). Cela démontre une différence majeure de réponse aux inhibiteurs de NOS et vraisemblablement des modulations sous-jacentes spécifiques selon le type cellulaire. De même qu'en normoxie, l'effet du 1400w est plus important que celui des autres inhibiteurs de NOS, ce qui prouve le rôle de la NOS2 lors de l'angiogénèse en hypoxie.

Cependant toutes ces diminutions sont beaucoup moins importantes qu'en présence des donneurs de NO[•]. Ceci peut s'expliquer par une production de NO[•] en hypoxie indépendante de sa synthèse à partir de la L-arginine par les NOS. Là où une surproduction de NO[•] par les donneurs empêche toute angiogénèse, l'inhibition de la production de NO[•] par les NOS ne fait que diminuer partiellement la formation des pseudo-vaisseaux.

iii. Conclusion sur l'impact du NO[•] sur l'angiogénèse

Par cette étude, nous montrons que le NO[•] endogène est nécessaire à l'angiogénèse, puisque l'inhibition de sa synthèse diminue la formation des pseudo-vaisseaux. En revanche, de fortes concentrations de NO[•] inhibent l'angiogénèse. Dans notre modèle, nous montrons que la NOS2 est fortement impliquée dans la formation des pseudo-vaisseaux et que les NONOates produisant un flux continu et contrôlé de NO[•] sont capables d'inhiber cette angiogénèse. Depuis Pipili-Synetos *et al.* en 1994²²⁴, plusieurs auteurs ont rapportés des résultats approchants, en expliquant que le NO[•] diminue l'angiogénèse par un défaut de migration²²⁵ ou de prolifération des CE^s²²⁶.

En hypoxie, il apparaît que la surproduction de NO[•] est impliquée dans l'accélération de l'angiogénèse. Cela a été observé plusieurs fois dans des modèles *in vitro*¹⁷⁷ ou *in vivo*²²⁷. Nous complétons ces données en montrant que la NOS2 est impliquée dans l'angiogénèse en hypoxie,

puisque l'augmentation de la formation des pseudo-vaisseaux est réversée par le L-NAME et le 1400w.

Lors de l'angiogenèse, nous avons vu que les CEs migrent les unes vers les autres afin d'interagir ensemble pour former des pseudo-vaisseaux. Pour approfondir le rôle du NO[•] dans ce mécanisme, nous avons cherché à déterminer quels sont les mécanismes cellulaires impliqués dans l'angiogenèse et modulés par le NO[•]. Dans la suite de ce travail nous étudierons la migration des CEs ainsi que les interactions entre les cellules, à la fois au niveau cellulaire et moléculaire.

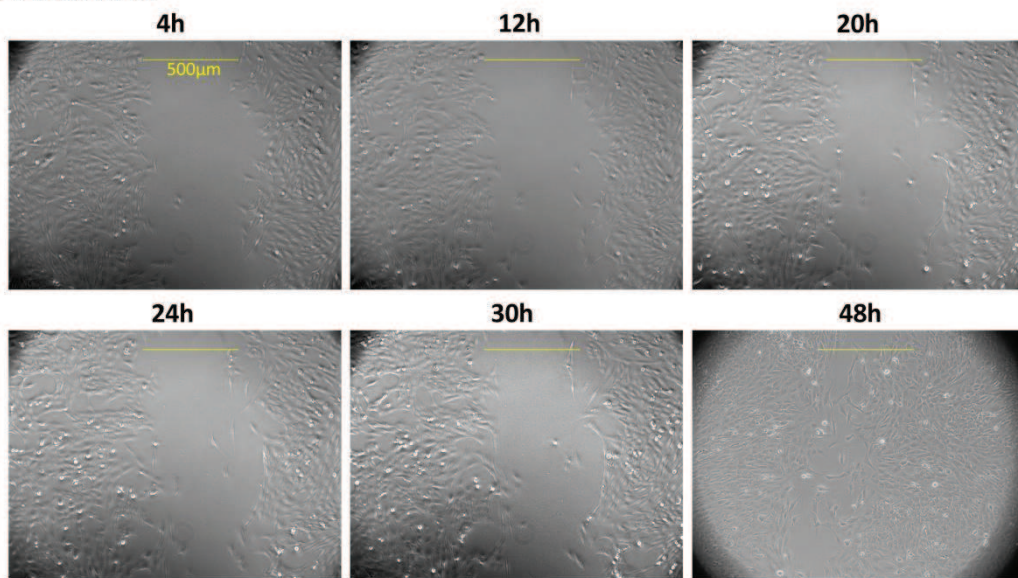
b. Effet du NO[•] sur la migration cellulaire

La migration est une des premières activités des CEs après leur activation pour aboutir à la formation de néo-vaisseaux. Premièrement, nous utiliserons une technique de visualisation du mouvement des CEMs d'une monocouche, après cicatrice. Deuxièmement, la migration cellulaire sera évaluée par le passage des CEMs au travers d'une membrane, en utilisant des inserts.

i. La migration cellulaire évaluée par la technique de cicatrisation

Cette technique consiste à réaliser une cicatrice dans un tapis cellulaire et à voir en temps réel le recouvrement de la cicatrice par les cellules adjacentes. Cette expérience, peu coûteuse et facile à mettre en place, nous a permis de commencer notre étude de la migration cellulaire. Les cinétiques de recouvrement de la cicatrice pour les deux lignées sont présentées sur la figure 40.

A HSkMEC



B HPLNEC.B3

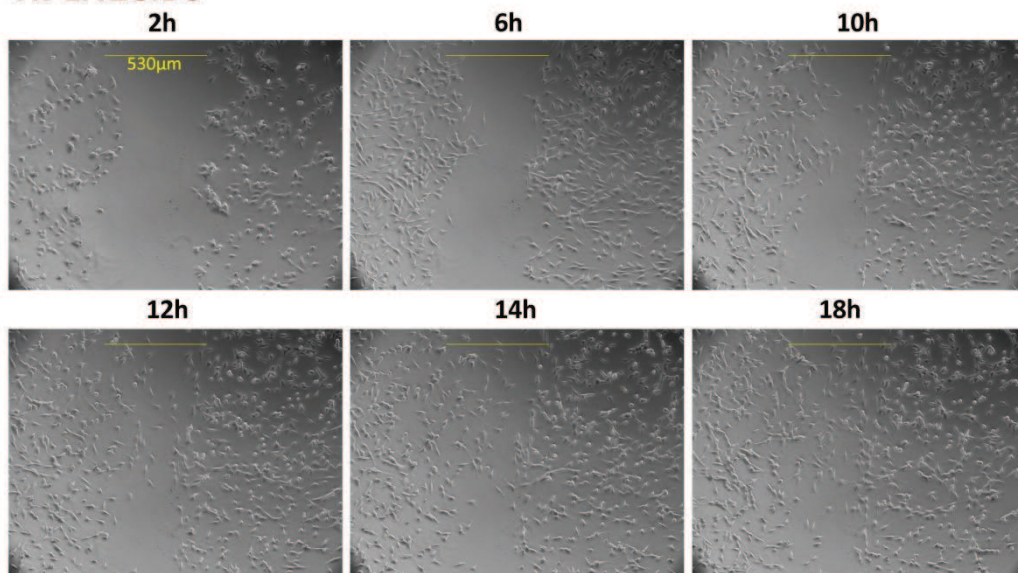


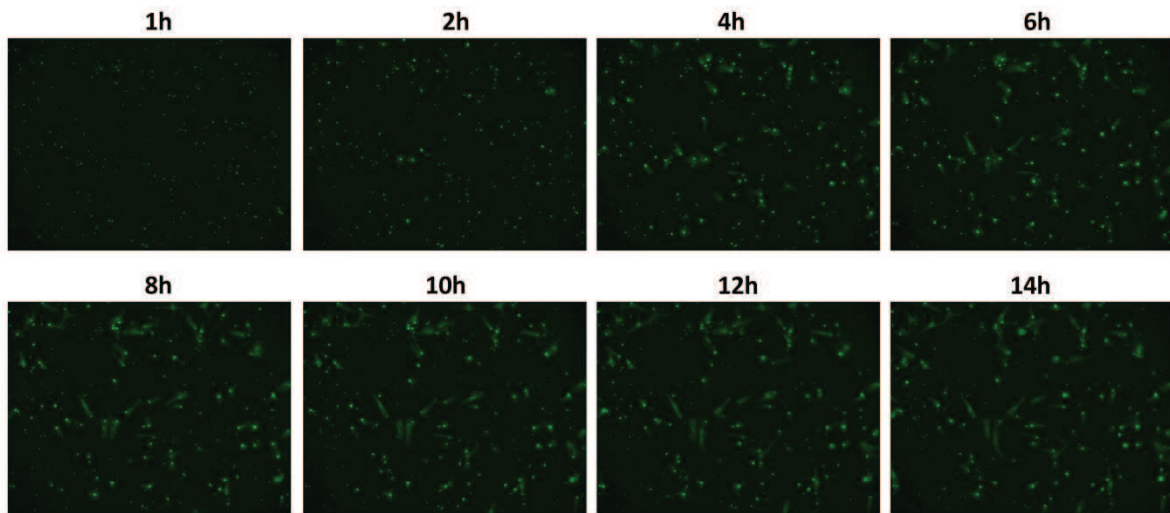
Figure 40 : Exemples de cinétiques de cicatrisation sur les HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B). *Le mouvement des cellules est observé en temps réel sous le microscope inversé à fluorescence Zeiss Axiovert 200M, jusqu'à fermeture de la cicatrice.*

Les cinétiques de cicatrisation sont très différentes pour les deux lignées endothéliales. Les HSkMEC mettent 3 fois plus de temps que les HPLNEC.B3 pour faire disparaître le trait du cône de P200. Lors des expériences en présence de molécules d'intérêt, nous n'avons pas pu observer de différences significatives dans les temps de recouvrement. Cela est notamment dû à la lenteur de migration des CEMs. Dans le cas des HSkMEC, il nous a été difficile de discriminer l'implication de la migration cellulaire et de la prolifération lors de cette expérience. Nous avons alors choisi d'abandonner cette technique pour nous tourner vers une autre méthode d'évaluation de la migration cellulaire : la migration à travers des inserts.

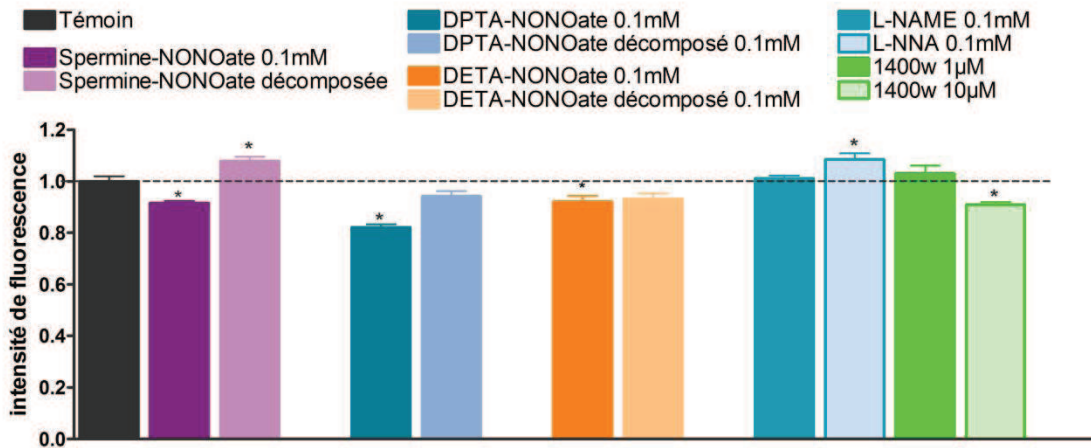
ii. La migration à travers des inserts

Cette seconde technique consiste à déposer des cellules fluorescentes sur la face supérieure de l'insert et visualiser leur migration vers l'autre face. Pour que la migration soit efficace, nous avons placé des cellules cancéreuses de mélanome MIV clone M dans le fond des boîtes afin d'attirer les CEs par les facteurs qu'elles sécrètent. Dans des expérimentations préliminaires, nous avons placé du SVF à 10% dans le compartiment inférieur de l'insert. L'inconvénient principal de l'utilisation d'une substance, comme le SVF, pour attirer les cellules est que, rapidement, sa concentration s'équilibre dans les deux compartiments de l'insert. Dans nos expériences, la migration à travers l'insert était moins rapide et les différences entre les traitements étaient moindres. Ce sont les raisons pour lesquelles nous avons privilégié l'utilisation de cellules cancéreuses pour attirer les cellules. La figure 41A présente les photos montrant la migration cellulaire des HSkMEC à travers un insert au cours du temps.

A CINETIQUE DE MIGRATION A TRAVERS LES INSERTS



B HSkMEC



C HPLNEC.B3

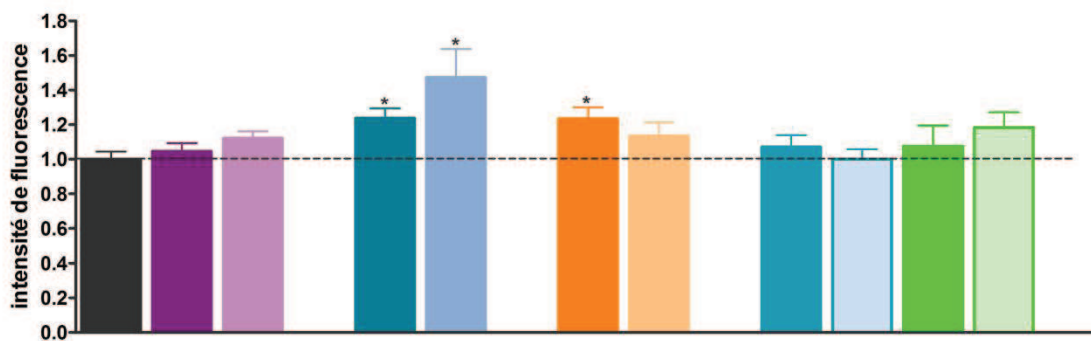


Figure 41 : Evaluation de la migration des HSkMEC et HPLNEC.B3 au travers d'inserts. Après préincubation avec les donneurs de NO[•] ou les inhibiteurs de NOS, la migration des cellules endothéliales à travers la membrane de l'insert est observée en temps réel sous microscope inversé à fluorescence Zeiss Axiovert 200M, en présence des mêmes traitements. Les photos (en A) présentent un exemple de cinétique de migration des HSkMEC non traitées. L'intensité de fluorescence quantifiée par ImageJ est représentée (en intensité de fluorescence relative) pour les HSkMEC (B) et les HPLNEC.B3 (C). Pour chaque condition, 2 à 5 photos sont prises et l'expérience est réalisée en duplicat (moyenne ± SEM ; *p<0.05).

La cinétique de migration (figure 41A) montre que dès 2h quelques cellules commencent à traverser la membrane de l'insert et s'étale sur la face inférieure. Après 6h de migration, la quantité de cellules ayant migré reste constante et nous avons observé que les différences entre les traitements s'atténuent. C'est la raison principale pour laquelle toutes les analyses ont été réalisées après 6h de migration. Comme montré sur la figure 41B, les 3 donneurs de NO[•] diminuent légèrement la migration cellulaire des HSkMEC (au maximum -18% pour le DPTA-NONOate). Par contre, sur les HPLNEC.B3 (figure 41C), ils sont soit inactifs (Spermine NONOate), soit légèrement activateur (+ 23% pour le DETA-NONOate). L'effet du DPTA-NONOate, ici, n'est pas spécifique du NO[•] puisque la molécule décomposée a le même effet.

Les inhibiteurs de NOS n'ont pas d'effet majeur sur la migration au travers des inserts (+8% pour le L-NNA, -9% pour le 1400w à 10 μM sur les HSkMEC seulement).

L'analyse de ces résultats a aussi été réalisée par comptage du nombre de cellules ayant traversé l'insert par champs ainsi que par détermination de l'aire des cellules sur la face inférieure de l'insert, à l'aide du logiciel ImageJ. Cette dernière permet, dans une certaine mesure, d'accentuer les différences, car des cellules plus rapides seront plus étalées que des cellules venant de traverser l'insert. Néanmoins, ces techniques ont montré des résultats comparables avec de faibles différences entre le témoin et les traitements.

iii. Conclusion sur l'effet du NO[•] sur la migration des cellules endothéliales

Dans notre modèle, le NO[•] ne semble pas ou peu affecter la migration des CEMs, contrairement à certains types cellulaires. Encore une fois, la littérature présente des effets pro-²²⁷ ou anti-migratoires²²⁵, qui peuvent être expliqués par les différences de concentrations en NO[•] présent dans l'environnement cellulaire¹⁷⁶.

En conclusion, le faible ralentissement de la migration des cellules en présence de NO[•] exogène ne permet pas d'expliquer clairement la diminution ou l'abolition totale de l'angiogenèse. D'autre part, le NO[•] endogène participe peu à la migration des cellules dans ces modèles. Par conséquent, nous avons tourné notre étude vers la deuxième étape de l'angiogenèse : le contact entre les CEs.

c. Effet du NO[•] sur les interactions cellulaires CE-CE

i. Evaluation de l'adhésion entre les cellules endothéliales

Pour essayer d'expliquer la diminution de la formation des pseudo-vaisseaux en présence des donneurs de NO[•], nous nous sommes tournés vers l'étude des contacts entre les CEMs. Nous avons réalisé des expériences d'adhésion entre cellules homologues en condition statique, mécanisme qui

mime l'interaction entre les CEs qui doivent s'organiser entre-elles pour former la paroi des nouveaux vaisseaux. Nous avons observé l'effet des deux donneurs de NO[•], qui diminuent l'angiogenèse, sur l'adhésion entre les CEMs. Puis les modulations ont été comparées à celles observées en hypoxie (1% O₂). La figure 42 présente les résultats quantitatifs de cette étude.

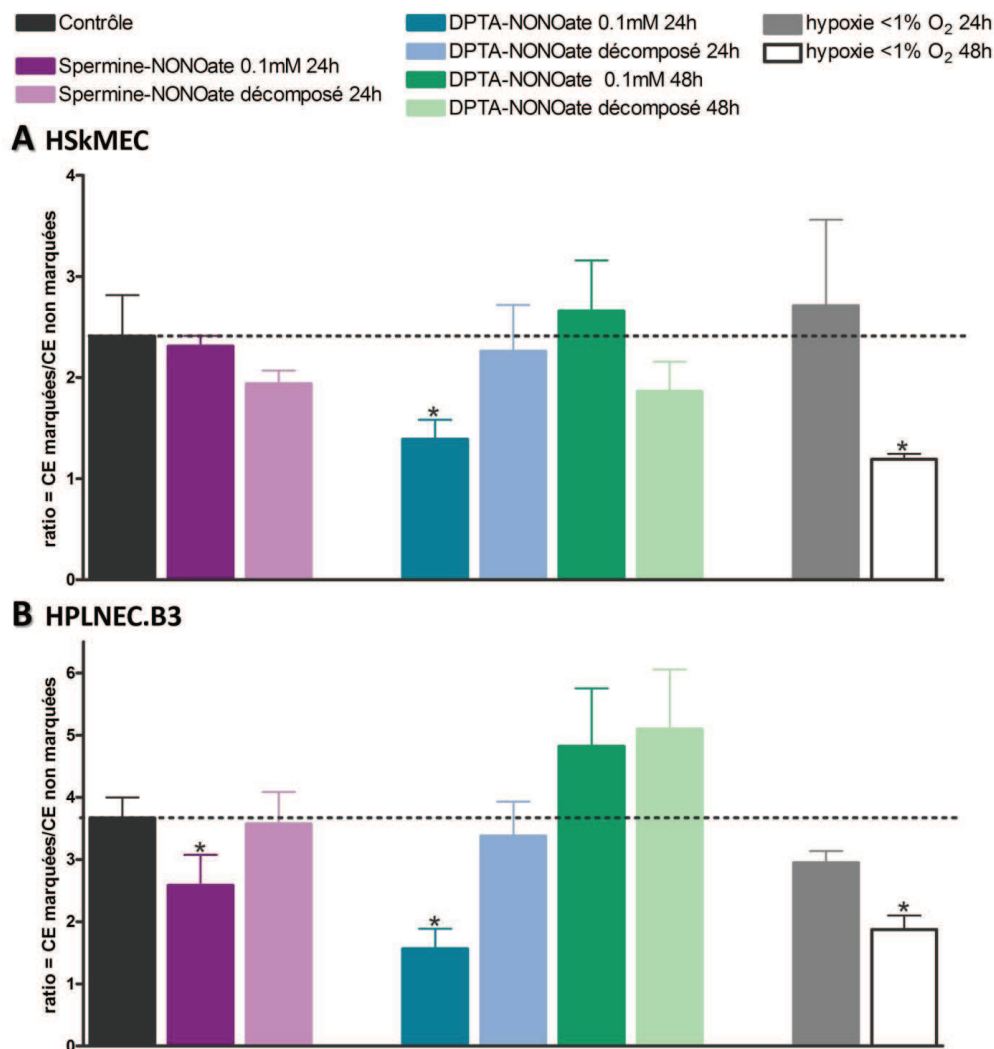


Figure 42 : Rôle du NO[•] et de l'hypoxie (1% O₂) sur les interactions homologues entre les cellules endothéliales de la lignée HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B), en condition statique. Les résultats sont exprimés par le nombre de CEMs marquées qui adhèrent sur une CEM de la monocouche (moyenne de 2 expériences en triplicat ± SEM ; *p<0.05).

Pour les HSkMEC (figure 42A), le DPTA-NONOate diminue l'adhésion de 42% à 24h, ce qui explique la diminution observée de l'angiogenèse. Remarquons que l'effet est bien spécifique du NO[•] puisque la molécule décomposée n'a aucun effet. Par contre, cette inhibition n'est pas observée à 48h, On peut supposer qu'il existe un phénomène de compensation qui se met alors en place sur des temps longs. En comparaison, la Spermine-NONOate qui délivre un flux important de NO[•] ne présente pas d'activité à 24h.

Pour les HPLNEC.B3 (figure 42B), l'adhésion des cellules est diminuée avec les deux donneurs de NO[•] testés (-57% pour le DPTA-NONOate et -30% pour la spermine-NONOate). De la même manière que précédemment, l'inhibition par le DPTA-NONOate ne s'observe qu'à 24h de traitement, révélant probablement un mécanisme de substitution.

En hypoxie, les deux types cellulaires présentent les mêmes types de modifications, avec des diminutions de l'adhésion (-51% HSkMEC et -49% HPLNEC.B3) après 48h de traitement uniquement. Puisque la production de NO[•] est activée en hypoxie⁶, la diminution des interactions CEM-CEM en condition hypoxique peut être mise en parallèle avec les résultats obtenus avec les NONOates.

En conclusion, aussi bien pour les HSkMEC que pour les HPLNEC.B3, les interactions cellulaires homologues sont inhibées par le NO[•]. Pour approfondir le mécanisme de cette inhibition, nous nous sommes intéressés à l'expression des molécules de surface des CEs impliquées dans l'adhésion cellulaire.

ii. Expression des molécules de surface

Pour comprendre ces interactions au niveau moléculaire, nous avons choisi d'étudier plusieurs molécules d'adhésion, fortement impliquées dans l'angiogenèse (PECAM-1/CD31, ICAM-1/CD54 et VE-cadhérine/CD144) et dans les interactions CEM-CEM. Nous avons étudié leur expression en présence de NO[•] exogène, apporté par la spermine-NONOate, le DPTA-NONOate ou le DETA-NONOate, pour mimer des flux de NO[•] décroissants. Puis les modulations induites par le NO[•] ont été comparées à celles observées en hypoxie.

En présence d'un donneur de NO[•]

L'effet des 3 donneurs de NO[•] sur l'expression de ces molécules d'adhésion est présenté sur la figure 43.

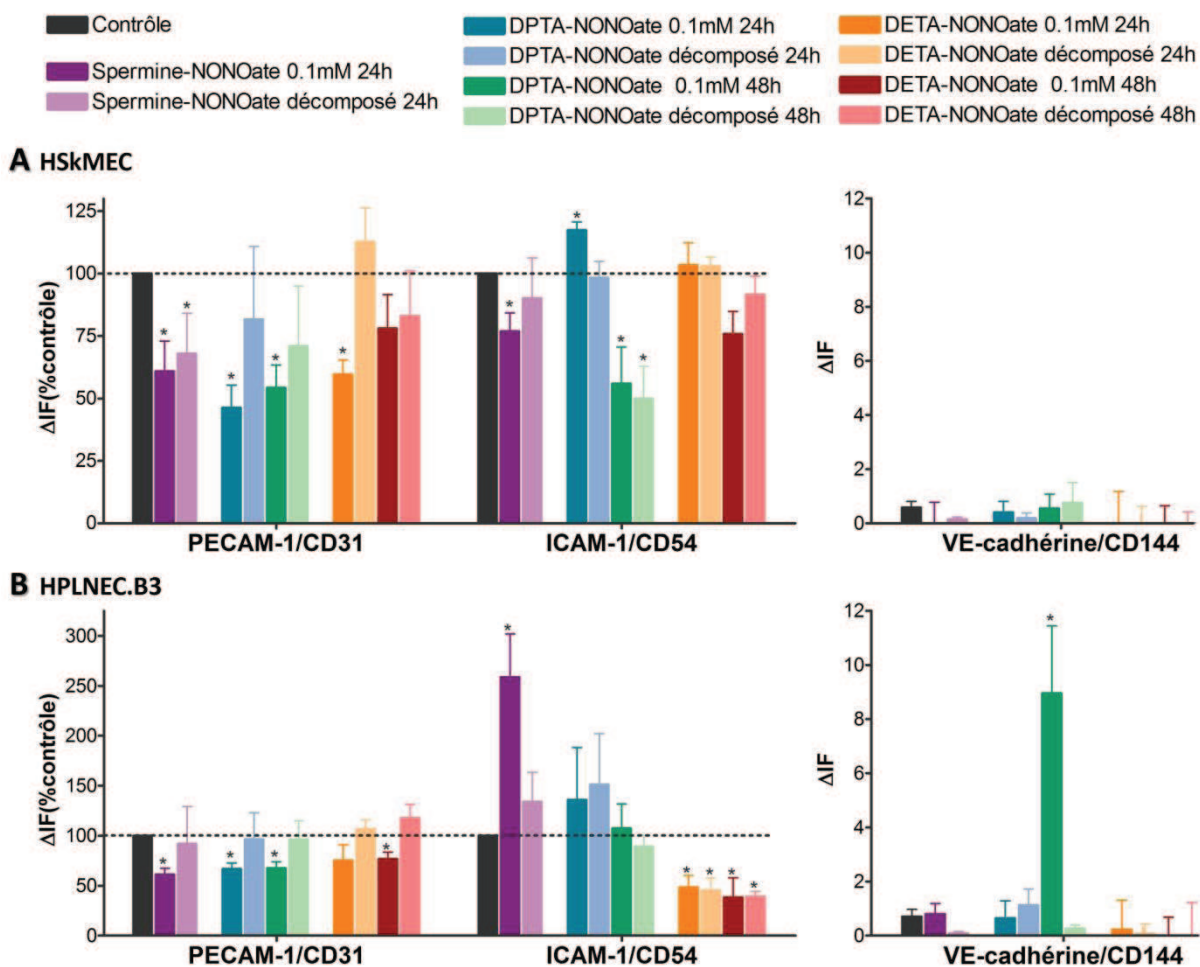


Figure 43 : Expression de PECAM1-1/CD31, ICAM-1/CD54 et VE-cadherine/CD144 sur les lignées HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B) après traitement par des donneurs de NO[•]. Les modifications de l'expression des molécules d'adhésion sont exprimées en pourcentage d'intensité de fluorescence en fonction de celle du témoin, hormis pour VE-cadherine/CD144, pour lequel l'intensité relative de fluorescence est directement utilisée car trop faible dans le témoin (moyenne de 3 à 6 expériences ± SEM ; * p<0.05).

La modification majeure pour les deux lignées cellulaires est la constante et importante diminution de l'expression de PECAM-1/CD31 quel que soit le donneur de NO[•] (de -23% à -54%). Cette modification est donc importante et très sensible au NO[•], puisque tous les flux imposés de NO[•] l'induisent. Toutes ces inhibitions sont bien dépendantes du NO[•], puisque les molécules décomposées ne présentent pas de variations sauf en utilisant la spermine-NONOate sur les HSkMEC. A elle seule, la diminution d'expression de PECAM-1/CD31 pourrait expliquer une modulation de l'angiogenèse et les modifications des interactions homologues. En effet, de part cette modification, les CEMs sont moins liées les unes aux autres. Ce lien étant primordial lors de l'angiogenèse, elles sont moins capables de former des pseudo-vaisseaux.

Concernant ICAM-1/CD54, la modification principale est l'augmentation de +159% de son expression en présence de Spermine-NONOate, uniquement sur les HPLNEC.B3. Cette surexpression se retrouve

à moindre échelle sur les HSkMEC après 24h de DPTA-NONOate (+17%). A l'inverse, nous avons aussi observé une diminution de l'expression de ICAM-1/CD54 sur les HSkMEC en présence de spermine-NONOate (- 23%). Les autres modifications d'expression observées ne sont pas attribuables au NO[•] car elles se retrouvent avec les donneurs décomposés et sont certainement dues aux autres produits de dégradation des NONOates (nitrites, nitrates et/ou squelette résiduel).

Une troisième observation particulièrement intéressante est la forte induction de la VE-cadhérine/CD144, uniquement sur les HPLNEC.B3 après 48h de DPTA-NONOate.

En hypoxie

Toujours dans l'optique de décrypter les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse, nous avons réalisé une étude similaire en hypoxie (1% O₂). Le microenvironnement hypoxique induit une cascade de réactions aboutissant, entre autres, à la libération de NO[•] par les NOS. Pour savoir si l'effet observé est dépendant du NO[•] produit par les NOS, les CEMs ont été traitées, en plus de l'hypoxie, par un inhibiteur de la production de NO[•] : le L-NAME, inhibiteur non sélectif des NOS, ou le 1400w, plus spécifique de la NOS2. Les résultats sont présentés sur la figure 44, exprimés en pourcentage d'expression en fonction de celle du témoin.

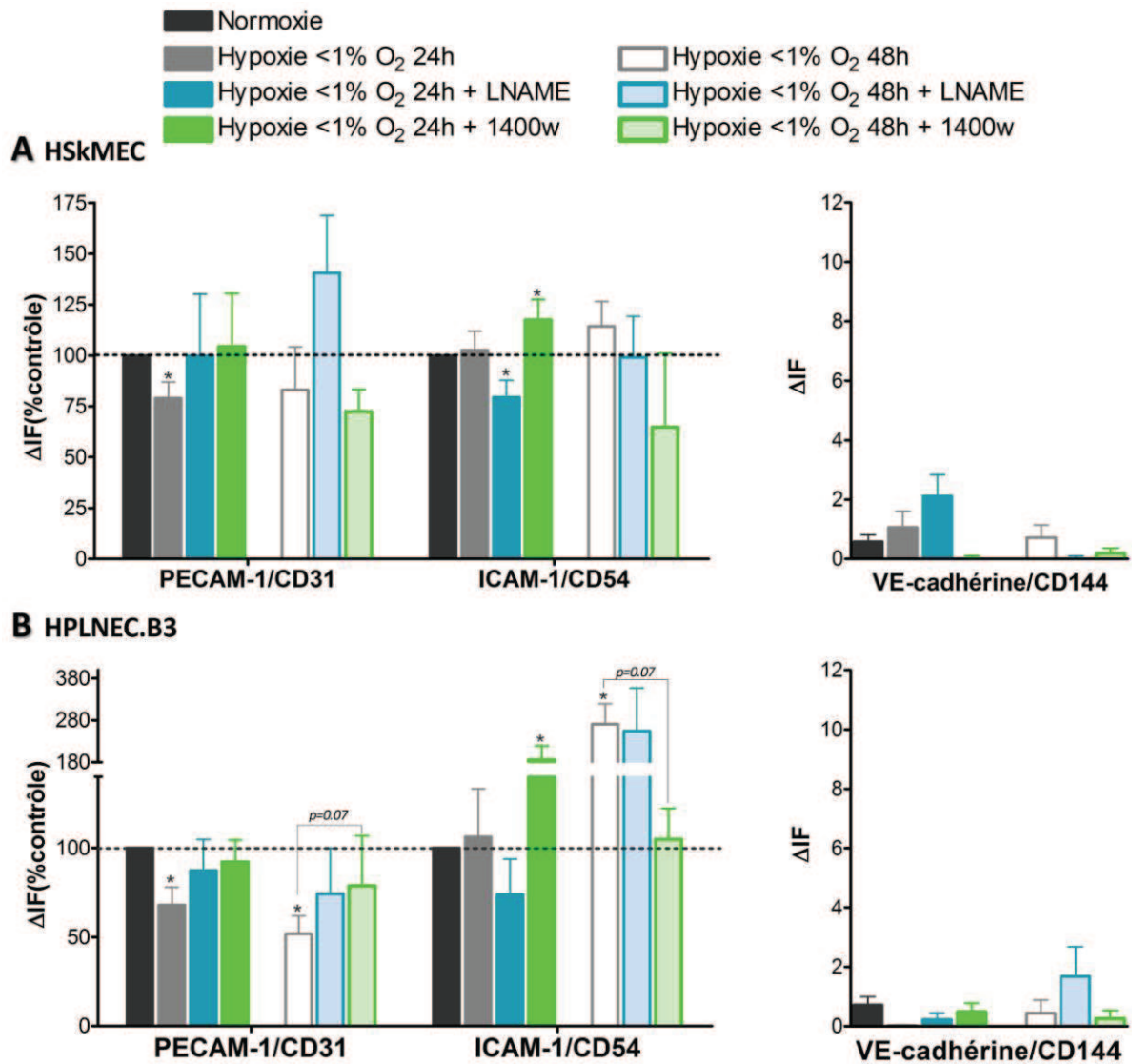


Figure 44 : Effet de l'hypoxie sur l'expression des molécules d'adhésion sur les lignées HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B). Les CEMs sont maintenues en hypoxie en présence ou non des inhibiteurs de NOS (L-NAME 0.1 mM ; 1400w 1 μM) pendant 24h ou 48h. Les modifications de l'expression des molécules d'adhésion sont exprimées en pourcentage d'intensité de fluorescence en fonction de celle du témoin, hormis pour VE-cadherine/CD144, pour lequel l'intensité relative de fluorescence est utilisée (moyenne de 3 à 6 expériences ± SEM ; * p<0.05).

Tout d'abord, l'expression de PECAM-1/CD31 est diminuée sur les deux types cellulaires dès 24h d'hypoxie (de -21% à -48%), mais non significativement à 48h pour les HSkMEC (figure 44A). Cette modification est inversée par les traitements avec des inhibiteurs de NOS, aussi bien L-NAME que 1400w (les différences ne sont pas encore statistiquement significatives). L'hypoxie induirait donc l'expression de la NOS2, qui produit de fortes concentrations de NO[•], ce qui a pour conséquence de diminuer l'expression de PECAM-1/CD31. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec les précédents sur les donneurs de NO[•].

Ensuite, une observation intéressante est l'augmentation de l'expression de ICAM-1/CD54 après 48h d'hypoxie (+170%), uniquement sur les HPLNEC.B3 (figure 44B). De même, l'apport de NO[•] exogène par la spermine-NONOate induit cet effet (+159% sur les HPLNEC.B3 ; figure 43B), ce qui suggère que le NO[•] soit capable de fortement augmenter l'expression de ICAM-1/CD54. Toutefois, l'implication du NO[•] en hypoxie est assez difficile à cerner, puisque le L-NAME ne contrecarre pas l'augmentation de ICAM-1/CD54, alors que le 1400w le fait (les différences ne sont pas encore statistiquement significatives). Pour ce cas, les investigations demandent à être poursuivies en condition hypoxique pour confirmer que le NO[•], certainement par l'intermédiaire de la NOS2, est impliqué.

Enfin, la VE-cadhérine/CD144 ne présente quasiment aucune modification de son expression quels que soient les traitements ou la lignée cellulaire.

En conclusion, l'hypoxie est responsable de certaines modulations d'expression de ces molécules d'adhésion. Ces résultats confirment, en partie, ceux obtenus avec les donneurs de NO[•], car certaines modifications sont similaires, suggérant l'implication de la production endogène de NO[•] en hypoxie sur l'expression de ces molécules d'adhésion.

iii. Conclusion sur le rôle du NO[•] dans les interactions cellulaires lors de l'angiogénèse

Lors de l'étude des interactions cellulaires, nous avons mis en place une étude originale d'adhésion homologue entre CEs. Nous avons montré que le NO[•] diminue les contacts entre les CEMs des deux types.

Les modulations des interactions entre les HPLNEC.B3 peuvent être expliquées par l'inhibition de l'expression de PECAM-1/CD31 dans les mêmes conditions. En hypoxie, les variations du taux de PECAM-1/CD31 seraient imputées à la production de NO[•] par la NOS2. Selon les traitements, d'autres modulations des molécules d'adhésion sont observées. Après 48h de DPTA-NONOate, la VE-cadhérine/CD144 est induite ; cela est à mettre en parallèle avec la restauration des interactions que nous avons observée précédemment dans ces mêmes conditions. En présence de Spermine-NONOate et en hypoxie, une forte augmentation de l'expression de ICAM-1/CD54 est observée ; dans ces conditions, l'adhésion entre les CEs est diminuée. Les HPLNEC.B3 ont vraisemblablement mis en place un phénomène de compensation de la diminution d'expression de PECAM-1/CD31 par l'augmentation du taux de VE-cadhérine/CD144. En revanche, l'augmentation de ICAM-1/CD54 à la surface cellulaire ne permet pas de contrebalancer la diminution de PECAM-1/CD31.

Pour les HSkMEC, nous pouvons déduire des résultats des expériences que l'adhésion homologue est certainement gouvernée par d'autres molécules d'adhésion, en plus de celles testées. En effet, certaines diminutions d'expression de PECAM-1/CD31 sont suivies par une inhibition de l'adhésion,

mais pas toutes. De plus, l'adhésion entre les CE n'est pas en corrélation avec les expressions de ICAM-1/CD54 et/ou de VE-cadhérine/CD144.

Ensemble, ces données montrent que l'inhibition des interactions cellulaires des deux types cellulaires par le NO[•] est induite par des mécanismes moléculaires différents. Les modulations d'expression des molécules de surface en réponse au NO[•] sont donc dépendantes du tissu d'origine des CE.

d. Discussion générale sur le rôle du NO[•] dans l'angiogenèse

i. Bilan

Ce travail peut être résumé dans les tableaux 6 et 7 suivants, dans lesquels seuls les effets des NONOates attribuables au NO[•] et ceux de l'hypoxie sont présentés.

Tableau 6 : Récapitulatif des effets des NONOates attribuables au NO[•] et à l'hypoxie sur l'angiogenèse des HSkMEC, exprimés en pourcentage du témoin. ND = non déterminé. En hypoxie, les différences soulignées sont statistiquement différentes des inhibiteurs de NOS indiqués.

	<u>Sp-NONOate</u>	<u>DPTA-NONOate</u>		<u>DETA-NONOate</u>		<u>Hypoxie</u>	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
Angiogenèse	↘	↘				↗ LNAME et 1400w	
Migration	↘-9%	↘-18%				ND	ND
Adhésion		↘-42%		ND			↘-51%
PECAM-1/CD31		↘-54%	↘-46%	↘-40%		↘-21%	
ICAM-1/CD54	↘-23%	↗+17%					
VE-cadhérine/CD144							

Tableau 7 : Récapitulatif des effets des NONOates attribuables au NO[•] et à l'hypoxie sur l'angiogenèse des HPLNEC.B3, exprimés en pourcentage du témoin. ND = non déterminé. En hypoxie, les différences soulignées sont statistiquement différentes des inhibiteurs de NOS indiqués.

	<u>Sp-NONOate</u>	<u>DPTA-NONOate</u>		<u>DETA-NONOate</u>		<u>Hypoxie</u>	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
Angiogenèse	↘	↘				↗ LNAME et 1400w	
Migration				↗+23%		ND	ND
Adhésion	↘-30%	↘-57%		ND	ND		↘-49%
PECAM-1/CD31	↘-39%	↘-33%	↘-33%		↘-23%	↘-32%	↘-48%
ICAM-1/CD54	↗+159%						↗+170%
VE-cadhérine/CD144			↗				

Ces deux tableaux synthétisent les résultats de notre étude sur le rôle du NO[•] dans l'angiogenèse et permettent de corréler les différents éléments, ainsi que de comparer la réponse des deux lignées cellulaires. Dans les deux cas, l'angiogenèse est fortement inhibée par le NO[•], ce qui est concomitant avec une diminution de l'adhésion entre les CEMs et l'altération de l'expression de PECAM-1/CD31. En prenant comme exemple la lignée HPLNEC.B3, nous pouvons ajouter que l'augmentation de l'expression de VE-cadhérine/CD144 comme mécanisme de compensation pour la diminution de PECAM-1/CD31 est suffisante pour réverser l'effet sur l'adhésion, mais pas sur l'angiogenèse. L'induction de la VE-cadhérine/CD144 n'étant observée qu'après 48h de traitement, elle est peut-être trop tardive pour rétablir une angiogenèse, dans nos conditions expérimentales.

Par ce récapitulatif, nous montrons aussi que les deux lignées réagissent différemment en présence de NO[•] ou en hypoxie. Cela est observé au niveau cellulaire (lors de l'adhésion) ou moléculaire (pour ICAM-1/CD54 et VE-cadhérine/CD144).

ii. Discussion sur l'effet du NO[•] sur l'angiogenèse

Dans notre étude, nous avons montré que le NO[•], produit par la NOS2, est indispensable à une angiogenèse complète, mais que de fortes concentrations de NO[•] exogène l'inhibent. La dualité du NO[•] selon sa concentration a été également bien montrée par Jones *et al.*¹⁷⁶. Dans un modèle de CEMs gastriques de rat, l'angiogenèse est augmentée par le SNAP, donneur de NO[•] ayant une ½ vie de 6h à 37°C, à des concentrations de 0.1 à 0.3 mM. Par contre, 0.5 à 4 mM de SNAP diminue la formation des pseudo-vaisseaux très fortement (jusqu'à 80% d'inhibition). Par des mesures simultanées de la concentration en NO[•], cette équipe conclut que le seuil supérieur de stimulation de l'angiogenèse se situe à 26 µM et que le seuil inférieur d'inhibition est de 36 µM de NO[•] dans le

microenvironnement. Par la suite, ils ont montré que les modulations observées sont imputées à la migration cellulaire, par l'intermédiaire de la voie PKC-ERK-cJun. Dans notre modèle, la migration n'est que peu modifiée par le NO^{*}, contrairement à d'autres dans lesquels la NOS3 est nécessaire à la migration²²⁸. Ceci peut être relié à la faible expression de la NOS3 (par rapport aux HUVEC primaires) que nous avons observée dans nos 2 lignées.

En revanche nous avons montré que les interactions cellulaires, indispensables à la reconnaissance cellulaire, sont diminuées par le NO^{*}. Ces interactions sont dépendantes de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion : PECAM-1/CD31, VE-cadhérine/CD144 et ICAM-1/CD54. Plus précisément, nous allons reprendre la fonction de ces molécules d'adhésion et leurs modulations induites par le NO^{*}.

PECAM-1/CD31 est fortement exprimé à la surface des CE, car son action principale est de permettre l'adhésion entre les cellules par des interactions homophiliques. Yang *et al.*⁷³ ont été les premiers à montrer que cette molécule est indispensable à l'angiogenèse *in vitro* : l'utilisation d'anticorps neutralisant la fonction de PECAM-1/CD31 bloque l'élongation cellulaire et la migration des CEs, dans un gel de collagène. Plus tard, Cao *et al.*²²⁹ ont fait les mêmes conclusions avec un modèle différent. La capacité à former des pseudo-vaisseaux sur MatrigelTM a été restaurée uniquement en transfectant un plasmide codant la forme humaine de PECAM-1/CD31, sur des cellules de mésothéliomes REN. L'angiogenèse des cellules transfectées est alors comparable à celle des CEs et est inhibée en présence d'un anticorps neutralisant. De plus, PECAM-1/CD31 peut activer l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, indispensable à l'angiogenèse²³⁰. Certains auteurs ont mis en parallèle l'expression de PECAM-1/CD31 avec la production de NO^{*}. La fluvastatine est capable de diminuer la quantité de PECAM-1/CD31 à la surface des CEs d'artère iliaque humaine, et ceci a été corrélé avec la phosphorylation activatrice de la sérine 1177 de la NOS3 et l'augmentation de NO^{*} dans le milieu de culture²³¹. Réciproquement, PECAM-1/CD31 diminue l'activité de la NOS3, impliquée dans l'angiogenèse²³². Notre étude apporte un élément nouveau : le NO^{*} est directement responsable de la diminution de PECAM-1/CD31. Ensembles, ces données démontrent que l'inhibition de l'angiogenèse par le NO^{*} est gouvernée par la diminution de l'expression de PECAM-1/CD31. Les CEMs, en perdant des contacts cellulaires, ne sont donc plus capables de former des pseudo-vaisseaux.

Une observation très intéressante est l'induction de VE-cadhérine/CD144 de façon organo- et concentration-spécifique. L'importance de VE-cadhérine/CD144 a été montrée en modélisant l'angiogenèse en 3 dimensions dans un gel de collagène. La neutralisation de cette molécule d'adhésion induit une inhibition de la vacuolisation, mais pas de l'élongation des cellules⁷³. Jusqu'alors la NOS2 et la VE-cadhérine/CD144 ont été trouvées colocalisées dans des granulomes périapicaux humains²³³, mais aucune régulation directe de VE-cadhérine/CD144 par le NO^{*} n'avait

jamais été démontrée dans des cellules humaines. Cependant, Chang *et al.* ont observé une modulation similaire chez la souris dans un autre type cellulaire, des trophoblastes de placenta²³⁴.

La molécule ICAM-1/CD54 est impliquée dans la migration des CEs lors de l'angiogenèse, comme cela a été démontré sur des CEs macrovasculaires par Kevil *et al.*²³⁵. ICAM-1/CD54 est indispensable à la bonne organisation du cytosquelette des CEs aortiques de souris. Les cellules déficientes en cette molécule d'adhésion migrent moins loin et plus lentement que les cellules natives. Là aussi, il existe un lien étroit entre NO[•] et ICAM-1/CD54, puisque le DETA-NONOate (0.1 μM pendant 6h) est capable de restaurer le phénotype migratoire. Dans notre étude, nous montrons que le NO[•], par l'intermédiaire des NONOates ou de la NOS2 en hypoxie, est capable de moduler l'expression basale de ICAM-1/CD54 et de façon assez importante pour les HPLNEC.B3. Cette observation est concordante avec celle de Radisavljevic *et al.*²³⁶, qui montrent une surexpression de ICAM-1/CD54 après traitement par le VEGF, sachant qu'il active la production de NO[•]. De plus, Antonova *et al.*, ont récemment observé l'augmentation de 30% de l'expression de ICAM-1/CD54 en hypoxie²³⁷. Notre étude met en parallèle ces données, et démontre la régulation de cette molécule d'adhésion par le NO[•] produit en hypoxie, sur les HPLNEC.B3. Des résultats opposés, montrant une diminution de l'expression de ICAM-1/CD54 en présence de NO[•], ont aussi été rapportés, mais dans des modèles macrovasculaires et/ou après activation des cellules par des molécules pro-inflammatoires^{179,181}. Bien que cette molécule soit importante pour la migration cellulaire, dans notre modèle, l'augmentation de ICAM-1/CD54 par le NO[•] ne semble pas avoir de conséquences sur la migration dans les conditions étudiées.

Tout au long de cette étude, nous montrons que la concentration en NO[•] dans l'environnement cellulaire est très importante à prendre en compte, car les modifications cellulaires et moléculaires en sont dépendantes. Un apport faible de NO[•] par le DETA-NONOate n'a pas d'effet sur l'angiogenèse, alors que l'expression de PECAM-1/CD31 est déjà inhibée. Dès que des concentrations plus fortes sont présentes, par le DETA-NONOate ou la spermine-NONOate, l'expression de PECAM-1/CD31 est fortement inhibée, ce qui diminue les interactions entre les CEs et, en conséquence, l'angiogenèse. De plus, ICAM-1/CD54 est surexprimé pour de fortes concentrations de NO[•] (par la spermine-NONOate et la NOS2 en hypoxie) et VE-cadhérine/CD144 est induit pour des concentrations intermédiaires, uniquement sur les HPLNEC.B3.

L'hypoxie, utilisée ici, car représentative du microenvironnement tumoral, induit certaines modifications similaires à celles observées en présence de NO[•] exogène: l'expression de PECAM-1/CD31 est diminuée, dans le même temps que l'adhésion entre les CEs, dans les deux types cellulaires. Cependant, l'angiogenèse est accélérée en hypoxie, alors qu'elle est inhibée en présence de fortes concentrations de NO[•]. Cette contradiction s'explique vraisemblablement par une cinétique

différente : l'hypoxie active rapidement l'angiogenèse, puisqu'en 8h le réseau de pseudo-vaisseaux est en place, alors qu'il faut 24 à 48h pour observer la diminution de PECAM-1/CD31. En effet, l'hypoxie est un des principaux activateurs de l'angiogenèse⁴⁶. En manque en oxygène, HIF1 α est rapidement stabilisé et en se complexant à HIF1 β induit la transcription de plusieurs gènes, dont certains facteurs de croissance. Cette production accrue de facteurs de croissance, en plus de leur présence dans le MatrigelTM, active fortement et rapidement les CE à l'angiogenèse. La diminution de l'expression de PECAM-1/CD31 est plus tardive : alors que le réseau est déjà en place. Les contacts cellulaires peuvent être perdus et l'angiogenèse se désagrège, ce que l'on observe lorsque l'angiogenèse est poursuivie au-delà de 24h en hypoxie.

Enfin, nous avons mis en avant, par cette étude, que nos lignées endothéliales présentent des similarités, mais aussi une certaine diversité. Par exemple, l'angiogenèse sur MatrigelTM est plus organisée avec les HSkMEC que les HPLNEC.B3. L'adhésion entre les CE et l'expression de PECAM-1/CD31 est inhibée par le NO[•], mais de façon dépendante de la concentration en NO[•] selon les deux types cellulaires. Les HPLNEC.B3 sont aussi plus sensibles au NO[•], avec de fortes modifications de l'expression de ICAM-1/CD54 et VE-cadhérine, alors qu'elles ne sont pas ou peu présentes sur les HSkMEC. La réponse au NO[•] et à l'hypoxie est donc différente selon le type cellulaire, montrant une organo-spécificité des CE.

Lors de cette première partie, nous avons montré que le NO[•] est nécessaire à l'angiogenèse, mais que des concentrations fortes l'inhibent. L'hypoxie est un fort activateur de l'angiogenèse et implique la voie du NO[•], certainement par l'intermédiaire de la NOS2. Enfin, le NO[•] et l'hypoxie inhibe fortement l'adhésion entre les CEMs, en diminuant l'expression de PECAM-1/CD31, molécule majeure de la formation de pseudo-vaisseaux, dans notre modèle. Tout cela peut expliquer les défauts de perméabilité des vaisseaux, observés dans les tumeurs riches en NO[•] et/ou en hypoxie²³⁸.

Enfin, les modifications d'expression sont spécifiques du type cellulaire étudié et de la concentration en NO[•]. Nous venons donc de mettre en avant un nouveau niveau d'organo-spécificité des CE selon leur réponse au NO[•].

4. NO[•] & RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE

Le système immunitaire réagit contre toute cellule anormale, pathogène ou particule étrangère. Reconnue comme du non-soi, la tumeur met en place plusieurs mécanismes pour détourner la réponse immunitaire. Par exemple, les antigènes tumoraux ne sont pas assez spécifiques pour les discriminer des antigènes natifs. La tumeur peut aussi induire une dysfonction, en modifiant l'activité des cellules immunitaires. Pour accéder à la tumeur, les leucocytes doivent être attirés sur une zone spécifique de l'endothélium, rouler puis traverser l'endothélium par diapédèse.

a. Effet du NO[•] sur la reconnaissance leucocytes-endothélium

Le NO[•] est fortement impliqué dans les phénomènes inflammatoires. Il est largement admis que le NO[•], produit par la NOS2 des macrophages, a une activité cytotoxique sur les bactéries et les cellules tumorales²³⁹. En outre, certaines études commencent à montrer une action du NO[•] sur l'adhésion des leucocytes^{180,240}. Dans cette seconde partie, nous avons donc entrepris d'étudier le rôle du NO[•] dans les mécanismes du recrutement des cellules lymphoïdes sur notre modèle d'endothélium.

i. Interactions entre leucocytes et cellules endothéliales

Nous avons commencé par étudier l'effet du NO[•] sur les interactions hétérologues leucocytes-CEs, dans des conditions statiques puis nous nous sommes intéressés à leurs interactions dans des conditions plus proches de la physiologie, c'est-à-dire en condition de flux, mimant ainsi la circulation sanguine dans les vaisseaux.

En condition statique

Nous avons étudié l'adhésion en condition statique de cellules lymphoïdes CEMT4 sur les lignées endothéliales traitées par les donneurs de NO[•]. Puis nous avons comparé les modulations observées en présence de NO[•] exogène à celles en l'hypoxie (figure 45).

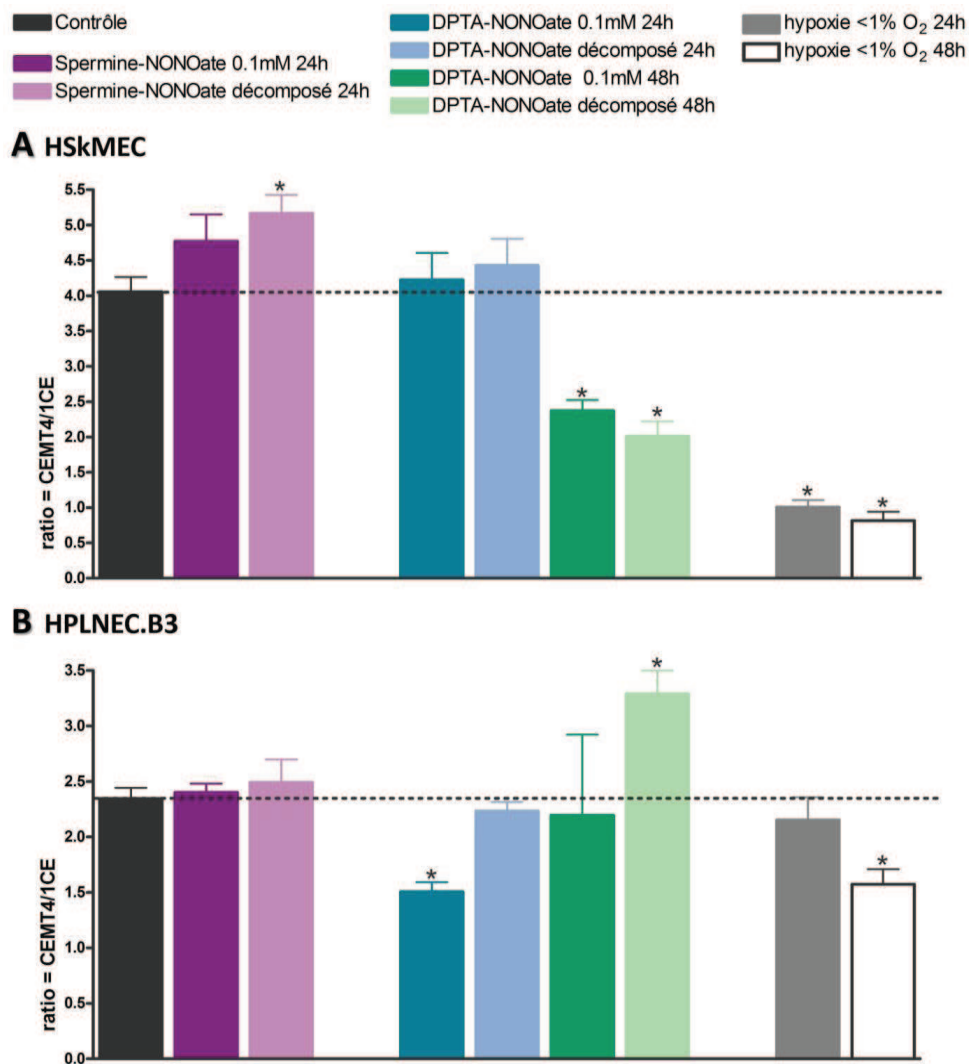


Figure 45 : Rôle du NO[•] et de l'hypoxie (1% O₂) sur les interactions hétérologues entre HSkMEC ou HPLNEC et les cellules lymphoïdes CEMT4, en condition statique. Les résultats sont exprimés par le nombre de CEMT4 marquées adhérant sur une CEM de la monocouche (moyenne de 2 expériences en triplicat ± SEM ; *p<0.05).

Pour la lignée de HSkMEC (figure 45A), la seule modification significative est la très forte diminution des interactions CEMT4-HSkMEC en hypoxie (de -75 à -80%), l'effet observé pour le DPTA-NONOate n'étant pas attribuable au NO[•] car présent avec la molécule décomposée.

En revanche, les interactions entre les CEMT4 et HPLNEC.B3 sont diminuées après un traitement de 24h par le DPTA-NONOate (-36%). Une inhibition comparable est aussi observée après un traitement de 48h en hypoxie (-33%). L'effet inhibiteur du DPTA-NONOate à 48h est vraisemblablement masqué par l'effet activateur du DPTA-NONOate décomposé.

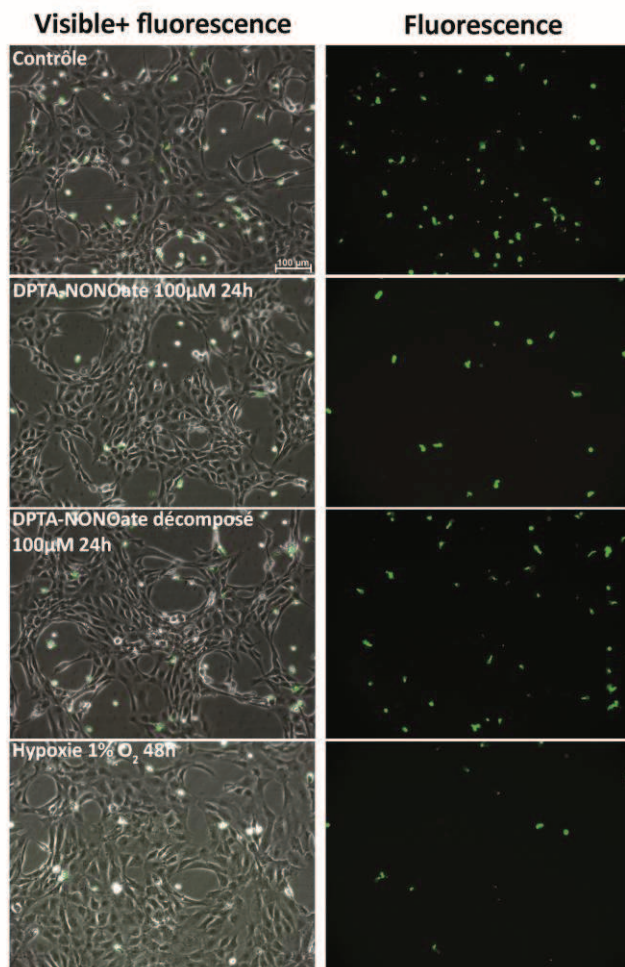
Il est intéressant de noter que, entre les 2 lignées, les ratios d'adhésion ne sont pas les mêmes (ratio de 4.05 pour les HSkMEC et de 2.35 pour les HPLNEC.B3), montrant une capacité différente à fixer les cellules lymphoïdes. Même si ces lignées présentent des caractéristiques proches, nous montrons

encore une fois qu'elles sont singulières selon leurs origines tissulaires. De plus, ces deux lignées se distinguent par leur propriété à fixer les CEMT4 dans différentes conditions : une sensibilité accrue à l'hypoxie pour les HSkMEC, et un effet préférentiel du DPTA-NONOate pour les HPLNEC.B3.

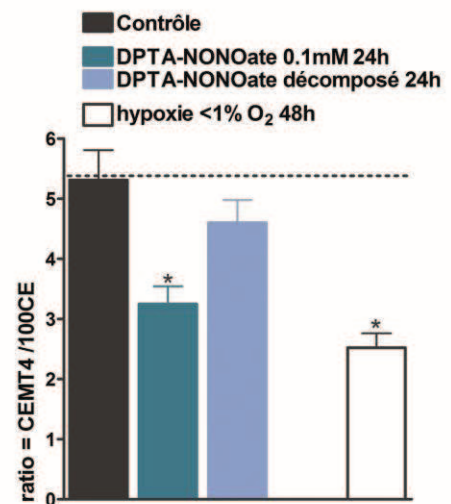
En condition dynamique

Afin de mimer le roulement des leucocytes sur un endothélium, étape primordiale du recrutement leucocytaire, nous avons mis en place une technique d'adhésion en condition dynamique. Cette technique étant assez délicate à mettre en œuvre, nous avons décidé de réaliser cette étude uniquement dans les conditions produisant les modifications les plus importantes en condition statique, c'est-à-dire après un traitement de 24h par le DPTA-NONOate ou en hypoxie pendant 48h. La figure 46 montre un exemple de photos obtenues lors de l'expérience d'adhésion en flux, sur les HSkMEC (A). Les résultats quantifiés en ratio de cellules lymphoïdes adhérentes sur les CE sont présentés pour les HSkMEC (figure 46B) et pour les HPLNEC.B3 (figure 46C).

A HSkMEC



B HSkMEC



C HPLNEC.B3

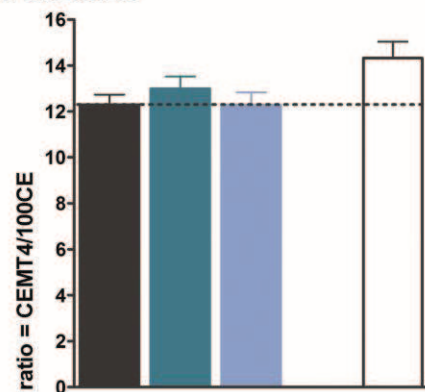


Figure 46 : Rôle du NO[•] et de l'hypoxie sur les interactions hétérologues entre les cellules endothéliales de la lignée HSkMEC (A et B) ou HPLNEC.B3 (C) et les cellules lymphoïdes CEMT4, en condition dynamique pour mimer le flux sanguin. Les CEMT4 adhérentes sont visualisées sur le microscope inversé à fluorescence Zeiss Axiovert 200M et au minimum 10 photos par lame sont prises sur toute la zone de flux (A). Les résultats sont quantifiés (B et C) par le ratio du nombre de CEMT4 marquées adhérent sur 100 CEMs de la monocouche (moyenne de 2 expériences en duplicat ± SEM ; *p<0.05).

L'adhésion entre les HSkMEC et les CEMT4 (figure 46B) est diminuée en présence de DPTA-NONOate (-39%) et en hypoxie (-53%). En revanche, sur les HPLNEC.B3, ni le donneur de NO[•], ni l'hypoxie ne modifie l'adhésion des CEMT4. Il faut noter que les ratios d'adhésion sont ici aussi différents entre les deux lignées endothéliales (ratio de 5 pour les HSkMEC et de 12 pour les HPLNEC.B3) mais inversés par rapport à ceux obtenus en condition statique. Ces observations montrent que les HPLNEC.B3 sont plus adaptées à recruter les leucocytes que les HSkMEC mais que ce recrutement est insensible au NO[•] environnant et à l'hypoxie. Inversement, le recrutement des leucocytes par les HSkMEC est plus faible mais sensible à la modulation car inhibé par le NO[•] et très fortement par l'hypoxie.

Conclusion sur l'effet du NO[•] sur l'adhésion des CEMT4 sur les cellules endothéliales

Dans notre modèle, le NO[•] et l'hypoxie sont capables d'inhiber le recrutement des cellules lymphoïdes par les CEs, en condition statique et/ou en condition de flux. Les lignées testées présentent de fortes différences de réponse au NO[•] et à l'hypoxie, selon leur origine tissulaire et la dynamique de l'expérience.

ii. Les molécules de surface de la reconnaissance leucocytaire

Pour comprendre le mécanisme moléculaire de ces reconnaissances, nous avons recherché les molécules impliquées dans la reconnaissance entre les cellules lymphoïdes et les CEMs, puis visualisé l'effet du NO[•] sur leur expression.

Etude des molécules impliquées dans le recrutement

Dans un premier temps, nous avons essayé de préciser quelles sont les molécules de surface impliquées lors de l'adhésion statique ou de l'adhésion en flux. Pour se faire, nous avons bloqué spécifiquement plusieurs molécules impliquées dans le recrutement leucocytaire par les anticorps neutralisants, choisis pour leur capacité de liaison aux HSkMEC et HPLNEC.B3. La figure 47 présente les résultats obtenus.

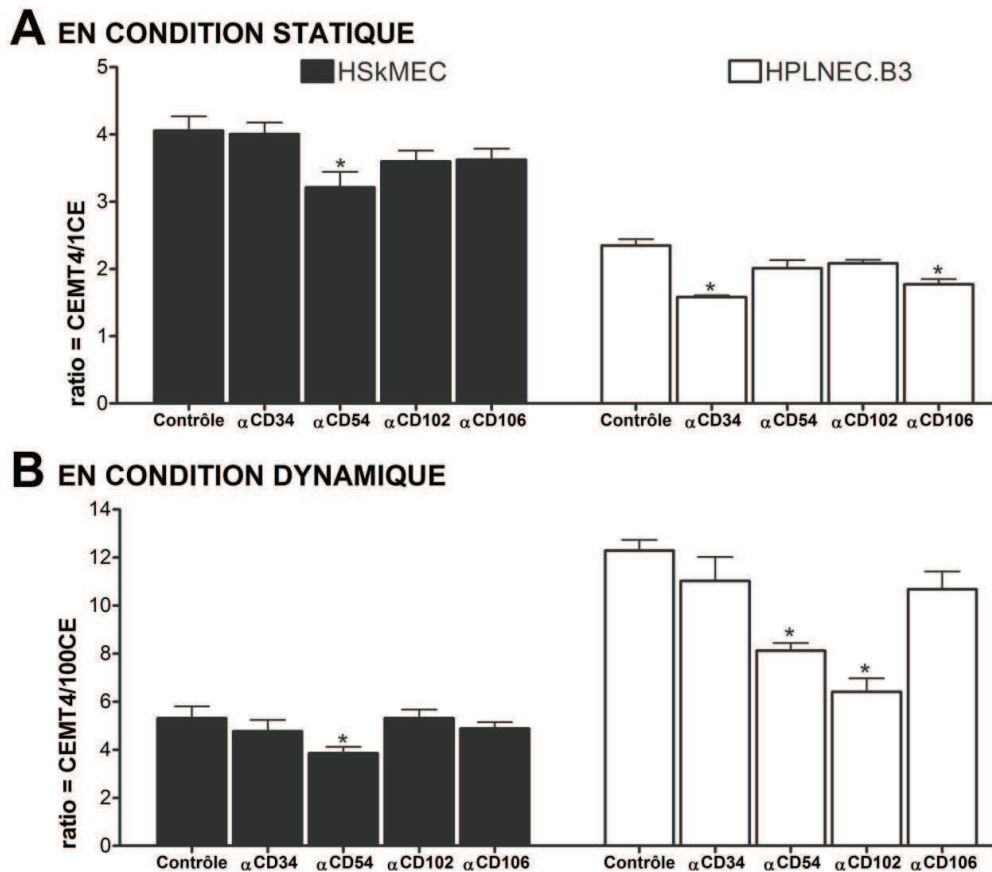


Figure 47 : Implication de molécules d'adhésion dans le recrutement leucocytaire, en condition statique (A) et dynamique (B). Les CEMs (HSkMEC en noir et HPLNEC.B3 en blanc) sont traitées par des anticorps neutralisants pendant 1h à 37°C.

Adhésion statique (A) : Les cellules endothéliales et lymphoïdes adhérentes sont discriminées par leur fluorescence et quantifiées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés par le ratio de CEMT4 adhérent sur une CEM de la monocouche (moyenne de 2 expériences en triplicat \pm SEM ; * $p < 0.05$).

Adhésion dynamique (B) : Les CEMT4 adhérentes sont visualisées sur le microscope inversé à fluorescence Zeiss Axiovert 200M. Les résultats sont exprimés par le ratio de CEMT4 adhérent sur 100 CEMs de la monocouche (1 expérience en duplicat \pm SEM ; * $p < 0.05$).

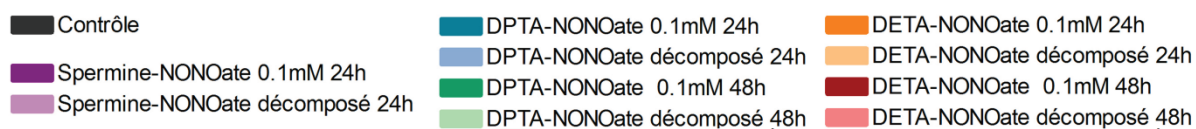
Les interactions entre les HSkMEC et les CEMT4 sont inhibées par l'anticorps α -ICAM-1/CD54, en condition statique ou dynamique, montrant l'importance primordiale du ICAM-1/CD54 dans les mécanismes de recrutement leucocytaire dans la peau.

Par contre, les interactions entre les HPLNEC.B3 et les CEMT4 sont diminuées soit par les anticorps α -CD34 et α -VCAM-1/CD106 en condition statique (figure 47A), soit par les anticorps α -ICAM-1/CD54 et α -ICAM-2/CD102 en condition dynamique (figure 47B). Ces résultats démontrent que, dans le cas de HPLNEC.B3, les deux types d'adhésion sont gouvernés par des molécules d'adhésion différentes. La liaison CD34 endothéliale-L-sélectine leucocytaire est certainement impliquée en condition statique, alors que le flux semble activer un mécanisme différent dépendant des molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines.

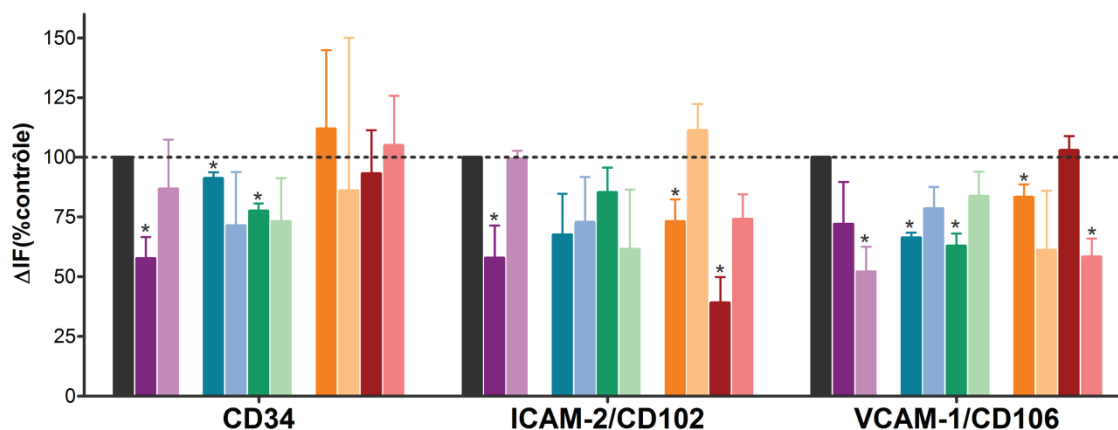
En conclusion, les mécanismes du recrutement leucocytaire sont différents pour les deux lignées endothéliales, puisque les molécules d'adhésion impliquées ne sont pas les mêmes. Les quatre molécules testées peuvent être engagées dans ce processus de reconnaissance. L'expression de la molécule ICAM-1/CD54 ayant déjà été évaluée dans la première partie, nous nous intéresserons maintenant aux trois autres.

*En présence d'un donneur de NO**

De la même manière que pour l'étude des molécules d'adhésion impliquées dans l'angiogenèse, nous avons étudié la réponse aux trois NONOates (Spermine-NONOate, DPTA-NONOate et DETA-NONOate) pour mimer des flux de NO* décroissants. L'expression des molécules d'adhésion exprimée en pourcentage du témoin est présentée sur la figure 48.



A HSKMEC



B HPLNEC.B3

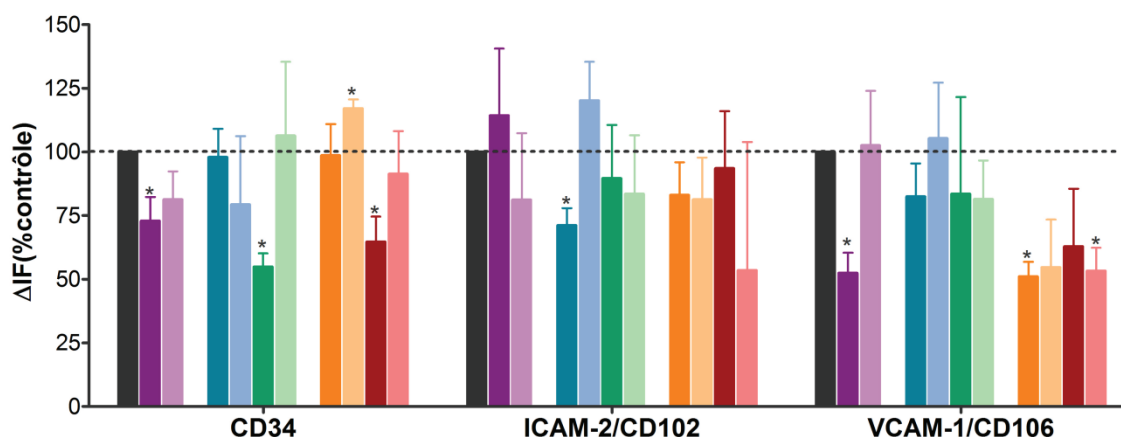


Figure 48 : Effet du NO[•] sur l'expression de CD34, ICAM-2/CD102 et VCAM-1/CD106 sur les lignées HSKMEC (A) et HPLNEC.B3 (B). Les CEMs sont traitées par les donneurs de NO[•] actifs ou décomposés (0.1mM) pendant 24h ou 48h. Les modifications de l'expression des molécules d'adhésion sont exprimées en pourcentage d'intensité de fluorescence rapportée à celle du témoin (moyenne de 3 à 6 expériences ± SEM ; * p<0.05).

L'expression de CD34 est diminuée par un traitement par la spermine-NONOate de façon importante et dépendante du NO[•], sur les HSKMEC (-42%, figure 48A) et sur les HPLNEC.B3 (-27%, figure 48B). Seul dans le cas des HPLNEC.B3, les deux autres donneurs de NO[•] permettent une diminution de l'expression de CD34 (-45% et -35% après 48h de traitement avec le DPTA-NONOate et le DETA-NONOate, respectivement). L'inhibition de l'expression de CD34 semble donc corrélée à la quantité de NO[•] produite, puisqu'elle est observée dès 24h pour le donneur ayant la vitesse de libération la plus rapide, mais qu'il faut des temps plus longs (48h) pour les donneurs à libération plus lente.

La molécule ICAM-2/CD102 présente des modifications de son expression dépendantes du NO[•], mais aussi dépendantes de l'origine de la lignée. L'expression de ICAM-2/CD102 sur les HSkMEC (figure 48A) est diminuée par la spermine-NONOate (-42%), et par le DETA-NONOate à 24h (-27%) et à 48h (-61%) ; le DPTA-NONOate n'ayant aucun effet. Au contraire, sur les HPLNEC.B3 (figure 48B), cette expression n'est diminuée que par le DPTA-NONOate à 24h (-29%).

L'expression de VCAM-1/CD106 est aussi diminuée par le NO[•], mais pas par les mêmes donneurs selon la lignée étudiée: sur les HSkMEC, le DPTA-NONOate inhibe cette expression de façon spécifique au NO[•] (-34% à 24h et -37% à 48h). Les HPLNEC.B3 réagissent à la spermine-NONOate avec une diminution de 48% de l'expression de VCAM-1/CD106. En revanche, les autres modulations ne sont pas spécifiques du NO[•], puisque les donneurs décomposés provoquent des effets proches.

En conclusion, le NO[•] exogène est encore une fois capable de moduler l'expression de molécules d'adhésion. De façon globale, il a tendance à diminuer les molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement leucocytaire.

En hypoxie

Nous avons comparé les résultats précédents, obtenus avec du NO[•] exogène, avec ceux induits par l'hypoxie (24 à 48h à 1% O₂). Afin de déterminer si l'origine des modifications observées en hypoxie est due au NO[•], nous avons complété l'étude en traitant les lignées cellulaires par deux inhibiteurs de NOS : le L-NAME et le 1400w. La figure 49 présente les résultats de cette étude, exprimés en pourcentage de l'expression de la molécule d'intérêt en fonction de son expression en normoxie.

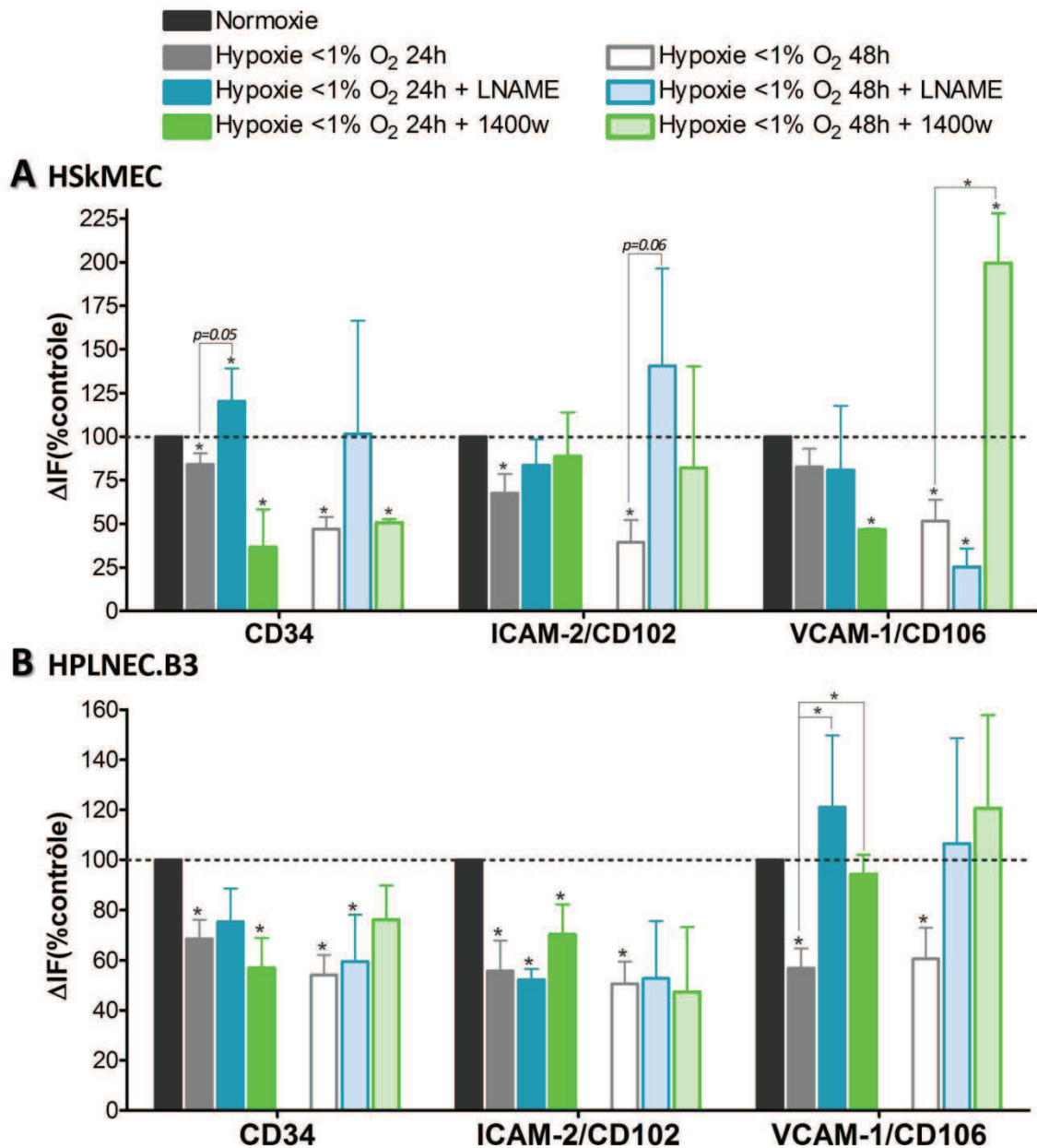


Figure 49 : Effet de l'hypoxie sur l'expression des molécules d'adhésion CD34, ICAM-2/CD102 et VCAM-1/CD106 sur la lignée HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B). Les CEMs sont maintenues en hypoxie en présence ou non des inhibiteurs de NOS (L-NAME 0.1 mM ; 1400w 1 μ M) pendant 24h ou 48h. Les modifications de l'expression des molécules d'adhésion sont exprimées en pourcentage d'intensité de fluorescence en fonction de celle du témoin en normoxie (moyenne de 3 à 6 expériences \pm SEM ; * $p < 0.05$).

L'expression de toutes les molécules testées diminue fortement dès 24h d'hypoxie (-16% à -44%), à part pour VCAM-1/CD106 sur les HSkMEC, montrant qu'elles sont sensibles à la baisse du taux d'oxygène. Cette modification s'accroît encore après 48h de traitement (-39% à -61%) et devient significative pour VCAM-1/CD106 sur les HSkMEC.

En travaillant en présence d'inhibiteurs de NOS, nous pouvons déterminer si cet effet est dépendant du NO[•] et quel type de NOS est impliqué. Sur les HSkMEC (figure 49A), l'inhibition de CD34 semble

réversée uniquement par le L-NAME suggérant que la production de NO[•] était due à la NOS3. Au contraire, l'expression de ICAM-2/CD102 semble rétablie par le L-NAME et le 1400w montrant une implication préférentielle de la NOS2. Dans ces deux cas, les différences ne sont pas encore statistiquement significatives. L'effet sur VCAM-1/CD106 est beaucoup moins net (diminution de l'expression en présence de L-NAME et, au contraire, très forte augmentation en présence de 1400w) et ces seuls résultats ne permettent pas de conclure sur l'implication du NO[•] et des NOS.

Sur les HPLNEC.B3 (figure 49B), la diminution d'expression de VCAM-1/CD106 est nettement rétablie en présence des deux inhibiteurs de NOS montrant le rôle de la NOS2. Par contre, les expressions de CD34 et de ICAM-2/CD102 ne sont pas modifiées par les inhibiteurs de NOS donc ne font pas intervenir le NO[•] issu des NOS, mais vraisemblablement d'autres mécanismes induits en hypoxie.

En conclusion, l'hypoxie diminue l'expression de ces molécules, de manière partiellement comparable aux donneurs de NO[•]. Pour CD34 et ICAM-2/CD102 sur les HSkMEC et pour VCAM-1/CD106 sur les HPLNEC.B3, l'effet inhibiteur de l'hypoxie sur l'expression des molécules d'adhésion impliquées dans la reconnaissance leucocytaire serait directement attribuable au NO[•] et impliquerait préférentiellement soit la NOS3, soit la NOS2, ou la coopération des deux enzymes. Encore une fois, les deux lignées se distinguent par des mécanismes de contrôle de l'expression des molécules d'adhésion distinctes.

iii. Bilan des résultats

Comme précédemment, les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux 8 et 9 suivants, dans lesquels seuls les effets des NONOates attribuables au NO[•] et ceux de l'hypoxie sont présentés. Les adhésions statique et en flux sont indiquées, avec, à leurs suites, les molécules d'adhésion impliquées dans chacune, d'après l'étude réalisée précédemment utilisant les anticorps neutralisants. Dans le cas des HSkMEC, les molécules d'adhésion impliquées dans l'adhésion sont séparées d'un trait gris de celles qui ne l'ont pas été. Enfin, puisque nous avons montré que ICAM-1/CD54 est aussi impliqué dans le recrutement leucocytaire, les modulations de son expression ont été reprises dans ces tableaux.

Tableau 8 : Récapitulatif des effets des NONOates attribuables au NO[•] et à l'hypoxie sur le recrutement des CEMT4 sur les HSkMEC, exprimés en pourcentage du témoin. ND = non déterminé. En hypoxie, les différences soulignées sont statistiquement différentes des inhibiteurs de NOS indiqués. Les données entre parenthèses présentent des différences proches de la significativité (0.1 < p < 0.05).

	<u>Sp-NONOate</u>		<u>DPTA-NONOate</u>		<u>DETA-NONOate</u>		<u>Hypoxie</u>	
			24h	48h	24h	48h	24h	48h
Adhésion statique					ND	ND	↘-75%	↘-80%
Adhésion en flux	ND	↘-39%	ND	ND	ND	ND	ND	↘-53%
ICAM-1/CD54	↘-23%	↗+17%						
CD34	↘-42%						↘-16% <u>(LNAME)</u>	↘-53%
ICAM-2/CD102	↘-42%				↘-27%	↘-61%	↘-32%	↘-61% <u>(LNAME)</u>
VCAM-1/CD106			↘-34%	↘-37%				↘-48% <u>1400w</u>

Tableau 9 : Récapitulatif des effets des NONOates attribuables au NO[•] et à l'hypoxie sur le recrutement des CEMT4 sur les HPLNEC.B3, exprimés en pourcentage du témoin. ND = non déterminé. En hypoxie, les différences soulignées sont statistiquement différentes des inhibiteurs de NOS indiqués. Les données entre parenthèses présentent des différences proches de la significativité (0.1 < p < 0.05).

	<u>Sp-NONOate</u>		<u>DPTA-NONOate</u>		<u>DETA-NONOate</u>		<u>Hypoxie</u>	
			24h	48h	24h	48h	24h	48h
Adhésion statique					ND	ND		↘-33%
CD34				↘-45%		↘-35%	↘-31%	↘-46%
VCAM-1/CD106	↘-48%						↘-43% <u>LNAME</u> <u>+1400w</u>	↘-39%
Adhésion en flux	ND		ND	ND	ND	ND	ND	
ICAM-1/CD54		↗+159%						↗+170% <u>(1400w)</u>
ICAM-2/CD102			↘-29%				↘-44%	↘-49%

L'expression des molécules d'adhésion est diminuée en présence de NO[•] ou en hypoxie. Au contraire, ICAM-1/CD54 est fortement induit par un fort donneur de NO[•] et par l'hypoxie. De nombreuses spécificités sont observées selon le donneur utilisé. Par exemple, VCAM-1/CD106 est modulé par des concentrations différentes de NO[•] selon le type cellulaire. Cela démontre une organo-spécificité de réponse selon la dose de NO[•].

iv. Discussion sur la modulation du recrutement leucocytaire par le NO[•]

Dans notre étude, nous montrons, en accord avec d'autres travaux^{180,241}, que le recrutement leucocytaire est inhibé par le NO[•]. Cependant, notre étude met en parallèle les mécanismes cellulaires et moléculaires et montre de fortes disparités selon les conditions expérimentales et le type cellulaire.

Premièrement, les molécules d'adhésions impliquées sont distinctes selon la dynamique de l'expérimentation et le type cellulaire.

Deuxièmement, les modulations par le NO[•] ou l'hypoxie ne sont pas les mêmes que l'expérience se soit déroulée en statique ou en flux. Ensembles, ces informations démontrent que les deux techniques utilisées miment des mécanismes cellulaires différents. L'expérience en flux reprend toutes les étapes du recrutement, alors que l'adhésion statique n'implique que les phases tardives. De plus, nous montrons que les recrutements sur les deux types d'endothélium sont distincts, car gouvernés par des molécules d'adhésion différentes et modulés différemment.

Troisièmement, les modulations d'expression des molécules d'adhésion sont variables selon le type cellulaire et la concentration en NO[•]. Par exemple, l'expression de CD34 n'est modifiée que par la spermine-NONOate et l'hypoxie sur les HSkMEC, alors qu'elle l'est avec les 3 donneurs de NO[•] et en hypoxie, sur les HPLNEC.B3.

Enfin, les modulations de l'adhésion induites par le NO[•] sont difficiles à expliquer uniquement par la modulation des molécules d'adhésions étudiées. Par exemple, l'inhibition de l'adhésion statique des HPLNEC.B3 en hypoxie peut s'expliquer par les diminutions d'expression de CD34 et VCAM-1/CD106, molécules importantes pour l'adhésion statique. Par contre, en présence de DPTA-NONOate, l'inhibition de l'adhésion sur les HPLNEC.B3 n'est pas reliée à une modification de l'expression de ces molécules. De même, sur les HSkMEC, les modulations de ICAM-1/CD54, molécule principale impliquée dans les 2 mécanismes d'adhésion, ne permettent pas d'expliquer à elles seules les inhibitions des adhésions statiques et en flux observées. Dans ce cas, nous pouvons supposer que les fortes diminutions d'expression des 3 autres molécules d'adhésions après 48h d'hypoxie influencent les interactions cellulaires, même si leur implication dans l'adhésion n'a pas été démontrée en utilisant les anticorps neutralisants. Cela indique et confirme que les interactions cellulaires sont très complexes et/ou définies par d'autres molécules de surface.

Plus précisément, nous pouvons reprendre la fonction de chaque molécule d'adhésion testée et ses modulations induites par le NO[•]. CD34 permet le recrutement des leucocytes de par ses interactions avec la L-sélectine. Son importance dans l'adhésion des HPLNEC.B3 s'explique par son rôle lors du

homing des leucocytes dans les ganglions lymphatiques. Notre étude est la première montrant la modulation de l'expression de CD34 par le NO[•] et surtout par l'hypoxie.

Les molécules ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102 et VCAM-1/CD106 sont de la superfamille des immunoglobulines et sont fortement impliquées dans le recrutement leucocytaire^{89,94}. ICAM-1/CD54 et VCAM-1/CD106, par l'intermédiaire d'intégrines, permettent le roulement et l'adhésion ferme des leucocytes. La modulation d'expression de ces deux molécules par le NO[•] a été largement étudiée^{181,182,220,240}, mais le plus souvent dans des modèles macrovasculaires. Dans certaines études, cela est mis en parallèle avec le recrutement leucocytaire^{181,240}. Contrairement à notre étude qui se déroule en condition native/basale, le but de ces études était de visualiser l'influence du NO[•] sur l'activation par des cytokines inflammatoires. Ces résultats montrent que, dans l'ensemble, le NO[•] diminue l'activation cellulaire par une diminution de la surexpression des molécules d'adhésion (induite par des cytokines), mais des différences s'observent selon les études. Ces contradictions peuvent s'expliquer par le modèle cellulaire utilisé. En effet, nous venons de montrer ici que les molécules impliquées dans le recrutement, ainsi que leurs régulations, sont différentes selon l'origine de la CE. Récemment, Schenkel *et al.*⁹⁴ ont démontré l'implication de ICAM-2/CD102 dans les étapes tardives du recrutement. En effet, la neutralisation de cette molécule d'adhésion diminue fortement la transmigration, mais pas la migration.

Dans les conditions basales de notre étude, ICAM-2/CD102 et VCAM-1/CD106 sont inhibés par le NO[•] et par l'hypoxie, de façon dépendante du flux de NO[•] et de la nature des cellules. Ces diminutions peuvent être reliées aux travaux de Khan *et al.*, qui ont montré que les gènes de ICAM-1/CD54 et VCAM-1/CD106 sont sous la dépendance de NFκB¹⁷⁹. Ce facteur de transcription est inhibé, après stabilisation de l'inhibiteur de NFκB (inhibitor of κB IκB) par le NO[•], ce qui provoque une sous-expression des molécules d'adhésion²²⁰.

Notre étude montre, de nouveau, que le NO[•] module l'expression des molécules d'adhésion, différemment selon sa concentration. Les faibles concentrations de NO[•] exogène ou produit par la NOS3 inhibent l'expression de CD34, sur les HPLNEC.B3 ou les HSkMEC, respectivement. A l'inverse, ICAM-1/CD54 est modulé dans les deux types cellulaires par un environnement riche en NO[•]. Enfin, les HSkMEC semblent plus sensibles au NO[•] que les HPLNEC.B3 pour l'expression de ICAM-2/CD102 et VCAM-1/CD106, car de plus faibles concentrations permettent les mêmes modifications. Les CEs sont donc modifiées selon la concentration de NO[•] dans le microenvironnement : d'une concentration basse en NO[•], comparable à des concentrations physiologiques dans les CEs, où une seule molécule est inhibée (ICAM-1/CD102 sur les HSkMEC et CD34 sur les HPLNEC.B3), jusqu'à une

concentration forte proche de celles de certaines tumeurs fortes productrices de NO[•], où l'expression de 3 ou 4 molécules d'adhésion est modifiée.

En hypoxie, toutes les molécules d'adhésion testées sont modulées, hormis ICAM-1/CD54 sur les HSkMEC. De plus, leurs modulations sont similaires à celles en présence de NO[•] exogène. Par contre seules certaines ont été mises en relation directe avec une production de NO[•] par les NOS en hypoxie. Par exemple, ICAM-1/CD54 est sur-exprimé et VCAM-1/CD106 est sous-exprimé, par le NO[•] produit par la spermine-NONOate ou la NOS2 en hypoxie, sur les HPLNEC.B3. Sur les HSkMEC, les diminutions d'expression de CD34, ICAM-2/CD102 et VCAM-1/CD106 sont certainement dépendantes du NO[•] et de la NOS2, même si les différences entre l'expression en hypoxie et en présence d'inhibiteurs de NOS ne sont pas toujours statistiquement significatives par manque d'échantillons. Cette étude est la première montrant une modulation de l'expression de ces trois molécules par l'hypoxie. Des travaux précédents s'intéressants à VCAM-1/CD106 n'avaient visualisé aucune modulation^{242,243}, sur des HUVEC. Cela démontre, une fois encore, l'importance d'utiliser un modèle endothélial microvasculaire, plus proche de la physiologie.

Les deux lignées ont, par ailleurs, des différences de réponses au NO[•]. Les adhésions statique et en flux sont modulées différemment selon la concentration en NO[•], suggérant que des phases différentes du recrutement sont sensibles au NO[•]. De même pour l'expression des molécules d'adhésion : globalement, de fortes concentrations sont nécessaires pour provoquer les modulations sur les HPLNEC.B3, alors que des concentrations plus faibles suffisent sur les HSkMEC. De façon plus précise, chaque donneur de NO[•], en libérant une certaine quantité de NO[•], induit des modifications spécifiques sur chaque type cellulaire.

En conclusion, l'adhésion des cellules lymphoïdes sur les CEs est inhibée en présence de NO[•] et/ou en hypoxie. Une tumeur riche en NO[•] et/ou hypoxique pourrait donc induire une inhibition du recrutement leucocytaire et contourner ainsi le système immunitaire de l'hôte. Nous avons montré que cette inhibition est en parallèle de la sous-expression de plusieurs molécules d'adhésion, impliquées dans le recrutement.

b. L'activation du recrutement des leucocytes par les chimiokines

Au cours du recrutement leucocytaire, les chimiokines sont indispensables pour former un gradient attirant les leucocytes vers un site spécifique de l'endothélium, avant le processus d'adhésion. En plus de son rôle direct sur les interactions cellulaires lors du recrutement leucocytaire que nous venons de décrire, nous avons recherché si NO[•] était capable de moduler l'expression des molécules de liaison aux chimiokines. Cette troisième partie a donc consisté en l'étude de l'expression de deux

types de récepteurs de chimiokines : les récepteurs transmembranaires de chimiokines et les glycosaminoglycannes.

i. Les récepteurs de chimiokines

Les premières molécules capables de lier les chimiokines sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, qui sont couplés à des protéines G. Ce sont les récepteurs principaux des chimiokines. Nous avons voulu déterminer si ces molécules sont modulées par le NO[•]. Nous avons étudié CCR5 (le principal récepteur de RANTES), CCR7 (ses ligands sont 6Ckine et MIP-3β), CX₃CR1 (récepteur de la fractalkine) et CXCR4 (récepteur de SDF-1). L'effet des donneurs de NO[•] sur l'expression des molécules d'adhésion sur les HSkMEC est présenté sur la figure 50.

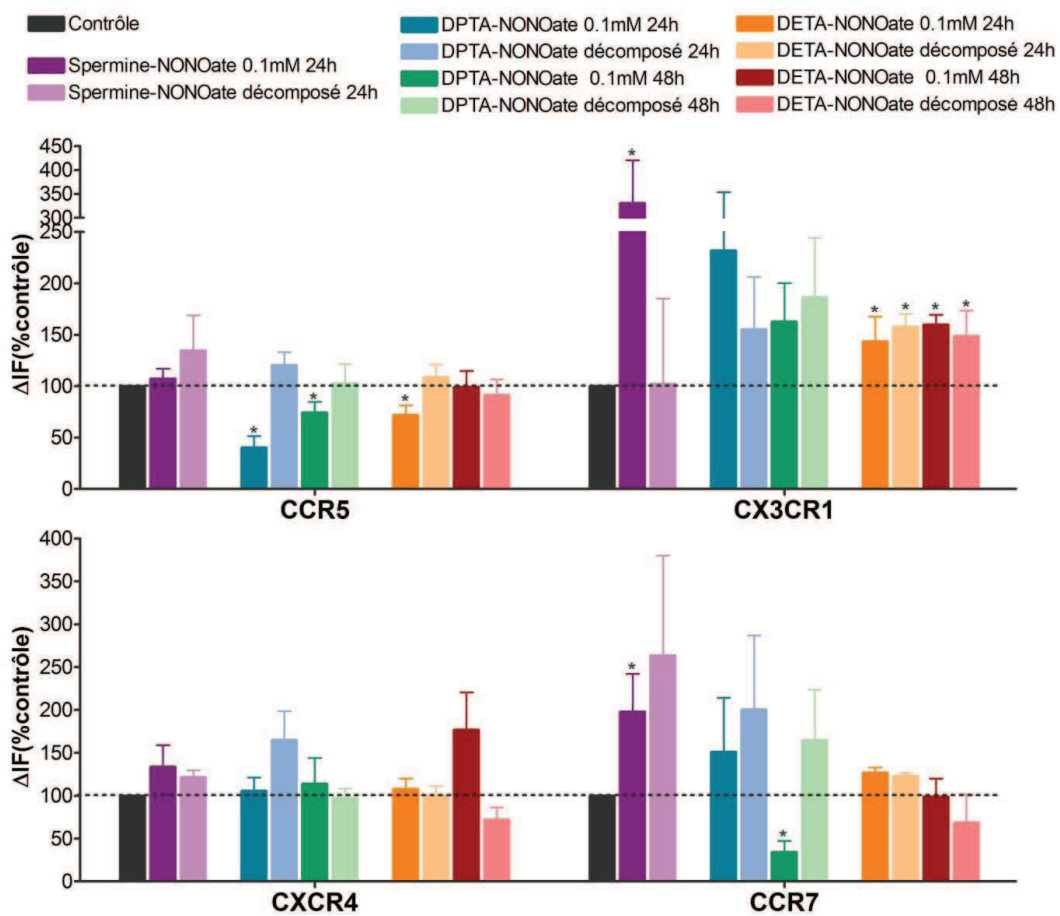


Figure 50 : Effet du NO[•] sur l'expression des récepteurs de chimiokines CCR5, CX₃CR1, CXCR4 et CCR7 sur la lignée HSkMEC. Les CEMs sont traitées par les donneurs de NO[•] actifs ou décomposés (0.1 mM) pendant 24h ou 48h. Les modifications de l'expression des molécules d'adhésion sont exprimées en pourcentage d'intensité de fluorescence en fonction de celle du témoin (moyenne de 3 à 5 expériences ± SEM ; * p<0.05).

L'expression de CCR5 est clairement diminuée avec le DETA-NONOate à 24h (-28%) et surtout par le DPTA-NONOate (-31% à 24h, -26% à 48h), les donneurs à libération plus lente. L'inhibition est plus importante au temps précoce (24h), puis diminue ou s'estompe à 48h. A l'inverse, CX₃CR1 augmente

très fortement, mais uniquement en présence de spermine-NONOate (+231%), NONOate ayant la demi-vie la plus courte et produisant une forte concentration de NO[•], les autres variations n'étant pas attribuables au NO[•]. L'expression de CCR7 est fortement diminuée après 48h de DPTA-NONOate (-66%) mais n'est pas affectée par les autres donneurs de NO[•].

Donc, aux temps précoces, sur les HSkMEC, une forte concentration de NO[•] augmente considérablement l'expression de CX₃CR1 alors qu'une concentration plus faible diminue CCR5. Aux temps plus long, ces effets diminuent ou disparaissent mais une concentration moyenne de NO[•] inhibe alors l'expression de CCR7.

L'effet des donneurs de NO[•] sur l'expression des molécules d'adhésion sur les HPLNEC.B3 est maintenant présenté sur la figure 51.

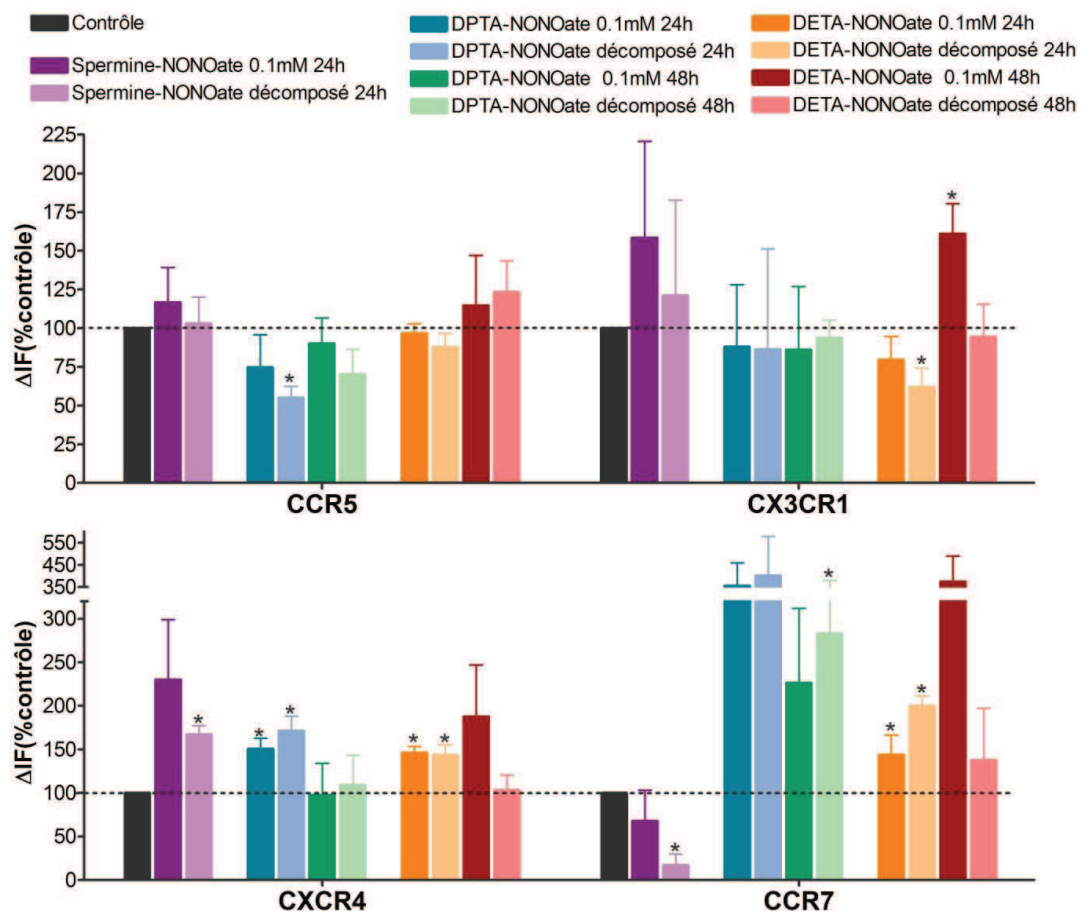


Figure 51 : Effet du NO[•] sur l'expression des récepteurs de chimiokines CCR5, CX₃CR1, CXCR4 et CCR7 sur la lignée HPLNEC.B3. Les CEMs sont traitées par les donneurs de NO[•] actifs ou décomposés (0.1 mM) pendant 24h ou 48h. Les modifications de l'expression des molécules d'adhésion sont exprimées en pourcentage d'intensité de fluorescence en fonction de celle du témoin (moyenne de 3 à 5 expériences ± SEM ; * p<0.05).

Sur les HPLNEC.B3 (figure 51), seul le DETA-NONOate à 48h induit une augmentation d'expression de CX₃CR1 (+60%) et de CCR7 (+274%, mais non significative, avec p=0.08), les autres modifications observées, bien que très fortes, n'étant pas dues au NO[•].

Donc, aux temps précoces, sur les HPLNEC.B3 il n'y a aucun effet du NO[•]. Aux temps plus longs, un faible flux de NO[•] conduit à une augmentation de CX₃CR1 et vraisemblablement de CCR7. Comme dans le cas de l'adhésion des leucocytes sur les CEs, les HPLNEC.B3 sont moins réactives au NO[•] comparativement aux HSkMEC.

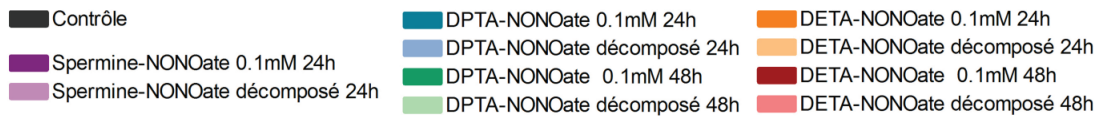
En conclusion, le NO[•] est capable de moduler l'expression de certains récepteurs de chimiokines et de façon nettement différente sur les 2 lignées étudiées.

ii. Les glycosaminoglycannes

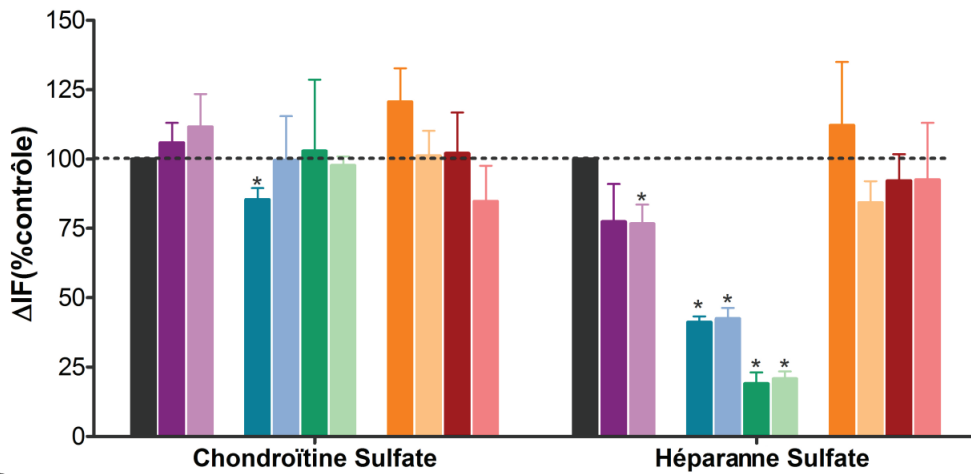
Les GAGs sont de longs polysaccharides associés à la surface des cellules et capables de lier des chimiokines pour former un gradient de cytokines attirant les leucocytes. Nous avons étudié le rôle de NO[•] sur l'expression de l'HS et du CS, deux GAGs présents sur ces cellules.

En présence de donneurs de NO[•]

Dans un premier temps, nous avons analysé les modifications d'expression de ces GAGs en présence des mêmes donneurs de NO[•] que précédemment : la spermine-NONOate, le DPTA-NONOate et le DETA-NONOate (figure 52).



A HSkMEC



B HPLNEC.B3

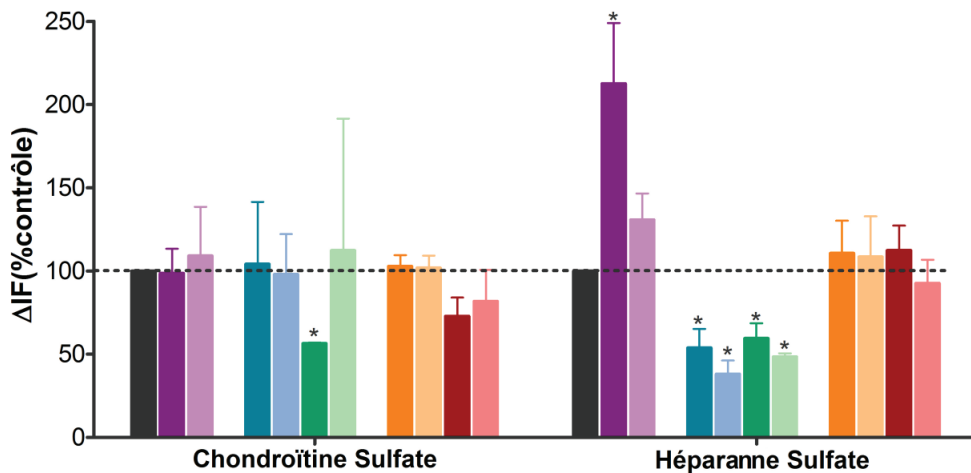


Figure 52 : Effet du NO[•] sur l'expression des glycosaminoglycannes Chondroïtine sulfate et Héparanne sulfate sur les lignées HSkMEC (A) et HPLNEC.B3 (B). Les CEMs sont traitées par les donneurs de NO[•] actifs ou décomposés (0.1 mM) pendant 24h ou 48h. Les modifications de l'expression des molécules d'adhésion sont exprimées en pourcentage d'intensité de fluorescence en fonction de celle du témoin (moyenne de 3 à 6 expériences ± SEM ; * p<0.05).

Le taux de la CS est diminué uniquement en présence de DPTA-NONOate :

- à 24h sur les HSkMEC (-15%, figure 52A),
- à 48h sur les HPLNEC.B3 (-44%, figure 52B).

Les autres donneurs de NO[•] sont inactifs sur l'expression de la CS.

L'expression de HS est très fortement augmentée sur les HPLNEC.B3 en présence de spermine-NONOate (+113%). Cette surexpression est spécifique à ce type cellulaire, puisque les HSkMEC ne présentent pas cette modification. D'autre part, il est à remarquer que, indépendamment du NO[•],

l'expression de HS est fortement inhibée par les produits de décomposition du DPTA-NONOate dans les deux types cellulaires.

Comme pour d'autres molécules étudiées, le flux de NO[•] imposé est particulièrement important car seules certaines concentrations sont capables de moduler l'expression des GAGs. Par exemple, le taux de CS n'est diminué qu'après un traitement par le DPTA-NONOate, sur les deux types cellulaires.

En conclusion, le NO[•] est capable de moduler l'expression des GAGs (inhibition de l'expression de la CS et, inversement, augmentation importante de celle de l'HS), ce qui pourrait induire des perturbations dans la présentation des chimiokines et donc dans la formation du gradient chimioattractant, indispensable au recrutement leucocytaire.

En hypoxie

Pour comparer ceci avec les effets de l'hypoxie, nous avons réalisé l'étude de l'expression des GAGs en hypoxie (1% O₂), en présence ou non des inhibiteurs de NOS : L-NAME et 1400w. Les résultats sont présentés sur la figure 53.

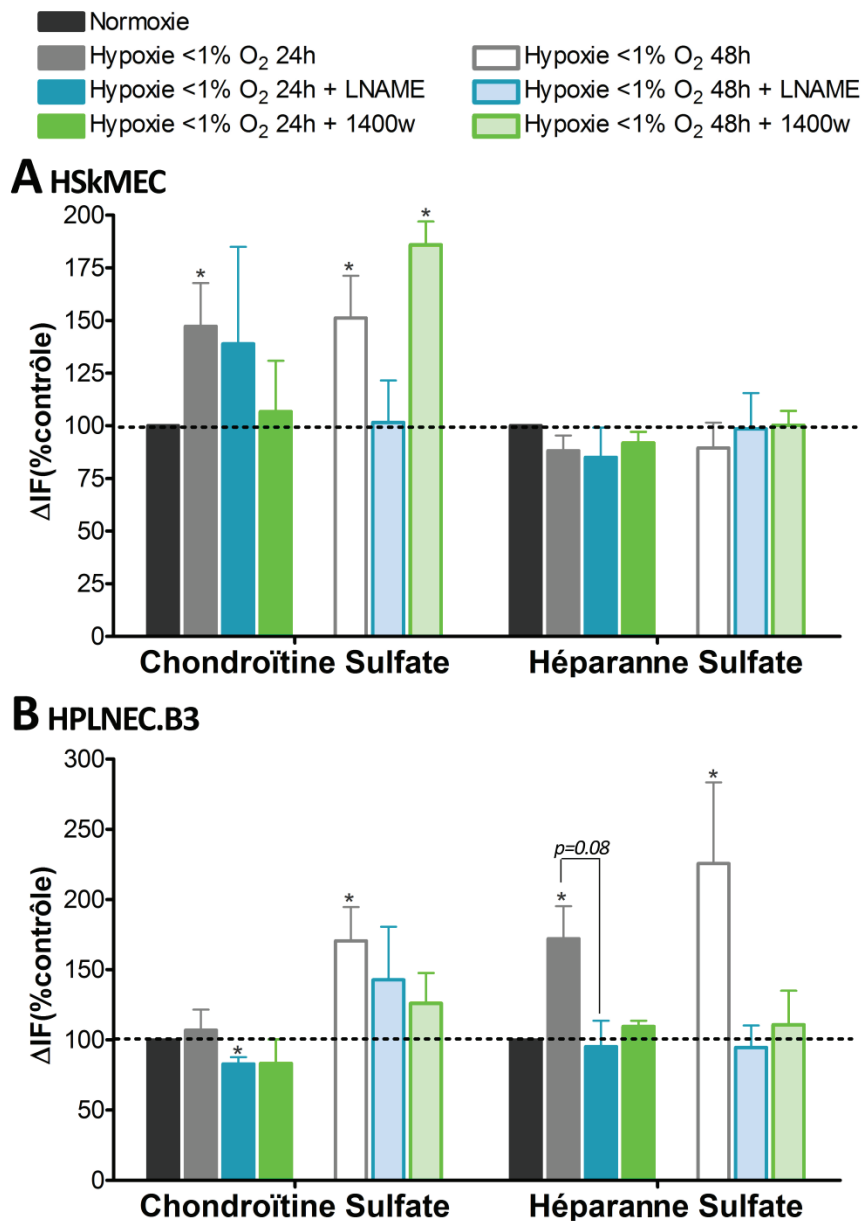


Figure 53 : Effet de l'hypoxie sur l'expression des glycosaminoglycannes Chondroïtine sulfate et Héparanne sulfate sur la lignée HSKMEC (A) et HPLNEC.B3 (B). Les CEMs sont maintenues en hypoxie en présence ou non des inhibiteurs de NOS (L-NAME 0.1 mM ; 1400w 1 μM) pendant 24h ou 48h. Les modifications de l'expression des molécules d'adhésion sont exprimées en pourcentage d'intensité de fluorescence en fonction de celle du témoin (moyenne de 3 à 6 expériences ± SEM ; * p<0.05).

En conditions hypoxiques, la CS est augmentée sur les HSKMEC (figure 53A) dès 24h de traitement (+47% à 24h et +51% à 48h). Sur les HPLNEC.B3 (figure 53B), l'augmentation de l'expression de CS est plus tardive, mais plus intense (+71%).

Sur les HSKMEC, après 48h d'hypoxie, le L-NAME réverse cette augmentation mais pas le 1400w, suggérant l'implication du NO[•] produit par la NOS3. Par contre, l'effet observé sur la CS à 24h sur ces cellules ou bien à 48h sur les HPLNEC.B3 est peu ou pas modifié par les inhibiteurs de NOS, donc ces modifications ne sont pas clairement attribuables au NO[•].

L'observation la plus intéressante de cette étude est la forte surexpression de HS (+70% à 24h et +126% à 48h), uniquement sur les HPLNEC.B3. Les deux inhibiteurs de NOS testés permettent un retour à l'expression de base (mais les différences ne sont pas tout à fait significatives), suggérant une production de NO[•] par la NOS2 à l'origine de cette modification.

En conclusion, l'hypoxie augmente l'expression de la CS sur les CE et du HS spécifiquement sur les HPLNEC.B3, en impliquant vraisemblablement, dans ce dernier cas, la NOS2. L'hypoxie et le NO[•] endogène sont donc susceptibles de moduler la présentation des chimiokines et, par conséquent, le recrutement des leucocytes circulants.

iii. Bilan des résultats

Comme précédemment, les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux 10 et 11 suivants, dans lesquels seuls les effets des NONOates attribuables au NO[•] et ceux de l'hypoxie sont présentés.

Tableau 10 : Récapitulatif des effets des NONOates attribuables au NO[•] et à l'hypoxie sur l'expression des récepteurs de chimiokines par les HSkMEC, exprimés en pourcentage du témoin. ND = non déterminé. En hypoxie, les différences soulignées sont statistiquement différentes des inhibiteurs de NOS indiqués. Les données entre parenthèses présentent des différences proches de la significativité (0.1 < p < 0.05).

	<u>Sp-NONOate</u>	<u>DPTA-NONOate</u>		<u>DETA-NONOate</u>		<u>Hypoxie</u>	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
CCR5		↘-31%	↘-26%	↘-28%		ND	ND
CX ₃ CR1	↗+231%					ND	ND
CXCR4						ND	ND
CCR7						ND	ND
CS		↘-15%				↗+47%	↗+51%
HS							

Tableau 11 : Récapitulatif des effets des NONOates attribuables au NO[•] et à l'hypoxie sur l'expression des récepteurs de chimiokines par les HPLNEC.B3, exprimés en pourcentage du témoin. ND = non déterminé. En hypoxie, les différences soulignées sont statistiquement différentes des inhibiteurs de NOS indiqués. Les données entre parenthèses présentent des différences proches de la significativité (0.1 < p < 0.05).

	<u>Sp-NONOate</u>	<u>DPTA-NONOate</u>		<u>DETA-NONOate</u>		<u>Hypoxie</u>	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
CCR5						ND	ND
CX ₃ CR1					↗+61%	ND	ND
CXCR4	(+130%)					ND	ND
CCR7					(+274%)	ND	ND
CS			↘-44%		(-27%)		↗+71%
HS	↗+113%					↗+72% (LNAME)	↗+126%

Ces deux tableaux permettent de comparer l'expression des récepteurs de chimiokines et des GAGs. Le NO[•] module l'expression de CX₃CR1 et CCR5 sur les HSkMEC, par de fortes concentrations et de plus faibles concentrations de NO[•], respectivement. A l'inverse, sur les HPLNEC.B3, ce sont les faibles concentrations de NO[•] qui sont capables d'augmenter l'expression de CX₃CR1. La CS est inhibée par le DPTA-NONOate et augmentée en hypoxie dans les deux types cellulaires, alors que l'HS est spécifiquement sur-exprimée en présence de fortes concentrations de NO[•], produit par la spermine-NONOate ou en hypoxie (par la NOS2), sur les HPLNEC.B3.

iv. Discussion sur les modulations d'expression des récepteurs de chimiokines par le NO[•]

En aval du roulement, les chimiokines attirent les leucocytes vers le site de l'inflammation. Les récepteurs de chimiokines activent les CEs et forment le gradient chimioattractant. Nous avons montré que l'expression de ces molécules est perturbée par le NO[•] (diminution de l'expression de CCR5 et CCR7), suggérant une diminution dans la présentation et la fixation des chimiokines ce qui peut conduire à un recrutement leucocytaire moins efficace. Seule l'augmentation du taux de CX₃CR1, le récepteur de la fractalkine, pourrait être à l'origine d'un mécanisme de compensation visant à modifier le recrutement en présence de NO[•]. Dans le cas des HSkMEC, l'inhibition du recrutement par le DPTA-NONOate peut s'expliquer par la diminution de la CS, dans le même temps que CCR5, puis CCR7. Les récepteurs transmembranaires jouent donc de concert avec les GAGs pour intensifier l'action du NO[•]. Dans le cas des HPLNEC.B3, il apparaît que l'HS et peut-être le CCR7 sont augmentés par le NO[•].

Plus précisément, nous pouvons reprendre la fonction de chaque molécule testée et ses modulations induites par le NO[•]. CCR5 et sa chimiokine RANTES sont fortement impliqués dans le recrutement des lymphocytes T auxiliaires (ou « T-helper »). RANTES a une action chimiotactique et CCR5 une action activatrice sur ce type de lymphocytes. Ceci explique qu'un défaut en ce récepteur soit associé à une augmentation de la susceptibilité aux maladies²⁴⁴. En effet, dans notre modèle, la diminution de l'expression de CCR5 par le NO[•] sur HSkMEC est associée à une diminution de l'adhésion en flux des CEMT4 sur l'endothélium, alors que ce n'est pas le cas dans les ganglions lymphatiques. Dans notre étude, il apparaît donc que CCR5 est un acteur primordial du recrutement leucocytaire dans la peau.

L'expression de CX₃CR1 est augmentée dans les deux types cellulaires, mais de façon beaucoup plus importante sur les HSkMEC et pour de fortes concentrations en NO[•]. Dans ces conditions, la liaison de CX₃CR1 à la fractalkine est potentiellement augmentée sur les CEs. Le rôle principal de cette chimiokine est d'augmenter la migration et l'adhésion des lymphocytes NK²⁴⁵, après sa liaison sur ces cellules. Les lymphocytes NK sont alors capables de lyser les cellules tumorales²⁴⁶ et endothéliales²⁴⁷. Cette propriété est d'ailleurs utilisée dans certaines thérapies anti-tumorales. Cependant, la fractalkine semble avoir peu d'effets directs sur les CEs. Ensembles, ces données proposent que la fractalkine, en se liant sur CX₃CR1 endothélial, soit diminué dans le microenvironnement et empêche le recrutement des lymphocytes NK vers la peau, en présence de fortes concentrations de NO[•], comme c'est le cas dans un contexte tumoral. Cela expliquerait la diminution de l'infiltration de ces leucocytes dans les tumeurs²⁴⁶.

La 6Ckine, chimiokine spécifique de CCR7, est fortement exprimée dans les ganglions lymphatiques. Son rôle est d'attirer les lymphocytes T vers ce site. La diminution de l'expression de CCR7 sur les HSkMEC par le DPTA-NONOate induit vraisemblablement peu de modifications cellulaires, car la 6Ckine est peu/pas exprimée dans la peau. En revanche, l'expression de CCR7 sur les HPLNEC.B3 a tendance à augmenter pour des concentrations très faibles de NO[•], c'est-à-dire proches de la physiologie. La capacité de liaison de la 6Ckine est accrue et le recrutement des leucocytes augmenté, dans les tissus lymphatiques, site de production importante de la 6Ckine. Dès que les concentrations en NO[•] augmentent, comme dans un environnement tumoral, l'expression de CCR7 retombe aux taux de base, la 6Ckine se fixe moins qu'en présence de DETA-NONOate sur ce type cellulaire : ces observations supposent que le recrutement des lymphocytes T par l'endothélium dans les ganglions lymphatiques soit diminué, même si cela n'est pas observé dans notre modèle. Dans le contexte du mélanome, l'expression de CCR7 sur des cellules tumorales facilite les métastases dans les ganglions lymphatiques¹¹⁶ *in vivo*. Le NO[•] pourrait donc être responsable de modulations cellulaires, qui visent à attirer les cellules tumorales vers ce site de métastases.

CXCR4 est aussi fortement impliqué dans la progression du mélanome. Il promeut la dissémination vers le poumon, en activant la prolifération des cellules tumorales et leurs propriétés adhésives²⁴⁸. Par notre étude, nous montrons que l'expression de CXCR4 n'est pas modifiée ni par le NO[•], ni par l'hypoxie. Cependant, il a été montré que son activation seule augmente l'affinité des intégrines β_1 pour VCAM-1/CD106 endothélial²⁴⁹.

Enfin, il serait intéressant de poursuivre l'étude afin de comparer ces résultats avec ceux de l'hypoxie sur l'expression de ces molécules. Ceci nous permettrait d'avoir une idée plus précise de ce qui se passe dans le microenvironnement tumoral.

Les GAGs sont eux aussi, clairement et intensément modulés par le NO[•]. L'expression de la CS est diminuée en présence de DPTA-NONOate sur les deux types cellulaires. Cela est concordant avec une étude biochimique indiquant que le NO[•] est capable de dégrader partiellement les CS²⁵⁰. En revanche, en hypoxie, la CS est augmentée, permettant une meilleure fixation aux chimiokines. Cet effet est indépendant du NO[•]. Bien que la CS soit le plus GAG le plus abondant, son rôle sur les CEs n'est que peu décrit, alors qu'il est très étudié dans les systèmes nerveux et articulaire.

L'observation la plus intéressante est l'expression augmentée de l'HS pour de fortes concentrations de NO[•], qu'elles soient apportées par la spermine-NONOate ou par l'hypoxie, uniquement sur les HPLNEC.B3. Cette observation suggère que la capacité de liaison aux chimiokines est augmentée et qu'en conséquence le recrutement des leucocytes soit amélioré. Cela peut expliquer qu'en flux le recrutement sur les HPLNEC.B3 ne soit pas modifié, alors que plusieurs molécules de surface sont sous-exprimées. La modulation de l'expression de HS par le NO[•] a été mise en évidence dans d'autres types cellulaires. Par exemple, Schmidt *et al.* ont montré que le DETA-NONOate est capable d'augmenter l'incorporation de sulfates dans les protéoglycannes de cellules musculaires lisses, et en conséquence l'expression de l'HS et de la CS²⁵¹. A l'inverse, d'autres auteurs ont montré que le NO[•] diminue l'expression de l'HS^{252,253}. Cependant, dans ces articles, il est difficile de savoir si le taux d'HS à la surface des cellules est bien diminué ou si le GAG est dégradé, comme le suggèrent Ghael *et al.*²⁵⁴. En plus de la formation du gradient chimioattractant, l'HS est capable de lier des facteurs de croissance tels que le VEGF et le FGF2. Cela empêche la dégradation de ces facteurs et favorise leur présentation à leurs récepteurs. En augmentant les niveaux d'HS à la surface des cellules, l'activation par le VEGF, impliquée dans l'angiogenèse, est donc accentuée.

Pour poursuivre cette étude, nous avons dans l'optique d'analyser l'incidence des modifications d'expression des GAGs sur la liaison des chimiokines aux cellules. En effet, le laboratoire a mis en évidence qu'il existe une spécificité de liaison des chimiokines sur chaque GAG. L'HS et la CS ont donc une affinité différente pour une chimiokine donnée, ce qui suggère des rôles très distincts pour

chaque GAG, dans la nature du gradient formé et par conséquent sur les cellules recrutées (étude en cours). En fixant une chimiokine d'intérêt sur des billes fluorescences (par exemple, la 6Ckine, fortement impliquée dans la fonction de « homing » des ganglions lymphatiques périphériques), comme cela a été réalisé au laboratoire lors de la thèse de C.Crola¹¹³, il est possible de quantifier sa liaison et de visualiser l'effet des variations d'expression des GAGs.

Le NO[•] module fortement l'expression des molécules de liaison aux chimiokines et de façon très dépendante du type cellulaire. Dès les plus faibles concentrations, l'expression de plusieurs récepteurs de chimiokines sur la peau est modulée et va dans le sens d'une diminution du recrutement des lymphocytes T et, peut-être, NK. Dans les ganglions lymphatiques, les taux en NO[•] proches de la physiologie augmente l'expression des récepteurs de chimiokines, pour accentuer l'adhésion des lymphocytes T sur l'endothélium et diminuer celui des lymphocytes NK. Dans les deux types cellulaires, l'effet en hypoxie est similaire avec une augmentation de l'expression pour les deux GAGs étudiés:

- l'HS, pour de fortes concentrations de NO[•] et de façon spécifique sur les HPLNEC.B3,
- la CS, dans les deux types cellulaires.

Dans ces deux cas, cela augmente la capacité de liaison des chimiokines aux GAGs, dans le but, peut-être, de contrebalancer la diminution de l'adhésion des CEMT4 sur l'endothélium.

c. Conclusion sur l'impact du NO[•] lors du recrutement leucocytaire

En conclusion, le NO[•] est capable de moduler la réponse immunitaire à plusieurs niveaux: il perturbe l'expression des récepteurs de chimiokines et la formation du gradient chimioattractant, principalement par les modulations des GAGs. En présence de NO[•], la composition en chimiokines dans le microenvironnement est donc différente de celle en condition basale. Cela induit un recrutement leucocytaire modifié. Ensuite, les contacts leucocytes-endothélium sont diminués, par l'inhibition des molécules clefs de cette adhésion. Dans le cas d'une tumeur, cela a pour effet de diminuer le recrutement leucocytaire et par la même les réactions envers la tumeur. Ici, nous confirmons que toutes les modulations induites par le NO[•] sont hautement dépendantes de l'origine de l'endothélium et surtout de la fonction de chaque tissu ; chaque type cellulaire possède donc ses propres mécanismes pour recruter les leucocytes, mais aussi, aider et/ou contrecarrer la progression tumorale.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'angiogenèse et le recrutement leucocytaire sont basés sur des mécanismes similaires. En effet, deux cellules sont attirées l'une vers l'autre, entrent en contact, sont reconnues l'une par l'autre ce qui induit la formation de pseudo-vaisseaux, dans un cas, ou le roulement suivi de la diapédèse, dans l'autre cas. Les molécules clefs de ce processus sont les molécules d'adhésion à la surface des CEs, car elles permettent le contact et une reconnaissance spécifique des deux types cellulaires. Ces processus sont modulés par la présence de NO[•] et le manque en oxygène, particulièrement celui induit au niveau d'une tumeur. Dans ce travail, nous avons montré que le NO[•] et l'hypoxie modulent l'angiogenèse et l'adhésion des leucocytes, par modification de la reconnaissance cellulaire. Ces phénomènes cellulaires sont hautement contrôlés par diverses molécules de surface spécifiques, dont l'expression est également régulée par le NO[•] et l'hypoxie. Dans les conditions hypoxiques, nous avons démontré, dans certains cas, que la production de NO[•] par les NOS est directement responsable des effets observés. Dans les autres cas, une production de NO[•] indépendante des NOS^{7,255} ou un mécanisme distinct est probablement impliqué.

Concernant le rôle du NO[•] sur la reconnaissance cellulaire dans l'angiogenèse et l'adhésion CE-leucocytes, nous avons montré que :

- le NO[•] est indispensable à l'angiogenèse, mais de fortes concentrations inhibent sa formation. PECAM-1/CD31 est une molécule majeure de l'angiogenèse, puisque ces modulations, provoquées par le NO[•] et l'hypoxie, sont directement répercutées sur la formation de pseudo-vaisseaux,
- la reconnaissance CE-leucocytes est, quant à elle, inhibée en présence de NO[•]. Le gradient chimioattractant est perturbé, par une modification de plusieurs molécules de liaison aux chimiokines (CS, HS et CCR5, principalement). Les molécules contrôlant l'adhésion des leucocytes avec l'endothélium sont inhibées. Cependant, il est difficile d'expliquer précisément les modulations observées sur le recrutement uniquement par les molécules d'adhésion testées. D'autres molécules sont donc vraisemblablement impliquées, comme par exemple, les sélectines ou les intégrines.

Le NO[•] est donc capable de modifier l'expression des molécules impliquées dans l'adhésion (CAMs et cadhérines) et de molécules impliquées dans l'activation cellulaire (récepteurs de chimiokines et GAGs), pour moduler des mécanismes cellulaires fondamentaux. De plus, les donneurs de NO[•] responsables de ces variations sont différents selon le type cellulaire. Cela signifie que les

modifications d'expression des molécules de surface sont dépendantes de la concentration locale en NO[•], du flux de NO[•] et de l'origine cellulaire. Nous avons donc montré un nouveau niveau d'organo-spécificité des CEs en réponse au NO[•].

Pour conclure sur ce travail, nous nous sommes replacés dans le contexte du mélanome. A partir d'une certaine taille, la tumeur de la peau est en hypoxie. De plus, le microenvironnement est souvent riche en NO[•], car la croissance et la survie des cellules de mélanome en sont dépendantes²⁵⁶. L'hypoxie intratumorale active l'angiogenèse des CEs, par l'intermédiaire du NO[•], plus particulièrement produit par la NOS2. Ce phénomène est amplifié par la présence de facteurs de croissance endothéliaux dans le microenvironnement tumoral²¹. A l'inverse, les fortes concentrations de NO[•] dans la tumeur inhibent la réorganisation des CEs en pseudo-vaisseaux, très certainement par une diminution de l'expression de PECAM-1/CD31. Ces modulations contradictoires provoquent une formation de vaisseaux chaotiques et perméables, ayant des diamètres irréguliers. Cela explique que le transport de sang et d'oxygène soit souvent inefficace au sein de la tumeur³³. L'adhésion des leucocytes sur l'endothélium de peau est inhibée par le NO[•] et l'hypoxie, le recrutement leucocytaire est donc difficile. L'effet du NO[•] serait dû, d'après notre démonstration, à la diminution du récepteur de chimiokine CCR5 et du GAG CS. Par conséquent, le NO[•] est impliqué dans les mécanismes d'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire anti-tumorale, dans la peau.

Les cellules tumorales migrent vers les ganglions lymphatiques pour former des métastases, peut-être aidées par la surexpression de CCR7 par les faibles concentrations de NO[•] présentes dans l'environnement. Cela favorise l'angiogenèse et la présence des leucocytes dans ce tissu est assez importante, du fait de sa fonction dans le « homing ». Lorsque la tumeur croît, l'hypoxie et le NO[•] sont augmentés. De même que dans la peau, l'angiogenèse devient chaotique. De plus, cela inhibe clairement l'adhésion entre les leucocytes et l'endothélium, peut-être de manière NO[•]-dépendante. Nous avons montré que CD34 et VCAM-1/CD106 sont des candidats responsables de l'inhibition de l'adhésion en hypoxie. Cependant, l'adhésion en flux, mimant le roulement et l'adhésion des leucocytes, n'est pas modifiée quelles que soient les conditions imposées. Cela peut être, en partie, expliqué par une forte augmentation de l'expression de l'HS. Ce GAG est capable de lier la 6Ckine, cytokine fortement impliquée dans le recrutement et la domiciliation des leucocytes dans les ganglions lymphatiques. Au niveau de ce site de métastase, le recrutement des leucocytes ne semble pas diminué.

En conclusion, l'angiogenèse est fortement modifiée aux deux sites de progression du mélanome, alors que le recrutement leucocytaire n'est diminué qu'au niveau de la peau.

Qu'impliquent ces nouvelles informations pour le traitement du mélanome ?

Le mélanome est un cancer extrêmement agressif, hautement métastatique et développant rapidement des résistances aux médicaments. Cela en fait un cancer très difficile à traiter. Les chimiothérapies classiques sont basées sur des agents inducteurs de l'apoptose (dacarbazine, carmustine, paclitaxel, cisplatine) et des activateurs du système immunitaire (IFN γ et interleukine2). Malgré ces traitements, la survie à 5 ans des patients atteints de mélanomes métastatiques est de moins de 15%. Les connaissances sur la voie du NO^{*} lors de mélanomes pourraient donc ouvrir la voie pour de nouvelles thérapies plus efficaces. Par exemple, l'inhibition des NOS, présentes au site de la tumeur, par le N(6)-(1-iminoethyl)-l-lysine-dihydrochloride (L-nil) a récemment montré une action inhibitrice sur le développement *in vivo* des mélanomes. De plus, cet inhibiteur de NOS potentialise l'effet des chimiothérapies classiques²⁵⁷. Le L-nil, comme le LNAME, le LNNA et le 1400w dans notre étude, provoque une diminution de l'angiogenèse, mais Sikora *et al.* démontrent aussi une sensibilisation des cellules tumorales aux agents cytotoxiques²⁵⁷. La réponse immunitaire anti-tumorale pourrait aussi être améliorée en présence d'inhibiteurs de NOS, d'après ce travail de thèse. L'efficacité de la combinaison d'un inhibiteur de NOS avec les chimiothérapies serait donc intéressante à évaluer dans des études cliniques sur le mélanome.

Ces dernières années, le concept de normalisation a émergé⁴. Il s'agit d'améliorer la diffusion des chimiothérapies en favorisant une vascularisation efficace, au site tumoral. Alors que la NOS2 est souvent surexprimée et produit de fortes concentrations de NO^{*} dans les mélanomes, une inhibition modérée de cette production permettrait de se retrouver dans des conditions optimales pour l'angiogenèse (concentration de NO^{*} moyenne). Ainsi, la vascularisation tumorale serait normalisée, ce qui améliorerait le transport des chimiothérapies au site de la tumeur.

En conséquence, que ce soit en diminuant ou inhibant totalement les productions de NO^{*}, cette stratégie thérapeutique, bien que peu utilisée jusqu'alors, pourrait être un intéressant complément des chimiothérapies classiques ou futures, telles qu'avec le PLX4032²⁵⁸ ou l'Ipilimumab²⁵⁹.

Pour compléter et poursuivre ce travail, nous souhaitons continuer notre étude sur l'angiogenèse en travaillant dans un modèle tridimensionnel de formation de pseudo-vaisseaux. Pour ce faire, certaines expérimentations consistent à resuspendre des CEs dans un gel de collagène, ce qui permet de visualiser la migration, l'élongation et la vacuolisation des CEs⁷³. Dans une autre technique, les CEs sontensemencées sur des microbilles dans un gel de fibrine. Après plusieurs jours de culture, des pseudo-vaisseaux bourgeonnent à partir de la microbille. Enfin, dans une expérimentation plus complète et plus proche de la physiologie, des sphéroïdes comportant des cellules tumorales de mélanomes sont cultivés dans un gel de collagène ou de méthylcellulose. La

migration des CEs vers le sphéroïde, puis l'organisation en pseudo-vaisseaux est observée en temps réel en microscopie. Ces deux dernières techniques sont d'ailleurs utilisées au laboratoire et pourraient nous permettre de vérifier les modulations par le NO[•] et l'hypoxie observées sur MatrigelTM, avant de passer à un modèle de mélanome *in vivo*.

D'autre part, d'autres molécules d'adhésion pourraient être étudiées. Par exemple, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est fortement impliquée dans l'angiogenèse²⁶⁰ et dans le cadre du mélanome¹². Plusieurs auteurs ont déjà proposés une régulation de l'expression de cette intégrine par le NO[•]^{261,262}.

Ensuite, il nous semble important de finaliser les expérimentations sur le recrutement leucocytaire en définissant quelles autres molécules d'adhésion sont impliquées dans sa modulation par le NO[•] et l'hypoxie. Les sélectines et les intégrines doivent être étudiées.

Dans cette étude, nous avons montré que les GAGs sont modulés par le NO[•]. Par exemple, il serait intéressant d'étudier l'augmentation de l'expression de l'HS sur les HPLNEC.B3 et déterminer si elle est suivie par une liaison accrue aux chimiokines ou au VEGF. En liant ces molécules solubles sur des billes fluorescentes, nous pourrions suivre leur liaison sur les HPLNEC.B3 en utilisant le système de flux, comme cela a été réalisé au laboratoire lors de la thèse de Claire Crola¹¹³, et la mettre en parallèle avec le recrutement des leucocytes.

Cette étude pourrait être complétée par l'analyse des chimiokines (6Ckine, RANTES...) et facteurs de croissance sécrétés par les HSkMEC et HPLNEC.B3, en présence des donneurs de NO[•] et en hypoxie. Ceci a pour but d'avoir une vision plus complète de notre système et de mieux expliquer les modulations de l'angiogenèse et du recrutement leucocytaire.

Enfin, les modulations observées doivent être confirmées après irradiations par des UV des CEs et/ou en co-culture en présence de cellules de mélanome, pour se rapprocher des conditions tumorales.

A plus long terme, nous envisageons d'élargir ce travail en étudiant de nouvelles familles de protéines modulées par le NO[•], en utilisant les puces à ADN et la plateforme GENOTRANS du CNRS d'Orléans.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. **Institut National Du Cancer.** La situation du cancer en France en 2009. (2009).
2. **J Ferlay, H Shin, F Bray, D Forman, C Mathers & D Parkin.** *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]*. (International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2010).à <<http://globocan.iarc.fr>>
3. **N Ferrara, KJ Hillan, H Gerber & W Novotny.** Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 391-400 (2004).
4. **RK Jain.** Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nat Med* **7**, 987-989 (2001).
5. **C Kieda, R Greferath, C Crola da Silva, KC Fylaktakidou, J Lehn & C Nicolau.** Suppression of hypoxia-induced HIF-1alpha and of angiogenesis in endothelial cells by myo-inositol trispyrophosphate-treated erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 15576-15581 (2006).
6. **F Coulet, S Nadaud, M Agrapart & F Soubrier.** Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J. Biol. Chem* **278**, 46230-46240 (2003).
7. **C Gautier, E van Faassen, I Mikula, P Martasek & A Slama-Schwok.** Endothelial nitric oxide synthase reduces nitrite anions to NO under anoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **341**, 816-821 (2006).
8. **T Nobori, K Miura, DJ Wu, A Lois, K Takabayashi & DA Carson.** Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368**, 753-756 (1994).
9. **S MacNeil.** Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* **445**, 874-880 (2007).
10. **NK Haass, KSM Smalley & M Herlyn.** The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J. Mol. Histol* **35**, 309-318 (2004).
11. **V Gray-Schopfer, C Wellbrock & R Marais.** Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**, 851-857 (2007).
12. **AJ Miller & MC Mihm.** Melanoma. *N. Engl. J. Med* **355**, 51-65 (2006).
13. **P Carmeliet & RK Jain.** Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257 (2000).
14. **J Folkman.** Angiogenesis. *Annu. Rev. Med* **57**, 1-18 (2006).
15. **E Goldmann.** The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *The Lancet* **170**, 1236-1240 (1907).
16. **M Greenblatt & P Shubi.** Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl. Cancer Inst* **41**, 111-124 (1968).
17. **RL Ehrmann & M Knoth.** Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J. Natl. Cancer Inst* **41**, 1329-1341 (1968).
18. **J Folkman.** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med* **285**, 1182-1186 (1971).
19. **MA Gimbrone, RS Cotran & J Folkman.** Endothelial regeneration: studies with human endothelial cells in culture. *Ser Haematol* **6**, 453-455 (1973).
20. **J Firth.** Endothelial barriers: from hypothetical pores to membrane proteins. *J. Anat*

- 200, 524-525 (2002).
21. **DA Cheresh & DG Stupack.** Regulation of angiogenesis: apoptotic cues from the ECM. *Oncogene* **27**, 6285-6298 (2008).
 22. **J Folkman.** What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst* **82**, 4-6 (1990).
 23. **R Kerbel & J Folkman.** Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 727-739 (2002).
 24. **CW Pugh & PJ Ratcliffe.** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med* **9**, 677-684 (2003).
 25. **S North, M Moenner & A Bikfalvi.** Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett* **218**, 1-14 (2005).
 26. **R Kalluri.** Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 422-433 (2003).
 27. **S Weis, J Cui, L Barnes & D Cheresh.** Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J. Cell Biol* **167**, 223-229 (2004).
 28. **H Gerhardt, M Golding, M Fruttiger, C Ruhrberg, A Lundkvist, A Abramsson, M Jeltsch, C Mitchell, K Alitalo, D Shima & C Betsholtz.** VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol* **161**, 1163-1177 (2003).
 29. **AW Griffioen & G Molema.** Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev* **52**, 237-268 (2000).
 30. **DA Cheresh.** Integrins: Structure, Function, and Biological Properties. *Extracellular Matrix* **6**, 225-252 (1993).
 31. **P Carmeliet.** Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med* **9**, 653-660 (2003).
 32. **J Folkman.** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med* **1**, 27-31 (1995).
 33. **RK Jain.** Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med* **9**, 685-693 (2003).
 34. **RK Jain & LL Munn.** Leaky vessels? Call Ang1! *Nat. Med* **6**, 131-132 (2000).
 35. **D Fukumura, S Kashiwagi & RK Jain.** The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 521-534 (2006).
 36. **P Salven, S Mustjoki, R Alitalo, K Alitalo & S Rafii.** VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* **101**, 168-172 (2003).
 37. **B Garmy-Susini & JA Varner.** Circulating endothelial progenitor cells. *Br. J. Cancer* **93**, 855-858 (2005).
 38. **S Fukuhara, K Sako, T Minami, K Noda, HZ Kim, T Kodama, M Shibuya, N Takakura, GY Koh & N Mochizuki.** Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat. Cell Biol* **10**, 513-526 (2008).
 39. **P Saharinen, L Eklund, J Miettinen, R Wirkkala, A Anisimov, M Winderlich, A Nottebaum, D Vestweber, U Deutsch, GY Koh, BR Olsen & K Alitalo.** Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat. Cell Biol* **10**, 527-537 (2008).
 40. **C Porta, B Subhra Kumar, P Larghi, L Rubino, A Mancino & A Sica.** Tumor promotion by tumor-associated macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol* **604**, 67-86 (2007).
 41. **P Allavena, A Sica, G Solinas, C Porta & A Mantovani.** The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol* **66**, 1-9 (2008).
 42. **OE Franco, AK Shaw, DW Strand & SW Hayward.** Cancer associated fibroblasts in

- cancer pathogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol* **21**, 33-39 (2010).
43. **K Pietras & A Ostman.** Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res* **316**, 1324-1331 (2010).
 44. **P Carmeliet.** Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932-936 (2005).
 45. **LE Huang, J Gu, M Schau & HF Bunn.** Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 7987-7992 (1998).
 46. **D Liao & RS Johnson.** Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 281-290 (2007).
 47. **RK Bruick.** Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev* **17**, 2614-2623 (2003).
 48. **HE Ryan, J Lo & RS Johnson.** HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* **17**, 3005-3015 (1998).
 49. **PH Maxwell, GU Dachs, JM Gleadle, LG Nicholls, AL Harris, IJ Stratford, O Hankinson, CW Pugh & PJ Ratcliffe.** Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 8104-8109 (1997).
 50. **D Liao, C Corle, TN Seagroves & RS Johnson.** Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* **67**, 563-572 (2007).
 51. **N Tang, L Wang, J Esko, FJ Giordano, Y Huang, H Gerber, N Ferrara & RS Johnson.** Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* **6**, 485-495 (2004).
 52. **M Milkiewicz, E Ispanovic, JL Doyle & TL Haas.** Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **38**, 333-357 (2006).
 53. **H Abedi & I Zachary.** Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J. Biol. Chem* **272**, 15442-15451 (1997).
 54. **BQ Shen, DY Lee & TF Zioncheck.** Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J. Biol. Chem* **274**, 33057-33063 (1999).
 55. **HP Gerber, A McMurtrey, J Kowalski, M Yan, BA Keyt, V Dixit & N Ferrara.** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem* **273**, 30336-30343 (1998).
 56. **GD Thakker, DP Hajjar, WA Muller & TK Rosengart.** The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Biol. Chem* **274**, 10002-10007 (1999).
 57. **LL Thomsen & DW Miles.** Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev* **17**, 107-118 (1998).
 58. **B Fitzpatrick, M Mehibel, RL Cowen & IJ Stratford.** iNOS as a therapeutic target for treatment of human tumors. *Nitric Oxide* **19**, 217-224 (2008).
 59. **DC Jenkins, IG Charles, LL Thomsen, DW Moss, LS Holmes, SA Baylis, P Rhodes, K Westmore, PC Emson & S Moncada.** Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**, 4392-4396 (1995).
 60. **S Davis, TH Aldrich, PF Jones, A Acheson, DL Compton, V Jain, TE Ryan, J Bruno, C Radziejewski, PC Maisonpierre & GD Yancopoulos.** Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-1169 (1996).

61. **PC Maisonpierre, C Suri, PF Jones, S Bartunkova, SJ Wiegand, C Radziejewski, D Compton, J McClain, TH Aldrich, N Papadopoulos, TJ Daly, S Davis, TN Sato & GD Yancopoulos.** Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60 (1997).
62. **DC Felmeden, AD Blann & GYH Lip.** Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur. Heart J* **24**, 586-603 (2003).
63. **MA Nugent & RV Iozzo.** Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **32**, 115-120 (2000).
64. **MD Sternlicht & Z Werb.** How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **17**, 463-516 (2001).
65. **M Fini, J Cook, C Brinckerhoff & R Mohan.** Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Matrix Metalloproteinases* pp. 299-356 (1998).
66. **L Yan, S Zucker & BP Toole.** Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb. Haemost* **93**, 199-204 (2005).
67. **C Francavilla, L Maddaluno & U Cavallaro.** The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Semin. Cancer Biol* (2009).doi:10.1016/j.semcancer.2009.05.004
68. **PJ Newman, MC Berndt, J Gorski, GC White, S Lyman, C Paddock & WA Muller.** PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* **247**, 1219-1222 (1990).
69. **SM Albelda, PD Oliver, LH Romer & CA Buck.** EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol* **110**, 1227-1237 (1990).
70. **SM Albelda, WA Muller, CA Buck & PJ Newman.** Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol* **114**, 1059-1068 (1991).
71. **E Ferrero, ME Ferrero, R Pardi & MR Zocchi.** The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS Lett* **374**, 323-326 (1995).
72. **LA Schimmenti, HC Yan, JA Madri & SM Albelda.** Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, modulates cell migration. *J. Cell. Physiol* **153**, 417-428 (1992).
73. **S Yang, J Graham, JW Kahn, EA Schwartz & ME Gerritsen.** Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am. J. Pathol* **155**, 887-895 (1999).
74. **CS Kim, T Wang & JA Madri.** Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression modulates endothelial cell migration in vitro. *Lab. Invest* **78**, 583-590 (1998).
75. **HM DeLisser, M Christofidou-Solomidou, RM Strieter, MD Burdick, CS Robinson, RS Wexler, JS Kerr, C Garlanda, JR Merwin, JA Madri & SM Albelda.** Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am. J. Pathol* **151**, 671-677 (1997).
76. **Z Zhou, M Christofidou-Solomidou, C Garlanda & HM DeLisser.** Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis* **3**, 181-188 (1999).
77. **MS Diamond, DE Staunton, SD Marlin & TA Springer.** Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**, 961-971 (1991).
78. **MW Makgoba, ME Sanders, GE Ginther Luce, ML Dustin, TA Springer, EA Clark, P Mannoni & S Shaw.** ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature* **331**, 86-88 (1988).
79. **O Carpen, P Pallai, DE Staunton & TA Springer.** Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin. *J. Cell Biol* **118**, 1223-1234 (1992).

80. **IA Romero, CL Amos, J Greenwood & P Adamson.** Ezrin and moesin co-localise with ICAM-1 in brain endothelial cells but are not directly associated. *Brain Res. Mol. Brain Res* **105**, 47-59 (2002).
81. **O Barreiro, M Yanez-Mo, JM Serrador, MC Montoya, M Vicente-Manzanares, R Tejedor, H Furthmayr & F Sanchez-Madrid.** Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J. Cell Biol* **157**, 1233-1245 (2002).
82. **CV Carman & TA Springer.** A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol* **167**, 377-388 (2004).
83. **U Gotsch, E Borges, R Bosse, E Böggemeyer, M Simon, H Mossmann & D Vestweber.** VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell. Sci* **110 (Pt 5)**, 583-588 (1997).
84. **N Matsuyoshi, K Toda, Y Horiguchi, T Tanaka, S Nakagawa, M Takeichi & S Imamura.** In vivo evidence of the critical role of cadherin-5 in murine vascular integrity. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **109**, 362-371 (1997).
85. **D Vestweber.** VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **28**, 223-232 (2008).
86. **M Poupon.** Biologie des métastases des cancers. *Bull Cancer* **93**, 165-174 (2006).
87. **RL Klemke, M Yebra, EM Bayna & DA Cheresh.** Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin alpha v beta 5-directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J. Cell Biol* **127**, 859-866 (1994).
88. **H Dutrochet.** *Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux et sur leur motilité.* (J. B. Baillière: Paris, 1824).
89. **K Ley, C Laudanna, MI Cybulsky & S Nourshargh.** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol* **7**, 678-689 (2007).
90. **GS Kansas.** Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* **88**, 3259-3287 (1996).
91. **JJ Campbell, J Hedrick, A Zlotnik, MA Siani, DA Thompson & EC Butcher.** Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**, 381-384 (1998).
92. **Z Johnson, AE Proudfoot & TM Handel.** Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 625-636 (2005).
93. **C Laudanna, JY Kim, G Constantin & E Butcher.** Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol. Rev* **186**, 37-46 (2002).
94. **AR Schenkel, Z Mamdouh & WA Muller.** Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat. Immunol* **5**, 393-400 (2004).
95. **SK Shaw, PS Bamba, BN Perkins & FW Luscinskas.** Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J. Immunol* **167**, 2323-2330 (2001).
96. **WA Muller.** Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* **24**, 327-334 (2003).
97. **AJ Huang, JE Manning, TM Bandak, MC Ratau, KR Hanser & SC Silverstein.** Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J. Cell Biol* **120**, 1371-1380 (1993).
98. **J Millán, L Hewlett, M Glyn, D Toomre, P Clark & AJ Ridley.** Lymphocyte

- transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat. Cell Biol* **8**, 113-123 (2006).
99. **AM Dvorak & D Feng.** The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J. Histochem. Cytochem* **49**, 419-432 (2001).
 100. **PJ Newman & DK Newman.** Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **23**, 953-964 (2003).
 101. **C Kneuer, C Ehrhardt, MW Radomski & U Bakowsky.** Selectins--potential pharmacological targets? *Drug Discov. Today* **11**, 1034-1040 (2006).
 102. **SD Rosen.** Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol* **22**, 129-156 (2004).
 103. **A Suzuki, DP Andrew, JA Gonzalo, M Fukumoto, J Spellberg, M Hashiyama, H Takimoto, N Gerwin, I Webb, G Molineux, R Amakawa, Y Tada, A Wakeham, J Brown, I McNiece, K Ley, EC Butcher, T Suda, JC Gutierrez-Ramos & TW Mak.** CD34-deficient mice have reduced eosinophil accumulation after allergen exposure and show a novel crossreactive 90-kD protein. *Blood* **87**, 3550-3562 (1996).
 104. **E Sans, E Delachanal & A Duperray.** Analysis of the roles of ICAM-1 in neutrophil transmigration using a reconstituted mammalian cell expression model: implication of ICAM-1 cytoplasmic domain and Rho-dependent signaling pathway. *J. Immunol* **166**, 544-551 (2001).
 105. **RA Carter & IP Wicks.** Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis Rheum* **44**, 985-994 (2001).
 106. **S Nakao, T Kuwano, T Ishibashi, M Kuwano & M Ono.** Synergistic effect of TNF-alpha in soluble VCAM-1-induced angiogenesis through alpha 4 integrins. *J. Immunol* **170**, 5704-5711 (2003).
 107. **JD van Buul, E Kanters & PL Hordijk.** Endothelial signaling by Ig-like cell adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **27**, 1870-1876 (2007).
 108. **M Huang, JC Mason, GM Birdsey, V Amsellem, N Gerwin, DO Haskard, AJ Ridley & AM Randi.** Endothelial intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 regulates angiogenesis. *Blood* **106**, 1636-1643 (2005).
 109. **WA Muller, SA Weigl, X Deng & DM Phillips.** PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med* **178**, 449-460 (1993).
 110. **S Bogen, J Pak, M Garifallou, X Deng & WA Muller.** Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J. Exp. Med* **179**, 1059-1064 (1994).
 111. **AR Schenkel, Z Mamdouh, X Chen, RM Liebman & WA Muller.** CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol* **3**, 143-150 (2002).
 112. **B Combadière, C Combadière & P Deterre.** [Chemokines: a sophisticated cell-guidance network]. *Med Sci (Paris)* **23**, 173-179 (2007).
 113. **C Crola Da Silva, N Lamerant-Fayel, M Paprocka, M Mitterrand, D Gosset, D Dus & C Kieda.** Selective human endothelial cell activation by chemokines as a guide to cell homing. *Immunology* **126**, 394-404 (2009).
 114. **PM Murphy.** Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat. Immunol* **2**, 116-122 (2001).
 115. **A Müller, B Homey, H Soto, N Ge, D Catron, ME Buchanan, T McClanahan, E Murphy, W Yuan, SN Wagner, JL Barrera, A Mohar, E Verástegui & A Zlotnik.** Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50-56 (2001).
 116. **HE Wiley, EB Gonzalez, W Maki, MT Wu & ST Hwang.** Expression of CC

- chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J. Natl. Cancer Inst* **93**, 1638-1643 (2001).
117. **A Muehlhoefer, LJ Saubermann, X Gu, K Luedtke-Heckenkamp, R Xavier, RS Blumberg, DK Podolsky, RP MacDermott & HC Reinecker.** Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J. Immunol* **164**, 3368-3376 (2000).
 118. **S Jung, J Aliberti, P Graemmel, MJ Sunshine, GW Kreutzberg, A Sher & DR Littman.** Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol* **20**, 4106-4114 (2000).
 119. **B Combadière, S Faure, B Autran, P Debré & C Combadière.** The chemokine receptor CX3CR1 controls homing and anti-viral potencies of CD8 effector-memory T lymphocytes in HIV-infected patients. *AIDS* **17**, 1279-1290 (2003).
 120. **CA Haskell, WW Hancock, DJ Salant, W Gao, V Csizmadia, W Peters, K Faia, O Futuri, JB Rottman & IF Charo.** Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection. *J. Clin. Invest* **108**, 679-688 (2001).
 121. **M Ohta, F Tanaka, H Yamaguchi, N Sadanaga, H Inoue & M Mori.** The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients. *Int. J. Oncol* **26**, 41-47 (2005).
 122. *Encyclopedia of Life Sciences.* (John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2001).à <<http://mrw.interscience.wiley.com.gate1.inist.fr/emrw/9780470015902/els/article/a0000933/current/html?hd%3DAI%2Cchemokines>>
 123. **JA Burger & TJ Kipps.** CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* **107**, 1761-1767 (2006).
 124. **G Lazennec & A Richmond.** Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* **16**, 133-144 (2010).
 125. **F Balkwill.** The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin. Cancer Biol* **14**, 171-179 (2004).
 126. **VIF Slettenaar & JL Wilson.** The chemokine network: a target in cancer biology? *Adv. Drug Deliv. Rev* **58**, 962-974 (2006).
 127. **T Murakami, W Maki, AR Cardones, H Fang, A Tun Kyi, FO Nestle & ST Hwang.** Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res* **62**, 7328-7334 (2002).
 128. *Encyclopedia of Life Sciences.* (John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2001).à <<http://mrw.interscience.wiley.com.gate1.inist.fr/emrw/9780470015902/els/article/a0000623/current/html>>
 129. **T Netelenbos, S Zuijderduijn, J Van Den Born, FL Kessler, S Zweegman, PC Huijgens & AM Dräger.** Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. *J. Leukoc. Biol* **72**, 353-362 (2002).
 130. **J Yang, MA Price, CL Neudauer, C Wilson, S Ferrone, H Xia, J Iida, MA Simpson & JB McCarthy.** Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J. Cell Biol* **165**, 881-891 (2004).
 131. **SE Stringer.** The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans* **34**, 451-453 (2006).
 132. **CA Kirkpatrick & SB Selleck.** Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *J. Cell. Sci* **120**, 1829-1832 (2007).
 133. **AEI Proudfoot, TM Handel, Z Johnson, EK Lau, P LiWang, I Clark-Lewis, F Borlat, TNC Wells & MH Kosco-Vilbois.** Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 1885-1890 (2003).
 134. **CR Parish.** The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat. Rev. Immunol* **6**, 633-643

- (2006).
135. **GW Yip, M Smollich & M Götte.** Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol. Cancer Ther* **5**, 2139-2148 (2006).
 136. *Encyclopedia of Life Sciences.* (John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2001).à <<http://mrw.interscience.wiley.com.gate1.inist.fr/emrw/9780470015902/els/article/a0000704/current/html?hd=All,glycosaminoglycan>>
 137. **E Culotta & D Koshland.** NO news is good news. *Science* **258**, 1862-1865 (1992).
 138. **J Wood & J Garthwaite.** Models of the diffusional spread of nitric oxide: Implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* **33**, 1235-1244 (1994).
 139. **DJ Stuehr, NS Kwon, CF Nathan, OW Griffith, PL Feldman & J Wiseman.** N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem* **266**, 6259-6263 (1991).
 140. **F Aktan.** iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* **75**, 639-653 (2004).
 141. **MK Richards & MA Marletta.** Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. *Biochemistry* **33**, 14723-14732 (1994).
 142. **K McMillan & BS Masters.** Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry* **34**, 3686-3693 (1995).
 143. **DK Ghosh, HM Abu-Soud & DJ Stuehr.** Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase. *Biochemistry* **34**, 11316-11320 (1995).
 144. **OW Griffith & DJ Stuehr.** Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol* **57**, 707-736 (1995).
 145. **E Schulz, T Jansen, P Wenzel, A Daiber & T Münzel.** Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid. Redox Signal* **10**, 1115-1126 (2008).
 146. **M Bréard & C Grillon.** Serotonin binds to purified neuronal nitric oxide synthase: a possible explanation for ROS production induced by 5HT in the presence of nNOS. *Free Radic. Res* **43**, 206-213 (2009).
 147. **W Xu, IG Charles, S Moncada, P Gorman, D Sheer, L Liu & P Emson.** Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. *Genomics* **21**, 419-422 (1994).
 148. **J MacMicking, Q Xie & C Nathan.** NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323-350 (1997).
 149. **M Lechner, P Lirk & J Rieder.** Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin. Cancer Biol* **15**, 277-289 (2005).
 150. **C Nathan.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6**, 3051-3064 (1992).
 151. **CR Ferreira, AC Chagas, MH Carvalho, AP Dantas, MB Jatene, LC Bento De Souza & P Lemos Da Luz.** Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. *Circulation* **103**, 2272-2276 (2001).
 152. **B Bonavida, S Khineche, S Huerta-Yepez & H Garbán.** Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. *Drug Resist. Updat* **9**, 157-173 (2006).
 153. **O Feron & J Balligand.** Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide

- synthase in the heart. *Cardiovasc. Res* **69**, 788-797 (2006).
154. **DM Dudzinski & T Michel.** Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc. Res* **75**, 247-260 (2007).
 155. **H Strijdom, SO Friedrich, S Hattingh, N Chamane & A Lochner.** Hypoxia-induced regulation of nitric oxide synthase in cardiac endothelial cells and myocytes and the role of the PI3-K/PKB pathway. *Mol. Cell. Biochem* **321**, 23-35 (2009).
 156. **T Presley, K Vedam, M Velayutham, JL Zweier & G Ilangoan.** Activation of Hsp90-eNOS and increased NO generation attenuate respiration of hypoxia-treated endothelial cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* **295**, C1281-1291 (2008).
 157. **I Mikula, S Durocher, P Martasek, B Mutus & A Slama-Schwok.** Isoform-specific differences in the nitrite reductase activity of nitric oxide synthases under hypoxia. *Biochem. J* **418**, 673-682 (2009).
 158. **ER Derbyshire & MA Marletta.** Biochemistry of soluble guanylate cyclase. *Handb Exp Pharmacol* 17-31 (2009).doi:10.1007/978-3-540-68964-5_2
 159. **NV Blough & OC Zafiriou.** Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorganic Chemistry* **24**, 3502-3504 (1985).
 160. **JS Beckman, TW Beckman, J Chen, PA Marshall & BA Freeman.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **87**, 1620-1624 (1990).
 161. **JS Beckman, H Ischiropoulos, L Zhu, M van der Woerd, C Smith, J Chen, J Harrison, JC Martin & M Tsai.** Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys* **298**, 438-445 (1992).
 162. **DT Hess, A Matsumoto, S Kim, HE Marshall & JS Stamler.** Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **6**, 150-166 (2005).
 163. **PA Erwin, AJ Lin, DE Golan & T Michel.** Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem* **280**, 19888-19894 (2005).
 164. **SA Waldman & F Murad.** Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **12 Suppl 5**, S115-118 (1988).
 165. **MW Radomski, RMJ Palmer & S Moncada.** ENDOGENOUS NITRIC OXIDE INHIBITS HUMAN PLATELET ADHESION TO VASCULAR ENDOTHELIUM. *The Lancet* **330**, 1057-1058 (1987).
 166. **PM Bath.** The effect of nitric oxide-donating vasodilators on monocyte chemotaxis and intracellular cGMP concentrations in vitro. *Eur. J. Clin. Pharmacol* **45**, 53-58 (1993).
 167. **P Ascenzi, A Bocedi & L Gradoni.** The anti-parasitic effects of nitric oxide. *IUBMB Life* **55**, 573-578 (2003).
 168. **AJ Duncan & SJR Heales.** Nitric oxide and neurological disorders. *Mol. Aspects Med* **26**, 67-96 (2005).
 169. **S Ekmekcioglu, JA Ellerhorst, VG Prieto, MM Johnson, LD Broemeling & EA Grimm.** Tumor iNOS predicts poor survival for stage III melanoma patients. *Int. J. Cancer* **119**, 861-866 (2006).
 170. **JO Lundberg & E Weitzberg.** NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **25**, 915-922 (2005).
 171. **JK Selkirk.** Chemical carcinogenesis: a brief overview of the mechanism of action of polycyclic hydrocarbons, aromatic amines, nitrosamines, and aflatoxins. *Carcinog Compr Surv* **5**, 1-31 (1980).
 172. **T Nguyen, D Brunson, CL Crespi, BW Penman, JS Wishnok & SR Tannenbaum.** DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 3030-3034 (1992).

173. **SR Tannenbaum, S Tamir & T Walker.** DNA damage and cytotoxicity by nitric oxide. *Nitrosamines and related N-nitroso compounds chemistry and biochemistry* pp 120–135 (1994).
174. **DA Wink & J Laval.** The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **15**, 2125-2129 (1994).
175. **F Laval, DA Wink & J Laval.** A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* **131**, 175-191 (1997).
176. **MK Jones, K Tsugawa, AS Tarnawski & D Baatar.** Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **318**, 520-528 (2004).
177. **A Papapetropoulos, G García-Cardeña, JA Madri & WC Sessa.** Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest* **100**, 3131-3139 (1997).
178. **J Dulak, A Józkowicz, A Dembinska-Kiec, I Guevara, A Zdzienicka, D Zmudzinska-Grochot, I Florek, A Wójtowicz, A Szuba & JP Cooke.** Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **20**, 659-666 (2000).
179. **BV Khan, DG Harrison, MT Olbrych, RW Alexander & RM Medford.** Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 9114-9119 (1996).
180. **D Wong, R Prameya, V Wu, K Dorovini-Zis & SR Vincent.** Nitric oxide reduces T lymphocyte adhesion to human brain microvessel endothelial cells via a cGMP-dependent pathway. *Eur. J. Pharmacol* **514**, 91-98 (2005).
181. **R De Caterina, P Libby, HB Peng, VJ Thannickal, TB Rajavashisth, MA Gimbrone, WS Shin & JK Liao.** Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J. Clin. Invest* **96**, 60-68 (1995).
182. **M Spiecker, H Darius, K Kaboth, F Hübner & JK Liao.** Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J. Leukoc. Biol* **63**, 732-739 (1998).
183. **B Wang, D Wei, VE Crum, EL Richardson, HH Xiong, Y Luo, S Huang, JL Abbruzzese & K Xie.** A novel model system for studying the double-edged roles of nitric oxide production in pancreatic cancer growth and metastasis. *Oncogene* **22**, 1771-1782 (2003).
184. **N Gauthier, S Lohm, C Touzery, A Chantôme, B Perette, S Reveneau, F Brunotte, L Juillerat-Jeanneret & J Jeannin.** Tumour-derived and host-derived nitric oxide differentially regulate breast carcinoma metastasis to the lungs. *Carcinogenesis* **25**, 1559-1565 (2004).
185. **M Yabuki, S Kariya, Y Inai, K Hamazaki, T Yoshioka, T Yasuda, AA Horton & K Utsumi.** Molecular mechanisms of apoptosis in HL-60 cells induced by a nitric oxide-releasing compound. *Free Radic. Res* **27**, 325-335 (1997).
186. **UK Messmer & B Brüne.** Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem. J* **319** (Pt 1), 299-305 (1996).
187. **DD Thomas, MG Espey, LA Ridnour, LJ Hofseth, D Mancardi, CC Harris & DA Wink.** Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 8894-8899 (2004).
188. **LA Ridnour, DD Thomas, S Donzelli, MG Espey, DD Roberts, DA Wink & JS**

- Isenberg.** The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. *Antioxid. Redox Signal* **8**, 1329-1337 (2006).
189. **K Xie, S Huang, Z Dong, M Gutman & IJ Fidler.** Direct correlation between expression of endogenous inducible nitric oxide synthase and regression of M5076 reticulum cell sarcoma hepatic metastases in mice treated with liposomes containing lipopeptide CGP 31362. *Cancer Res* **55**, 3123-3131 (1995).
 190. **P Edwards, JC Cendan, DB Topping, LL Moldawer, S MacKay, Copeland EMIII & DS Lind.** Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth in vitro, but stimulates tumorigenesis and experimental lung metastasis in vivo. *J. Surg. Res* **63**, 49-52 (1996).
 191. **MN Soler, P Bobé, K Benihoud, G Lemaire, BA Roos & S Lausson.** Gene therapy of rat medullary thyroid cancer by naked nitric oxide synthase II DNA injection. *J Gene Med* **2**, 344-352 (2000).
 192. **W Xu, L Liu & IG Charles.** Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice. *FASEB J* **16**, 213-215 (2002).
 193. **JB Mitchell, DA Wink, W DeGraff, J Gamson, LK Keefer & MC Krishna.** Hypoxic mammalian cell radiosensitization by nitric oxide. *Cancer Res* **53**, 5845-5848 (1993).
 194. **Z Wang, T Cook, S Alber, K Liu, I Kovesdi, SK Watkins, Y Vodovotz, TR Billiar & D Blumberg.** Adenoviral gene transfer of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances the radiation response of human colorectal cancer associated with alterations in tumor vascularity. *Cancer Res* **64**, 1386-1395 (2004).
 195. **RK Jain.** Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**, 58-62 (2005).
 196. **M Weis, C Heeschen, AJ Glassford & JP Cooke.** Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* **105**, 739-745 (2002).
 197. **AW Bak, W McKnight, P Li, P Del Soldato, A Calignano, G Cirino & JL Wallace.** Cyclooxygenase-independent chemoprevention with an aspirin derivative in a rat model of colonic adenocarcinoma. *Life Sci* **62**, PL 367-373 (1998).
 198. **C Perrotta, L Bizzozero, S Falcone, P Rovere-Querini, A Prinetti, EH Schuchman, S Sonnino, AA Manfredi & E Clementi.** Nitric oxide boosts chemoimmunotherapy via inhibition of acid sphingomyelinase in a mouse model of melanoma. *Cancer Res* **67**, 7559-7564 (2007).
 199. **L Postovit, MA Adams, GE Lash, JPW Heaton & CH Graham.** Nitric oxide-mediated regulation of hypoxia-induced B16F10 melanoma metastasis. *Int. J. Cancer* **108**, 47-53 (2004).
 200. **G Kennovin, D Hirst, M Stratford & F Flitney.** Inducible nitric oxide synthase is expressed in tumor-associated vasculature: inhibition retards tumor in vivo. *Biology of Nitric Oxide* pp 473-479 (1994).
 201. **O Gallo, E Masini, L Morbidelli, A Franchi, I Fini-Storchi, WA Vergari & M Ziche.** Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst* **90**, 587-596 (1998).
 202. **LC Jadeski & PK Lala.** Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am. J. Pathol* **155**, 1381-1390 (1999).
 203. **LL Thomsen, JM Scott, P Topley, RG Knowles, AJ Keerie & AJ Frend.** Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a novel inhibitor. *Cancer Res* **57**, 3300-3304 (1997).
 204. **A Brouet, J DeWever, P Martinive, X Havaux, C Bouzin, P Sonveaux & O Feron.** Antitumor effects of in vivo caveolin gene delivery are associated with the inhibition of the proangiogenic and vasodilatory effects of nitric oxide. *FASEB J* **19**, 602-604 (2005).
 205. **C Kieda, M Paprocka, A Krawczenko, P Zalecki, P Dupuis, M Monsigny, C**

- Radzikowski & D Duś.** New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium* **9**, 247-261 (2002).
206. **GA Blaise, D Gauvin, M Gangal & S Authier.** Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* **208**, 177-192 (2005).
207. **I Arnaoutova, J George, HK Kleinman & G Benton.** The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* **12**, 267-274 (2009).
208. **A Bikfalvi, EM Cramer, D Tenza & G Tobelem.** Phenotypic modulations of human umbilical vein endothelial cells and human dermal fibroblasts using two angiogenic assays. *Biol. Cell* **72**, 275-278 (1991).
209. **S BOYDEN.** The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med* **115**, 453-466 (1962).
210. **A Carreau, C Kieda & C Grillon.** Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Exp Cell Res in press*, (2010).
211. **MW Chang, J Grillari, C Mayrhofer, K Fortschegger, G Allmaier, G Marzban, H Katinger & R Voglauer.** Comparison of early passage, senescent and hTERT immortalized endothelial cells. *Exp. Cell Res* **309**, 121-136 (2005).
212. **E Venetsanakos, A Mirza, C Fanton, SR Romanov, T Tlsty & M McMahon.** Induction of tubulogenesis in telomerase-immortalized human microvascular endothelial cells by glioblastoma cells. *Exp. Cell Res* **273**, 21-33 (2002).
213. **Y Baumer, D Funk & B Schlosshauer.** Does telomerase reverse transcriptase induce functional de-differentiation of human endothelial cells? *Cell Mol Life Sci* (2010).doi:10.1007/s00018-010-0349-z
214. **I Sato, I Morita, K Kaji, M Ikeda, M Nagao & S Murota.** Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **195**, 1070-1076 (1993).
215. **H Matsushita, E Chang, AJ Glassford, JP Cooke, CP Chiu & PS Tsao.** eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circ. Res* **89**, 793-798 (2001).
216. **N Seiler.** Pharmacological aspects of cytotoxic polyamine analogs and derivatives for cancer therapy. *Pharmacol. Ther* **107**, 99-119 (2005).
217. **N Seiler.** Pharmacological aspects of cytotoxic polyamine analogs and derivatives for cancer therapy. *Pharmacol. Ther* **107**, 99-119 (2005).
218. **T Thomas, S Balabhadrapathruni, MA Gallo & TJ Thomas.** Development of polyamine analogs as cancer therapeutic agents. *Oncol. Res* **13**, 123-135 (2002).
219. **C Li & GN Wogan.** Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett* **226**, 1-15 (2005).
220. **T Waldow, W Witt, E Weber & K Matschke.** Nitric oxide donor-induced persistent inhibition of cell adhesion protein expression and NFkappaB activation in endothelial cells. *Nitric Oxide* **15**, 103-113 (2006).
221. **M Jiang, H Tsukahara, K Hayakawa, Y Todoroki, S Tamura, Y Ohshima, M Hiraoka & M Mayumi.** Effects of antioxidants and NO on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Respir Med* **99**, 580-591 (2005).
222. **M Jiang, H Tsukahara, Y Ohshima, Y Todoroki, M Hiraoka, M Maeda & M Mayumi.** Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression and NF-kappaB activation in human dermal microvascular endothelial cells. *Life Sci* **75**, 1159-1170 (2004).
223. **AF Vanin, LM Bevers, A Slama-Schwok & EE van Faassen.** Nitric oxide synthase

- reduces nitrite to NO under anoxia. *Cell. Mol. Life Sci* **64**, 96-103 (2007).
224. **E Pipili-Synetos, E Sakkoula, G Haralabopoulos, P Andriopoulou, P Peristeris & ME Maragoudakis.** Evidence that nitric oxide is an endogenous antiangiogenic mediator. *Br. J. Pharmacol* **111**, 894-902 (1994).
 225. **YT Lau & WC Ma.** Nitric oxide inhibits migration of cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **221**, 670-674 (1996).
 226. **A RayChaudhury, H Frischer & AB Malik.** Inhibition of endothelial cell proliferation and bFGF-induced phenotypic modulation by nitric oxide. *J. Cell. Biochem* **63**, 125-134 (1996).
 227. **M Ziche, L Morbidelli, E Masini, S Amerini, HJ Granger, CA Maggi, P Geppetti & F Ledda.** Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J. Clin. Invest* **94**, 2036-2044 (1994).
 228. **PK Lala & C Chakraborty.** Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol* **2**, 149-156 (2001).
 229. **G Cao, CD O'Brien, Z Zhou, SM Sanders, JN Greenbaum, A Makrigiannakis & HM DeLisser.** Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* **282**, C1181-1190 (2002).
 230. **R Chiba, N Nakagawa, K Kurasawa, Y Tanaka, Y Saito & I Iwamoto.** Ligation of CD31 (PECAM-1) on endothelial cells increases adhesive function of alphavbeta3 integrin and enhances beta1 integrin-mediated adhesion of eosinophils to endothelial cells. *Blood* **94**, 1319-1329 (1999).
 231. **ES Xenos, SL Stevens, MB Freeman, DC Cassada & MH Goldman.** Nitric oxide mediates the effect of fluvastatin on intercellular adhesion molecule-1 and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells. *Ann Vasc Surg* **19**, 386-392 (2005).
 232. **N Dusserre, N L'Heureux, KS Bell, HY Stevens, J Yeh, LA Otte, L Loufrani & JA Frangos.** PECAM-1 interacts with nitric oxide synthase in human endothelial cells: implication for flow-induced nitric oxide synthase activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **24**, 1796-1802 (2004).
 233. **S Hama, O Takeichi, M Hayashi, K Komiyama & K Ito.** Co-production of vascular endothelial cadherin and inducible nitric oxide synthase by endothelial cells in periapical granuloma. *Int Endod J* **39**, 179-184 (2006).
 234. **C Chang, T Chang, C Yu & M Tsai.** Induction of VE-cadherin in rat placental trophoblasts by VEGF through a NO-dependent pathway. *Placenta* **26**, 234-241 (2005).
 235. **CG Kevil, AW Orr, W Langston, K Mickett, J Murphy-Ullrich, RP Patel, DF Kucik & DC Bullard.** Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway. *J. Biol. Chem* **279**, 19230-19238 (2004).
 236. **Z Radisavljevic, H Avraham & S Avraham.** Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem* **275**, 20770-20774 (2000).
 237. **OA Antonova, SA Loktionova, YA Romanov, ON Shustova, MV Khachikian & AV Mazurov.** Activation and damage of endothelial cells upon hypoxia/reoxygenation. Effect of extracellular pH. *Biochemistry Mosc* **74**, 605-612 (2009).
 238. **D Fukumura & RK Jain.** Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev* **17**, 77-89 (1998).
 239. **SS Gross & MS Wolin.** Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol* **57**, 737-769 (1995).
 240. **S Lindemann, M Sharafi, M Spiecker, M Buerke, A Fisch, T Grosser, K Veit, C**

- Gierer, W Ibe, J Meyer & H Darius.** NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. *Thromb. Res* **97**, 113-123 (2000).
241. **JL Shelton, L Wang, G Cepinskas, R Inculet & S Mehta.** Human neutrophil-pulmonary microvascular endothelial cell interactions in vitro: differential effects of nitric oxide vs. peroxynitrite. *Microvasc. Res* **76**, 80-88 (2008).
242. **ME Watts, CS Parkins & DJ Chaplin.** Influence of hypoxia and tumour-conditioned medium on endothelial cell adhesion molecule expression in vitro. *Anticancer Res* **22**, 953-958 (2002).
243. **TB Corcoran, A Engel & GD Shorten.** The influence of propofol on the expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in reoxygenated human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Anaesthesiol* **23**, 942-947 (2006).
244. **A Mueller & PG Strange.** The chemokine receptor, CCR5. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **36**, 35-38 (2004).
245. **T Imai, K Hieshima, C Haskell, M Baba, M Nagira, M Nishimura, M Kakizaki, S Takagi, H Nomiyama, TJ Schall & O Yoshie.** Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* **91**, 521-530 (1997).
246. **PA Albertsson, PH Basse, M Hokland, RH Goldfarb, JF Nagelkerke, U Nannmark & PJK Kuppen.** NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* **24**, 603-609 (2003).
247. **A Bielawska-Pohl, C Crola, A Caignard, C Gaudin, D Dus, C Kieda & S Chouaib.** Human NK cells lyse organ-specific endothelial cells: analysis of adhesion and cytotoxic mechanisms. *J. Immunol* **174**, 5573-5582 (2005).
248. **T Murakami, AR Cardones & ST Hwang.** Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J. Dermatol. Sci* **36**, 71-78 (2004).
249. **AR Cardones, T Murakami & ST Hwang.** CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta(1) integrin. *Cancer Res* **63**, 6751-6757 (2003).
250. **MS Hassan, MM Mileva, HS Dweck & L Rosenfeld.** Nitric oxide products degrade chondroitin sulfates. *Nitric Oxide* **2**, 360-365 (1998).
251. **A Schmidt, S Geigenmueller, W Voelker, P Seiler & E Buddecke.** Exogenous nitric oxide causes overexpression of TGF-beta1 and overproduction of extracellular matrix in human coronary smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res* **58**, 671-678 (2003).
252. **M Irokawa, M Nishinaga, U Ikeda, Y Shinoda, M Suematsu, N Gouda, Y Ishimura & K Shimada.** Endothelial-derived nitric oxide preserves anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* **135**, 9-17 (1997).
253. **K Mani, F Cheng, S Sandgren, J Van Den Born, B Havsmark, K Ding & L Fransson.** The heparan sulfate-specific epitope 10E4 is NO-sensitive and partly inaccessible in glypican-1. *Glycobiology* **14**, 599-607 (2004).
254. **D Ghael, M Mileva, HS Dweck & L Rosenfeld.** The nitric oxide donor S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine degrades heparan sulfate and heparin. *Biochem. Mol. Biol. Int* **43**, 183-188 (1997).
255. **TM Millar, CR Stevens, N Benjamin, R Eisenthal, R Harrison & DR Blake.** Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett* **427**, 225-228 (1998).
256. **EA Grimm, J Ellerhorst, C Tang & S Ekmekcioglu.** Constitutive intracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis. *Nitric Oxide* **19**, 133-137 (2008).

257. **AG Sikora, A Gelbard, MA Davies, D Sano, S Ekmekcioglu, J Kwon, Y Hailemichael, P Jayaraman, JN Myers, EA Grimm & WW Overwijk.** Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemotherapy. *Clin. Cancer Res* **16**, 1834-1844 (2010).
258. **KT Flaherty, I Puzanov, KB Kim, A Ribas, GA McArthur, JA Sosman, PJ O'Dwyer, RJ Lee, JF Grippo, K Nolop & PB Chapman.** Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* **363**, 809-819 (2010).
259. **FS Hodi, SJ O'Day, DF McDermott, RW Weber, JA Sosman, JB Haanen, R Gonzalez, C Robert, D Schadendorf, JC Hassel, W Akerley, AJM van den Eertwegh, J Lutzky, P Lorigan, JM Vaubel, GP Linette, D Hogg, CH Ottensmeier, C Lebbé, C Peschel, I Quirt, JI Clark, JD Wolchok, JS Weber, J Tian, MJ Yellin, GM Nichol, A Hoos & WJ Urba.** Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med* **363**, 711-723 (2010).
260. **G Serini, D Valdembri & F Bussolino.** Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp. Cell Res* **312**, 651-658 (2006).
261. **T Murohara, B Witzenbichler, I Spyridopoulos, T Asahara, B Ding, A Sullivan, DW Losordo & JM Isner.** Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **19**, 1156-1161 (1999).
262. **PC Lee, MR Kibbe, MJ Schuchert, DB Stolz, SC Watkins, BP Griffith, TR Billiar & LL Shears.** Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates alpha(v)beta(3) integrin expression on endothelial cells. *Microvasc. Res* **60**, 269-280 (2000).

ANNEXES

ANNEXE 1: Solutions utilisées

Milieu de culture complet :

- Milieu OptiMEM avec Glutamax-I (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) complété par
- 2% de SVF (Sérum de Veau Foetal) décomplémenté (BioWest, Nuaille, France)
- 40 µg/ml gentamycine (Invitrogen)
- 0.05 µg/ml fungizone (Invitrogen)

Tampon salin de phosphate complet (Complete phosphate buffered saline cPBS) :

- Dans de l'eau distillée,
- 137 mM de Chlorure de sodium (NaCl), correspond à 8 g/L
- 2,7 mM de Chlorure de potassium (KCl), correspond à 0.2 g/L
- 20 mM de Phosphate de sodium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{ H}_2\text{O}$), correspond à 2,9 g/L
- 1,76 mM de Phosphate de potassium (KH_2PO_4), correspond à 0.24 g/L
- 0.5 mM de Chlorure de magnésium (MgCl_2), correspond à 47.6 mg/L
- 0.1 mM de Chlorure de calcium (CaCl_2), correspond à 112 mg/L

Tampon de migration pour le Western Blot :

- Dans de l'eau distillée,
- 25 mM de Tris pH 8.3, correspond à 3.03 g/L
- 192 mM de Glycine, correspond à 14.4 g/L
- 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate, correspond à 1 ml/L

Tampon de transfert pour le Western Blot :

- Dans de l'eau distillée,
- 25 mM de Tris base pH 8.3, correspond à 3.03 g/L
- 192 mM de Glycine, correspond à 14.4 g/L
- 0.05% de Sodium Dodecyl Sulfate 20%, correspond à 0.5 ml/L
- 20% de méthanol, correspond à 200 ml/L

ANNEXE 2: Article publié dans *Experimental Cell Research*

Carreau, A., Kieda, C. & Grillon, C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Exp Cell Res* **317**, 29-41, (2011).

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment

Aude Carreau, Claudine Kieda, Catherine Grillon*

Centre de biophysique moléculaire CNRS UPR4301, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 21 June 2010

Revised version received

14 August 2010

Accepted 23 August 2010

Available online 8 September 2010

Keywords:

Adhesion molecules

Nitric oxide

Angiogenesis

Endothelial cells

Cellular recognition

Cell recruitment

ABSTRACT

Tumor angiogenesis and immune response have in common to be cell recognition mechanisms, which are based on specific adhesion molecules and dependent on nitric oxide (NO[•]). The aim of the present study is to deepen the mechanisms of angiogenesis and inflammation regulation by NO[•] to find out the molecular regulation processes that govern endothelial cell permeability and leukocyte transmigration.

Effects of NO[•], either exogenous or produced in hypoxic conditions, were studied on microvascular endothelial cells from skin and lymph node because of their strong involvement in melanoma progression. We found that NO[•] down-regulation of pseudo-vessel formation was linked to a decrease in endothelial cell ability to adhere to each other which can be explain, in part, by the inhibition of PECAM-1/CD31 expression. On the other hand, NO[•] was shown to be able to decrease leukocyte adhesion on an endothelial monolayer, performed either in static or in rolling conditions, and to modulate differentially CD34, ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102 and VCAM-1/CD106 expression.

In conclusion, during angiogenesis and leukocyte recruitment, NO[•] regulates cell interactions by controlling adhesion molecule expression and subsequently cell adhesion. Moreover, each endothelial cell type presents its own organospecific response to NO[•], reflecting the functions of the tissue they originate from.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Among the numerous cellular (mutagenesis, angiogenesis, immune response, etc.) and molecular (HIF, VEGF, NO[•], etc.) processes regulating the complex process of cancer, progression involves a

stepwise series of genetic alterations to tumor cells. This results in tumor growth, invasion and ability to induce angiogenesis. Moreover, tumor gets around host immune system so that tumor cells migrate into the vasculature to other organs and form metastasis. Both mechanisms of angiogenesis and immune response are based

* Corresponding author. Centre de biophysique moléculaire, CNRS UPR4301 45071 Orléans cedex 2, France. Fax: + 33 238 25 54 59.

E-mail address: catherine.grillon@cnrs-orleans.fr (C. Grillon).

Abbreviations: 1400 W, N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide; DPTA-NONOate, dipropylentriamine NONOate; EC, endothelial cells; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; HIF, hypoxia inducible factor; HPLNEC.B3, human peripheral lymph node endothelial cell, B3 clone; HSkMEC, human skin microvascular endothelial cell; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; ICAM, intercellular adhesion molecule; iNOS, inducible nitric oxide synthase; L-NAME, N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester; L-NNA, N(G)-nitro-L-arginine; NO[•], nitric oxide; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1; SNAP, S-nitroso-N-acetylpenicillamine; SNP, sodium nitroprusside; VCAM-1, vascular cellular adhesion molecule-1; VE-cadherin, vascular endothelial cadherin; VEGF, vascular endothelial growth factor

on intercellular interactions: angiogenesis is mediated by endothelial cell (EC)–EC contacts underlying permeability; immune response implies recognition of ECs by leukocytes that migrate toward inflamed area. So, these phenomena are directly regulated by the EC adhesion molecules expression pattern. Furthermore, all of the above steps can be influenced by nitric oxide (NO[•]) signaling.

In melanoma progression, tumor cell survival appears to be dependent on NO[•] [1]. Rather, there is some evidence that inducible NO synthase (iNOS), responsible for the production of high quantities of NO[•], displays a stronger expression and a higher activity level in malignant compared to benign tissue [2]. A high iNOS expression is also associated with a poor survival of melanoma patients [3]. Moreover, endothelial NOS (eNOS), producing a low and continuous flow of NO[•], is up-regulated during hypoxia. Indeed, Coulet *et al.* [4] identified a hypoxia-responsive element in the human eNOS gene promoter and Presley *et al.* [5] found an increased association between heat shock protein 90 and eNOS upon hypoxia. Recently, eNOS has been shown to be able, in anoxic atmosphere, to reduce nitrite anions to NO[•], independently of arginine [6,7]. Hypoxic production of NO[•] should also be catalyzed by xanthine oxidase, an enzyme structurally related to bacterial nitrate and nitrite reductases [8]. These new findings might explain the overproduction of NO[•] in low oxygen microenvironment created during carcinogenic process.

While the role of NO[•] in cancer biology has long been unclear because of conflicting data, today, some questions are beginning to be solved. In fact, the concentration of NO[•] seems to dictate the phenotypic response and the dichotomous nature of this radical [9]. For example, on breast cancer cells, low doses of NO[•] (1–300 nM) can mediate proliferative and protective effects, dependent on cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling, Akt phosphorylation and HIF1 α stabilization. But when NO[•] levels are sufficiently high to induce p53 phosphorylation (above 300 nM) or nitrosative stress (>500 nM), a cytostatic and even an apoptotic response can be induced [10]. During angiogenesis, NO[•] was shown to stimulate the proliferative and migratory functions of ECs in a cGMP-dependent manner [11], whereas high NO[•] concentrations inhibit angiogenic responses, through inhibition of PKC, ERK and c-Jun phosphorylation [12]. In contrast, the antitumor response of leukocytes is inhibited by NO[•], whatever the concentration, through inhibition of neutrophils [13] and T cells adhesion [14] on endothelium.

However, even if some molecular effects of NO[•] begin to be understood, the consequences of a NO[•] overproduction in cancer processes have been poorly studied at the cellular level for the modulation of cell recognition and adhesion molecule expression. Only few groups have shown that, in an inflammatory context, VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54 and E-selectin/CD62E seem to be down-regulated after NO[•] treatment [15,16]. The observed NO[•] effect depends on the activity and localization of NOS isoforms, on the concentration and duration of NO[•] exposure, and also on the cell sensitivity to NO[•].

The aim of the present study is to evaluate the effects of NO[•] on cell recognition mechanisms at the EC level. This process is involved in two steps of cancer progression: angiogenesis and leukocyte recruitment and we presented the consequences of NO[•] effect on both processes with the aim to elucidate the mechanisms of angiogenesis and inflammation regulation by NO[•]. Its effects on cell interactions have been evaluated on two EC lines from different organs involved in melanoma: skin and peripheral lymph nodes. To disclose entirely the fundamentals of the processes, both cellular (cell adhesion either between ECs or between ECs and leukocytes) and molecular aspects (adhesion molecule expression) have been

considered. The EC response to various concentrations of either exogenous (NO donors) or endogenous (produced in hypoxia) NO[•] suggests, first, an important role of NO[•] in both EC–EC interactions and leukocyte adhesion on EC, and second, points out an organospecific character of the EC response to NO[•].

Material and methods

Cell lines

The endothelial cell (EC) lines, human peripheral lymph node endothelial cells (HPLNEC.B3) and human skin microvascular endothelial cells (HskMEC), were established in our laboratory according to the method previously described [17] and patented (C. Kieda, Centre National de la Recherche Scientifique patent 99-16169). As shown after immortalization by human telomerase reverse transcriptase [18], their phenotype was stable in terms of adhesion molecules and typical EC characteristics (e.g. the presence of angiotensin converting enzyme and von Willebrand factor) [17]. CEMT4 are human leukemic CD4⁺ T cells, purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD).

Cell lines were cultured in OptiMEM with Glutamax-1 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 2% Fetal Bovine Serum (BioWest, Nuaille, France), 40 μ g/ml gentamycin (Invitrogen) and 0.05 μ g/ml fungizone (Invitrogen). Cells were seeded at 2×10^4 cells/cm², 48 h before experiments and maintained at 37 °C in a 5% CO₂/95% air atmosphere.

Cell treatments with NO donors or NOS inhibitors and hypoxia

NO donors (dipropyleneetriamine NONOate or DPTA-NONOate, spermine-NONOate, from Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan) or NOS inhibitors (*N*(G)-nitro-L-arginine-methyl ester or L-NAME, *N*(G)-nitro-L-arginine or L-NNA, *N*-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide or 1400 W, from Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan) were added to cell cultures 48 h after seeding and incubation was allowed for 24 h or 48 h. Inactivated NO donors, used as negative controls, were obtained by dissolution of NO donors in phosphate-buffered saline (PBS) and incubation at 37 °C for at least 48 h before use on cells. In each experiment, decomposed NO donors were used in the same conditions than active NO donors and attest for the role of NO[•] in the studied mechanism. In fact, this excludes the involvement of nitrates, nitrites and residual backbones of the donor decomposition.

For hypoxia treatments, ECs were placed in a humidified atmosphere containing 1% of oxygen. This oxygen pressure was obtained by introducing 95% N₂/5% CO₂ gas mixture (Air Liquide, Paris, France) in an automated PROOX *in vitro* chamber (C-174; BioSpherix, Redfield, NY) under the control of a PROOX sensor-model 110 (BioSpherix).

In vitro angiogenesis assay

Before angiogenesis assay, cells were treated with either NO donors or NOS inhibitors for 6 h when incubated with Spermine-NONOate and for 24 h with other molecules. Angiogenesis was performed on 96-well plates coated with Matrigel™ (BD Biosciences, San José, CA). Cells were briefly treated with trypsin (Invitrogen), washed and were seeded at 3×10^4 cells/cm² in the presence of NO donors or NOS

inhibitors. Cultures were performed in normoxic (20% O₂) conditions for treated cells or in hypoxic (1% O₂) conditions. Cell rearrangement and pseudo-vessels formation were visualized using a Zeiss Axiovert 200 M fluorescence inverted microscope (Zeiss, Le Pecq, France) equipped with an Axiocam high-resolution numeric camera linked to a computer driving the acquisition software Axiovision (Zeiss). The direct real-time visualisation of the formation of pseudo-vessels was monitored during 24 h. Angiogenesis was quantified by the determination of pseudo-vessel number, longer than 50 µm, and by the measurement of pseudo-vessel mean length using Axiovision software.

Characterization of adhesion molecules on endothelial cells

After treatments, cells were washed twice with complete phosphate-buffered saline (PBS containing 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂; cPBS) containing 0.5% bovine serum albumin and 0.1% NaN₃ (cPBS/BSA). Cells were detached by collagenase (Invitrogen) and when necessary permeabilized by Cytofix/Cytoperm or only fixed by Cytofix (BD Biosciences) during 20 min, before neutralization by 0.2 M of urea. After several washings with cPBS/BSA solution, cells were incubated with the primary antibody or the corresponding isotype for 1 h at 4 °C. After washing, the corresponding FITC-secondary antibodies were added. After an incubation of 30 min at 4 °C, cells were washed and their fluorescence was detected using a FACS-LSR flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using CellQuest software (BD Biosciences). Results are expressed either by the relative fluorescence intensity ΔIF (the difference between the relative fluorescence intensity of the cells labeled with the antibody and the relative fluorescence intensity of the cells incubated with the corresponding isotype) for the basic expression, or, for the changes in adhesion molecule expression, by the percentage of relative fluorescence intensity of treated cells related to the relative fluorescence intensity of non-treated cells.

Goat anti-human ICAM-1/CD54 IgG polyclonal antibody (R&D systems, Abingdon, UK), goat anti-human PECAM-1/CD31 IgG polyclonal antibody, goat anti-human CD34 IgG polyclonal antibody, goat anti-human VCAM-1/CD106 IgG polyclonal antibody and goat anti-human VCAM-2/CD102 IgG polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California) were revealed by a secondary antibody FITC-labeled mouse IgG anti-goat IgG (Sigma Aldrich Corporation). Mouse anti-human VE-cadherin/CD144 IgG1 monoclonal antibody (BD Biosciences) was revealed by a secondary antibody FITC-labeled goat IgG anti-mouse IgG (Sigma Aldrich Corporation).

Cell adhesion assay in static conditions

Endothelial cells were seeded onto 12-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) for 48 h of culture. Then, cells were incubated either with NO donors or in hypoxic chamber, for various times (from 24 to 48 h). NO treated-ECs or non-treated-lymphoid cells CEMT4 were labeled with PKH26 red dye (Sigma Aldrich Corporation) according to the manufacturer's instructions and resuspended in cPBS containing 0.1% BSA. EC monolayers were washed with the same buffer. Labeled cells were overlaid onto the endothelial monolayer at a ratio of 5 to 7 labeled cells to one EC of the monolayer. Cells were allowed to adhere at 37 °C during 30 min under static conditions. Non-adherent cells were removed by at least two gentle washings with cPBS. Then, all cells were detached using a 0.05% trypsin/0.02% EDTA

solution and were analyzed by flow cytometry with excitation at 488 nm and emission at 560 nm. The ratio of PKH26-labeled cells to unlabeled ECs was determined. The results are expressed as the adhesion ratio (mean number of labeled cells per EC).

Cell adhesion assay in dynamic conditions

Endothelial cells were seeded onto Permanox culture slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY) and incubated either with NO donors or in hypoxic chamber. After 48 h of culture, the cell adhesion flow chamber (Immunetics, Boston, MA) was used to perform dynamic cell adhesion assays in a laminar flow environment (mimicking the shear stress). The chamber flow system included a medium reservoir, adhering cell reservoir, a variable-speed Harvard syringe pump and a vacuum pump to fix the slide to the flow chamber. The chamber was mounted on an Axiovert 200 M epifluorescence inverted microscope (Zeiss), coupled to an Axiocam high-resolution numeric camera (Zeiss) directly linked to a computer equipped with the acquisition software AXIOVISION (Zeiss).

Previously labeled with PKH67 green dye (λ emission: 490 nm; λ excitation: 504 nm), according to the manufacturer's instructions, CEMT4 or ECs (1 × 10⁶/mL in serum free OptiMEM medium) were injected in a laminar flow at the fixed flow rate of 50 µl/min. Recognition and adhesion of the in-flow cells to EC monolayer were allowed for 5 min, then washing was performed for 10 min with serum free medium at the fixed flow rate of 150 µl/min. Adhesion assay was performed at room temperature. After washing, at least 10 pictures covering the adhesion area were taken using a ×10 objective (1 photo showing approximately 600 ECs) and the number of bound cells was quantified. The results are expressed as the adhesion ratio (number of labeled cells fixed by one EC).

Neutralization by antibodies of endothelial-leukocyte interactions

Antibodies neutralization was performed the day of the cell adhesion assay. Mouse anti-human CD34 IgG monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK), mouse anti-human ICAM-1/CD54 IgG1 monoclonal antibody, goat anti-human ICAM-2/CD102 polyclonal antibody and mouse anti-human VCAM-1/CD106 IgG1 monoclonal antibody (R&D systems) were separately added to the culture media one hour before the experiment, according to the manufacturer's recommendations. Then medium was removed and adhesion assay in static or dynamic conditions was performed as previously described.

Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SEM. The Student's *t*-test was used to determine statistically significant differences between experimental and control samples.

Results

Microvascular endothelial cell lines

Both HskMEC and HPLNEC.B3 cell lines have been previously characterized for EC marker expression showing that their phenotype differs according to their tissue origin [17]. To complete the phenotype of both lines in terms of adhesion molecules we are

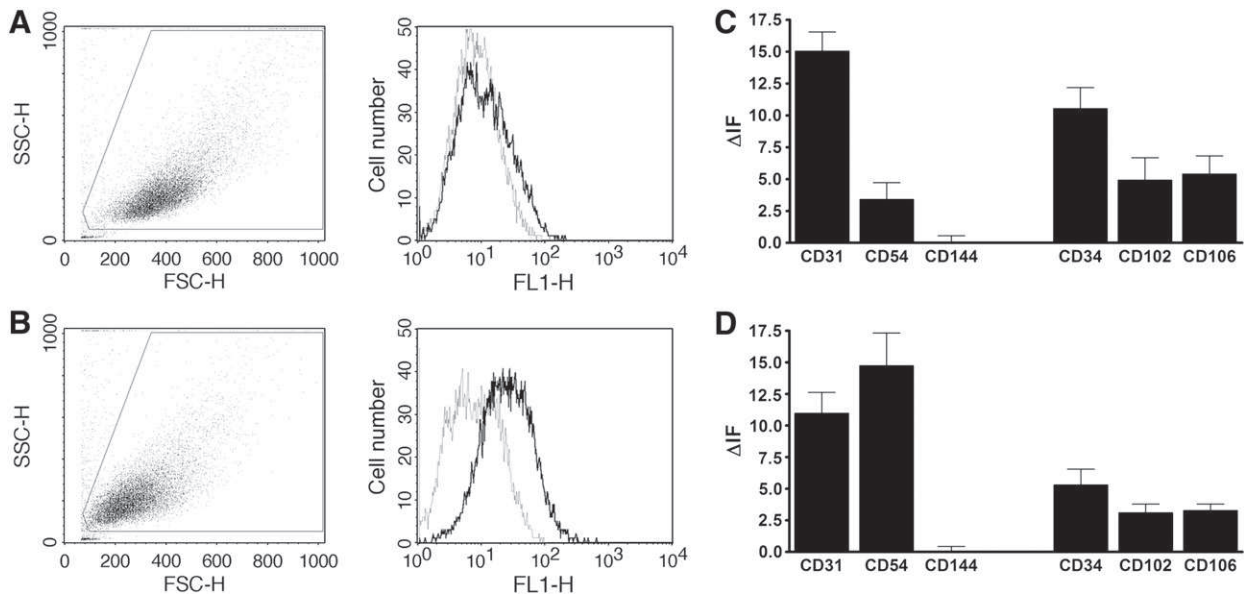


Fig. 1 – Endothelial cell characterization for adhesion molecules. Lymph node ECs (HPLNEC.B3) (A, C) or skin ECs (HskMEC) (B, D) were incubated with specific antibodies and labeled with a fluorescent secondary antibody. Fluorescence was quantified by flow cytometry. (A, B) an example of the CD54 labeling: cell gating, on side (SSC) and forward (FSC) scatters, used for analysis and fluorescence (FL1) histograms obtained after incubation with the anti-CD54 antibody (dark line) or its isotype (grey line) and further with a fluorescent secondary antibody. (C, D) Basic expression of the markers is shown by the relative fluorescence intensity ΔIF (the difference between the relative fluorescence intensity of the cells labeled with the antibody and the relative fluorescence intensity of the cells incubated with the corresponding isotype, mean from 3 to 6 experiments \pm SEM).

interested in, Fig. 1 presents the comparative basal expression of the following molecules: PECAM-1/CD31, ICAM-1/CD54, VE-Cadherin/CD144, CD34, ICAM-2/CD102 and VCAM-1/CD106. The main difference is that HskMEC (Fig. 1D) show a higher level of ICAM-1/CD54 expression than HPLNEC.B3 (Fig. 1C, $p < 0.01$). Moreover, HPLNEC.B3 express twice the level of CD34 ($p < 0.01$), ICAM-2/CD102 ($p < 0.05$) and VCAM-1/CD106 ($p < 0.05$) as compared to HskMEC. The lack of VE-Cadherin/CD144 expression for both cell lines comes likely from a low sensitivity resulting from experimental conditions as VE-Cadherin/CD144 mRNA was detected but weakly by RT-PCR (data not shown).

Modulation of angiogenesis by NO^{*}

Both NO donors and NOS inhibitors have been used to determine the role of NO^{*} on the angiogenic properties of endothelial cell lines. To assess the importance of the NO^{*} flow, we used the same concentration of two different NO donors with distinct half life time: spermine-NONOate ($t_{1/2} = 39$ min at 37 °C) and DPTA-NONOate ($t_{1/2} = 3$ h at 37 °C).

Angiogenesis was evaluated by the formation of pseudo-vessels on Matrigel™, because EC differentiation on basement membrane recapitulates many steps in angiogenesis and is a highly specific process [19], even if lumen formation is not always observed in this angiogenic system [20]. As shown in Fig. 2, angiogenesis of the two cell lines is slightly different: HskMEC form longer and more organized pseudo-vessels than HPLNEC.B3. NO donors (0.1 mM) inhibit pseudo-vessel formation, evaluated by the number of pseudo-vessels and by their mean length, from both HPLNEC.B3 and HskMEC (Figs. 2A and B, Table 1). Spermine-NONOate was

incubated for less than 24 h to avoid cell toxicity, whereas cells were incubated in the presence of DPTA-NONOate for up to 48 h. Both NO donors lead to the inhibition of angiogenesis but the inhibitory effect of spermine-NONOate is stronger than that of DPTA-NONOate (−78% versus −59% on HskMEC for pseudo-vessel mean length, −100% versus +10% on HskMEC and −91% to −32% on HPLNEC.B3 for pseudo-vessel number), suggesting that a shorter exposure of more concentrated NO^{*} was more efficient rather than longer exposure of less concentrated NO^{*}. The lack of inhibition displayed by decomposed NO donors used in the same conditions, or their weak inhibitory effect, attests for the role of NO^{*} in angiogenesis inhibition. Remarkably, decomposed DPTA-NONOate shows an increase in pseudo-vessel number but a decrease in pseudo-vessel mean length for both cell lines, resulting in the compensation of angiogenesis. Moreover, control experiments in the same conditions indicate that this anti-angiogenic effect of NO^{*} is not attributable to either cytotoxic or apoptotic effect of NO donors (data not shown).

The addition of NOS inhibitors also decreases angiogenesis (Fig. 3A, Table 2) in both cell lines. Among the non-specific NOS inhibitors (IC_{50} iNOS = 3.1 μ M; IC_{50} eNOS = 0.35 μ M for both inhibitors; [21]), L-NAME (0.1 mM) and L-NNA (0.1 mM) are less effective than NO donors to inhibit angiogenesis (inhibition from −28 to −46% for HPLNEC.B3 and from −2 to −54% for HskMEC). Besides, the 1400-W inhibitor, more specific for iNOS (IC_{50} iNOS = 0.23 μ M; IC_{50} eNOS = 1000 μ M; [21]), undergoes a strong inhibition in terms of pseudo-vessel number at a concentration as low as 1 μ M in both cell lines (−56% on HPLNEC.B3 and −54% on HskMEC). But only a higher concentration induces inhibition regarding pseudo-vessel mean length (−57% in HPLNEC.B3, −19% on HskMEC). As hypoxia, the main angiogenesis stimulator, is able to

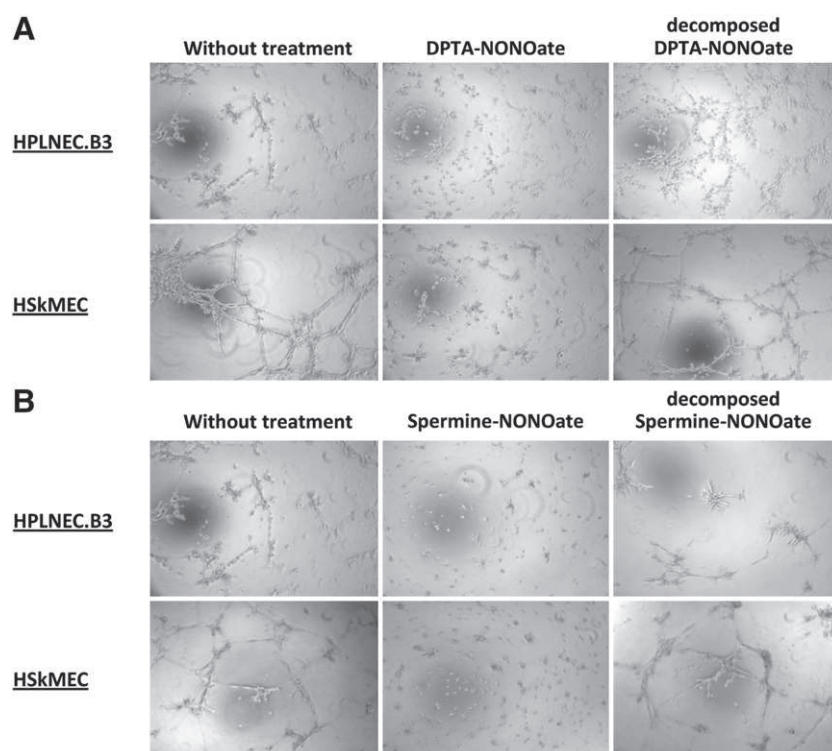


Fig. 2 – Effect of NO donors on angiogenesis by endothelial cells. Lymph node ECs (HPLNEC.B3) or skin ECs (HSkMEC) were preincubated in the presence of active or inactivated NO donors (0.1 mM) for 6 h and 24 h, respectively, for spermine-NONOate and DPTA-NONOate. Then cells were seeded on Matrigel™ in the presence of the same molecules. Pseudo-vessel formation was visualized on Zeiss Axiovert 200 M fluorescent inverted microscope and monitored during 24 h. Results at 18 h (Spermine-NONOate, (B) and 24 h (DPTA-NONOate, (A) of cell culture are presented.

induce endogenous NO[•] production, we assessed the effects of hypoxia (1% O₂) on pseudo-vessels formation, using NOS inhibitors to confirm NO[•] origin. As shown in Fig. 3B, hypoxic conditions accelerate angiogenesis in both cell lines since, after 8 h culture in hypoxia, pseudo-vessels are formed. Similar networks are obtained only after 24 h in normoxia. However, hypoxia-induced pseudo-vessel networks are not stable as they disappear after 48 h. Very little or no effect of hypoxia on cell viability, proliferation and migration was observed (data not shown). Under hypoxia, 1400 W strongly inhibits angiogenesis whereas L-NNA and L-NAME are less effective. In HSkMEC, only the number of pseudo-vessels is decreased by NOS

inhibitors whereas their mean length is also affected in HPLNEC.B3. Control experiments indicate that this anti-angiogenic effect of NO[•] is not attributable to either cytotoxic or apoptotic effect of NOS inhibitors (data not shown).

To deepen the inhibitory mechanism of NO[•] in EC angiogenesis, we performed homotypic cell adhesion assays in static conditions, with the same treatments as previously. Interactions between lymph node ECs are diminished by DPTA-NONOate (−57%) and by spermine-NONOate (−30%), without any effect of the decomposed molecules (Fig. 4A). We observed the same adhesion decrease upon hypoxia (−49%) but only after a longer incubation (48 h). On

Table 1 – Effect of NO donors on angiogenesis by endothelial cells—quantification of angiogenesis by the pseudo-vessel number determination and mean length measurement.

Cell treatment	HPLNEC.B3				HSkMEC			
	Vessel number (> 50 μm)		Vessel mean length (μm)		Vessel number (> 50 μm)		Vessel mean length (μm)	
	% control	Mean ± SEM	% control		% control	Mean ± SEM	% control	
Without	22	100	172 ± 19	100	37	100	186 ± 16	100
DPTA-NONOate	15	68	46 ± 4	27 (<i>p</i> < 0.05)	38	110	77 ± 6	41 (<i>p</i> < 0.05)
Decomposed DPTA-NONOate	106	482	119 ± 6	69 (<i>p</i> < 0.05)	60	174	149 ± 11	80 (NS)
Without	22	100	172 ± 19	100	32	100	154 ± 12	100
Spermine-NONOate	2	9	51 ± 18	30 (<i>p</i> < 0.05)	0	0	33 ± 6	22 (<i>p</i> < 0.05)
Decomposed Spermine-NONOate	22	100	211 ± 33	122 (NS)	25	72	211 ± 27	137 (<i>p</i> < 0.05)

NS: non-significant.

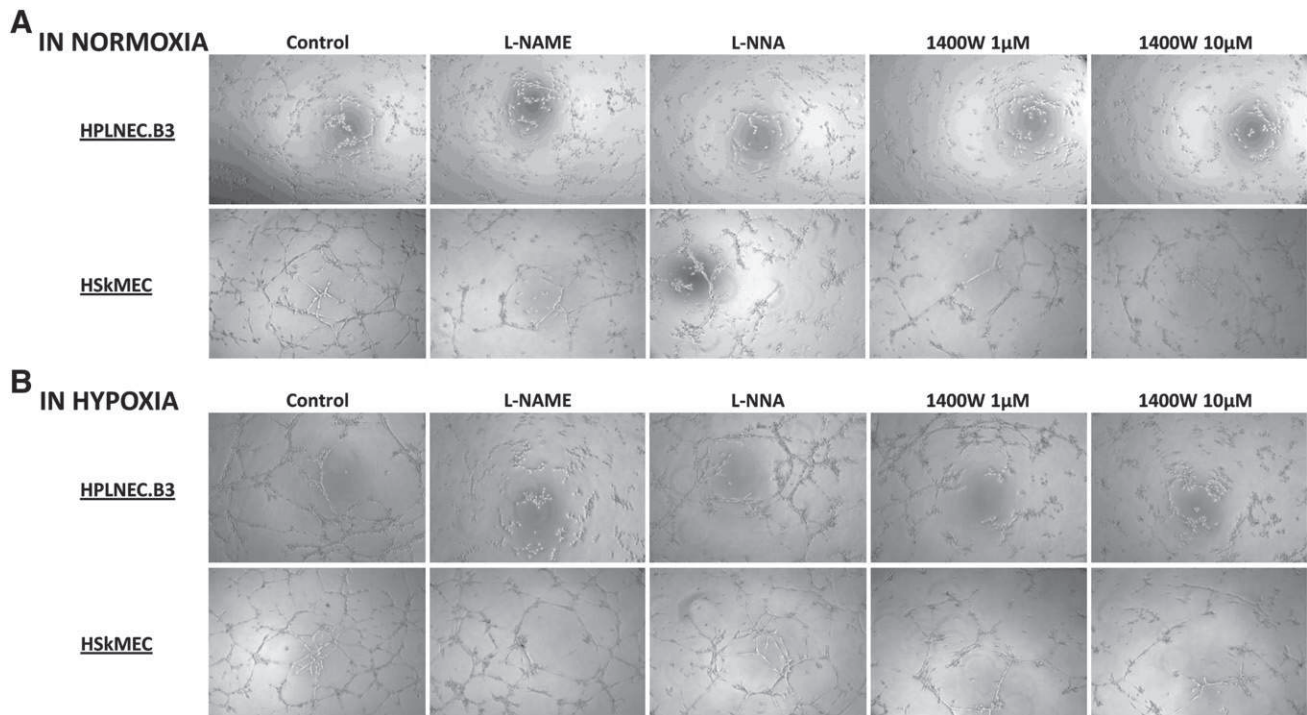


Fig. 3 – Effect of NOS inhibitors on angiogenesis by endothelial cells in normoxia and hypoxia. Lymph node ECs (HPLNEC.B3) or skin ECs (HSkMEC) were preincubated in the presence of NOS inhibitors (L-NAME and L-NNA, 0.1 mM; 1400 W, 1 and 10 μ M) for 24 h, then were seeded on Matrigel™ in the presence of the same molecules. Plates were incubated either in (A) normoxia (20% O₂) or (B) hypoxia (1% O₂). Pseudo-vessel formation was visualized on Zeiss Axiovert 200 M fluorescent inverted microscope and monitored during 24 h. Results from 8 h cell culture in hypoxia and 24 h cell culture in normoxia are presented.

HSkMEC (Fig. 4B), cell adhesion is significantly inhibited by a 24-h treatment by DPTA-NONOate (–42%) and by 48 h hypoxia (–51%).

Thereafter, we analyzed the expression of endothelial markers chosen for their known implication in cell migration and pseudo-vessels formation (PECAM-1/CD31, ICAM-1/CD54 and VE-cadherin/CD144). Cells were treated with NO donors as exogenous source of

NO[•] and, to evaluate the role of endogenous NO[•], parallel experiments were performed in hypoxia. NO donor treatments decrease PECAM-1/CD31 expression in both cell lines (–34 to –54%) as shown in Figs. 5A and C. Except in the one instance of HSkMEC incubated for 24 h with spermine-NONOate, the observed decreases in PECAM-1/CD31 expression are due to NO[•] because the decomposed form of the NO donor is inactive. Similarly, cells maintained in

Table 2 – Effect of NOS inhibitors on angiogenesis by endothelial cells in normoxia and hypoxia—quantification of angiogenesis by the pseudo-vessel number determination and mean length measurement.

Cell treatment	HPLNEC.B3				HSkMEC			
	Vessel number (> 50 μ m)		Vessel mean length (μ m)		Vessel number (> 50 μ m)		Vessel mean length (μ m)	
	% control	Mean \pm SEM	% control		% control	Mean \pm SEM	% control	
<i>Cells in normoxia</i>								
Without	109	100	87 \pm 4	100	99	100	110 \pm 7	100
L-NAME	79	72	62 \pm 4	71 (<i>p</i> < 0.05)	71	72	108 \pm 9	98 (NS)
L-NNA	59	54	53 \pm 3	61 (<i>p</i> < 0.05)	46	46	87 \pm 7	79 (<i>p</i> < 0.05)
1400 W 1 μ M	48	44	75 \pm 6	86 (NS)	46	46	92 \pm 8	84 (NS)
1400 W 10 μ M	15	14	38 \pm 3	43 (<i>p</i> < 0.05)	61	62	89 \pm 7	81 (<i>p</i> < 0.05)
<i>Cells in hypoxia</i>								
Without	70	100	145 \pm 13	100	131	100	108 \pm 5	100
L-NAME	49	70	61 \pm 3	42 (<i>p</i> < 0.05)	114	87	110 \pm 5	102 (NS)
L-NNA	81	116	102 \pm 6	70 (<i>p</i> < 0.05)	89	68	112 \pm 7	104 (NS)
1400 W 1 μ M	59	84	77 \pm 5	53 (<i>p</i> < 0.05)	43	33	122 \pm 11	113 (NS)
1400 W 10 μ M	20	29	45 \pm 3	31 (<i>p</i> < 0.05)	54	41	119 \pm 10	110 (NS)

NS: non-significant.

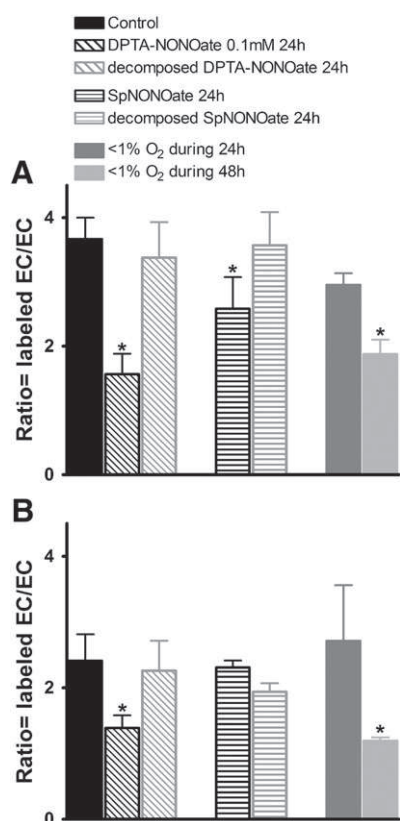


Fig. 4 – Role of NO[•] on static adhesion between endothelial cells. HPLNEC.B3 (A) and HSkMEC (B) were treated by NO donors, decomposed NO donors (0.1 mM) for 24 h or maintained in hypoxia (1%O₂) during 24 h or 48 h, then they were labeled by PKH26. Cells were overlaid for 30 min at 37 °C onto endothelial monolayer, treated in the same conditions. Adherent cells were quantified by flow cytometry. Results are expressed as the adhesion ratio: number of labeled cells bound to one adherent EC (mean from 2 experiments performed in triplicate ± SEM; **p* < 0.05).

hypoxia for 24 to 48 h show a strong decrease in PECAM-1/CD31 expression (−31 to −48% for HPLNEC.B3 and −21% for HSkMEC). This decrease correlates with the destabilization of the pseudo-vessel network observed after a long incubation in hypoxia. NO[•] involvement in hypoxia was evaluated by addition of NOS inhibitors: L-NAME or 1400w. Both are able to partly reverse the inhibitory effect of hypoxia on HPLNEC.B3.

ICAM-1/CD54 expression was 2.5 times higher on HPLNEC.B3 when treated with spermine-NONOate only, DPTA-NONOate being less efficient (Fig. 5A). In hypoxia, the same increase is observed after 48 h of treatment and it is totally reversed in the presence of 1400w, suggesting the selective involvement of iNOS. In the case of HSkMEC, an opposite modification of ICAM-1/CD54 expression, an increase (+17%) with DPTA-NONOate and a decrease (−23%) with spermine-NONOate, is observed (Fig. 5C).

Interestingly, VE-cadherin/CD144 expression, which was not detected on non-treated cells, is induced after 48 h of DPTA-NONOate treatment, on HPLNEC.B3 cells only (Fig. 5B). No modification of VE-cadherin/CD144 expression is shown in hypoxia (Figs. 5B, D).

Role of NO[•] in leukocyte–endothelial cell interactions

As cell recognition is also involved in leukocyte recruitment by the endothelium, which is impaired in cancer patients, we investigated the effects of NO[•] on leukocyte–EC interactions. This was performed by studying leukocyte adhesion on endothelial monolayer, first, in static and, second, in flow conditions to mimic the rolling. An example of adhesion experiment in dynamic conditions illustrating the inhibitory effect of DPTA-NONOate in the interaction between CEMT4 and HSkMEC is presented in Fig. 6A. As shown in Fig. 6B, static adhesion between CEMT4 leukocytes and lymph node ECs is diminished after 24 h by DPTA-NONOate (−35%) and after a 48-h incubation in hypoxic conditions (−32%). These best conditions have been studied for adhesion in flow (Fig. 6C). Neither DPTA-NONOate nor hypoxia induces any modification of CEMT4 adhesion on HPLNEC.B3 monolayer. On HSkMEC in static conditions, hypoxia inhibits strongly leukocyte recognition after 24 h (−80%) and 48 h (−82%) of treatment (Fig. 6D). This is confirmed in flow conditions (Fig. 6E) for 48 h hypoxia (−47%). DPTA-NONOate treatment which is inactive in static assay does induce an inhibition of CEMT4 adhesion in flow conditions.

To assess the involvement of adhesion molecules in leukocyte recruitment in our models, we have specifically blocked each adhesion molecule and studied leukocyte adhesion on ECs. First, with HPLNEC.B3, static adhesion is inhibited by αCD34 and αCD106 neutralizing antibodies (Fig. 7A), whereas in flow adhesion is diminished in the presence of αCD54 and αCD102 antibodies (Fig. 7B), demonstrating that static and in flow adhesion processes are not governed by the same interactions. Second, on the opposite, adhesion on skin ECs is mainly mediated by ICAM-1/CD54 whatever the conditions, showing that leukocyte adhesion cascade on different cell lines does not involve the same adhesion molecules.

These markers involved in leukocyte–EC interactions have been studied in the same NO[•]-modified conditions: CD34, ICAM2/CD102 and VCAM-1/CD106.

As shown in Figs. 8A and B, CD34 expression is diminished by spermine-NONOate at 24 h on HPLNEC.B3 and HSkMEC (−27% and −42%, respectively). After 24 h of DPTA-NONOate, no modulation is observed, whereas a longer incubation (48 h) decreases CD34 expression (−45% on HPLNEC.B3 and −22% on HSkMEC) (data not shown). In hypoxia, CD34 expression is also decreased at 48 h (−46% on HPLNEC.B3 and −53% on HSkMEC). The inhibition is specifically reversed by L-NAME on HSkMEC suggesting the involvement of eNOS.

ICAM-2/CD102 expression is decreased by exogenous NO[•] on both cell lines, but not with the same NO donor: on HPLNEC.B3 treated with DPTA-NONOate and on HSkMEC treated with spermine-NONOate (Fig. 7), showing a distinct response to NO[•]. An important decrease in ICAM-2/CD102 expression is observed at 24 h (−44% and −32%) and 48 h (−49% and −61%) of hypoxia on lymph node EC lines and skin, respectively. L-NAME and 1400w counteract the hypoxic inhibitory effect only on HSkMEC, indicating the involvement of NO synthase.

Comparatively to ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106 expression is decreased by NO[•] on both cell lines: DPTA-NONOate decreases its expression on HSkMEC (Fig. 7B), whereas spermine-NONOate is active only on HPLNEC.B3 (Fig. 7A). Again, hypoxia induces an important decrease in VCAM-1/CD106 expression (−39% to −43%) on both cell lines, markedly induced by NO[•].

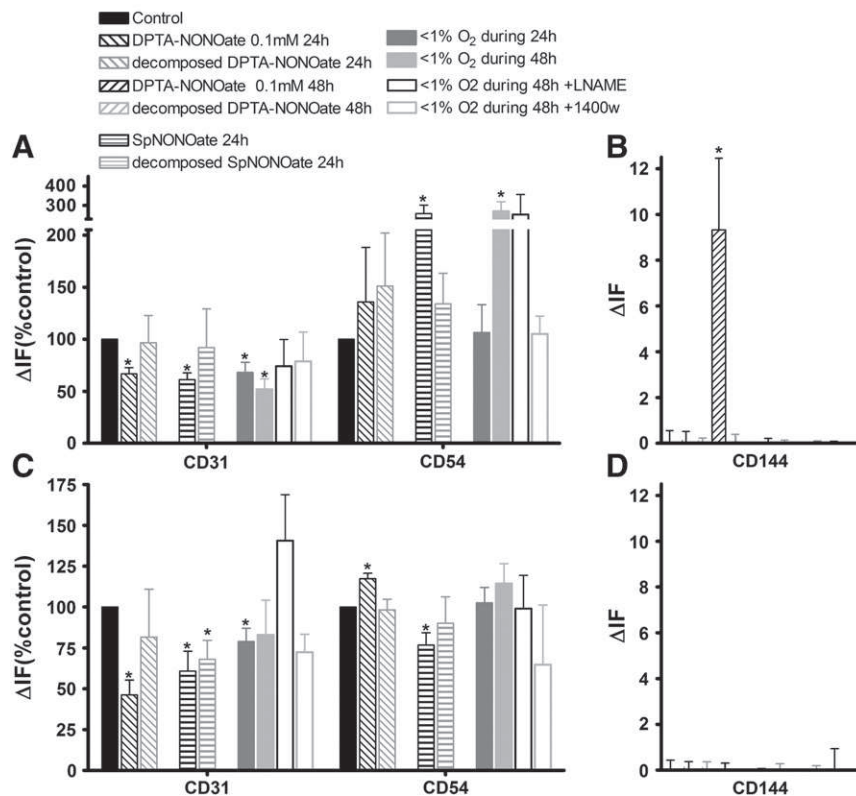


Fig. 5 – Role of NO donors or hypoxia on adhesion molecule expression involved in endothelial cell interactions. Cells were treated by NO donors, decomposed NO donors (0.1 mM) or maintained in hypoxia (1%O₂) during 24 h or 48 h, with or without NOS inhibitors then they were incubated with specific antibodies and labeled with a fluorescent secondary antibody. Fluorescence was quantified by flow cytometry. Effects of NO donors at 24 h and hypoxia on PECAM-1/CD31 and ICAM-1/CD54 are visualized in A and C and on CD144 at 48 h in B and D. Changes in adhesion molecules expression on HPLNEC.B3 (A, B) and HSkMEC (C, D) are shown as % of the relative fluorescence intensity related to relative fluorescence intensity of non-treated cells, excepted for CD144, for which the direct relative fluorescence Δ I_F is used (mean from 3 to 6 experiments \pm SEM; * $p < 0.05$).

Discussion

Most of the *in vitro* models that provide information about ECs interactions involve human umbilical vein ECs (HUVEC), cells coming from the macrovasculature. Considering that tumors are mostly located in defined organs, these studies are clearly limited by the lack of organ-specific cells and of microenvironmental factors. For example, Waldow *et al.* [15] showed that induction of VCAM-1/CD106, ICAM-1/CD54 and E-selectin/CD62E by tumor necrosis factor α is reduced by a S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) preincubation in a macrovascular model, whereas Jiang *et al.* [22] [23] did not observe any modification in the expression of these adhesion molecules on pulmonary and dermal microvascular ECs. These conflicting data indicate that the use of adequate cellular models reflecting the physiology is necessary in order to elucidate interactions between ECs and their microenvironment. Furthermore, the use of primary endothelial microvascular cells presents several disadvantages because cells are not stable along the culture and their phenotype and activity differs for one patient to another. We previously designed an *in vitro* human microvascular endothelial cell model by immortalizing ECs from different organs and stabilized their phenotypes [17] preserving their heterogeneity according to their cellular origin [24]. In this study, we focused our work on two

microvascular EC lines involved in the melanoma progression: ECs isolated from skin, as the primary site of cancer, and from lymph node, the first metastasized organ in the melanoma. These cells were shown to be different, with a higher level of ICAM-1/CD54 and a lower level of PECAM-1/CD31, CD34, ICAM-2/CD102 and VCAM-1/CD106 on HSkMEC than on HPLNEC.B3. In addition, they presented a different ability to recruit circulating leukocytes, using different adhesion molecules. Moreover, they presented an adhesion molecule expression level sufficient for this study, avoiding any stimulation by exogenous inflammatory molecules. In fact, the NO[•]-induced down-regulation of ECs activation and the subsequent endothelial–endothelial [25] or leukocyte–endothelial interactions [16,26] have been well documented; however, little information is yet available on non-activated ECs.

To mimic NO[•] flux, we used two NO donors from the diazeniumdiolates family (also known as ‘NONOates’): spermine-NONOate and DPTA-NONOate, presenting a predictable rate of NO[•] release [27]. By using such NO donors, Thomas *et al.* have decoded the apparent diversity in biological responses to NO[•]: NO[•] delivery, exogenous or endogenous, elicits specific cellular and molecular responses dependent on its concentration, from protective and proliferative activity for lower concentrations, to nitrosative stress inducing apoptotic effects for higher doses of NO[•] [10]. We selected here NO donor concentrations and incubation times which do not induce any cytotoxic or

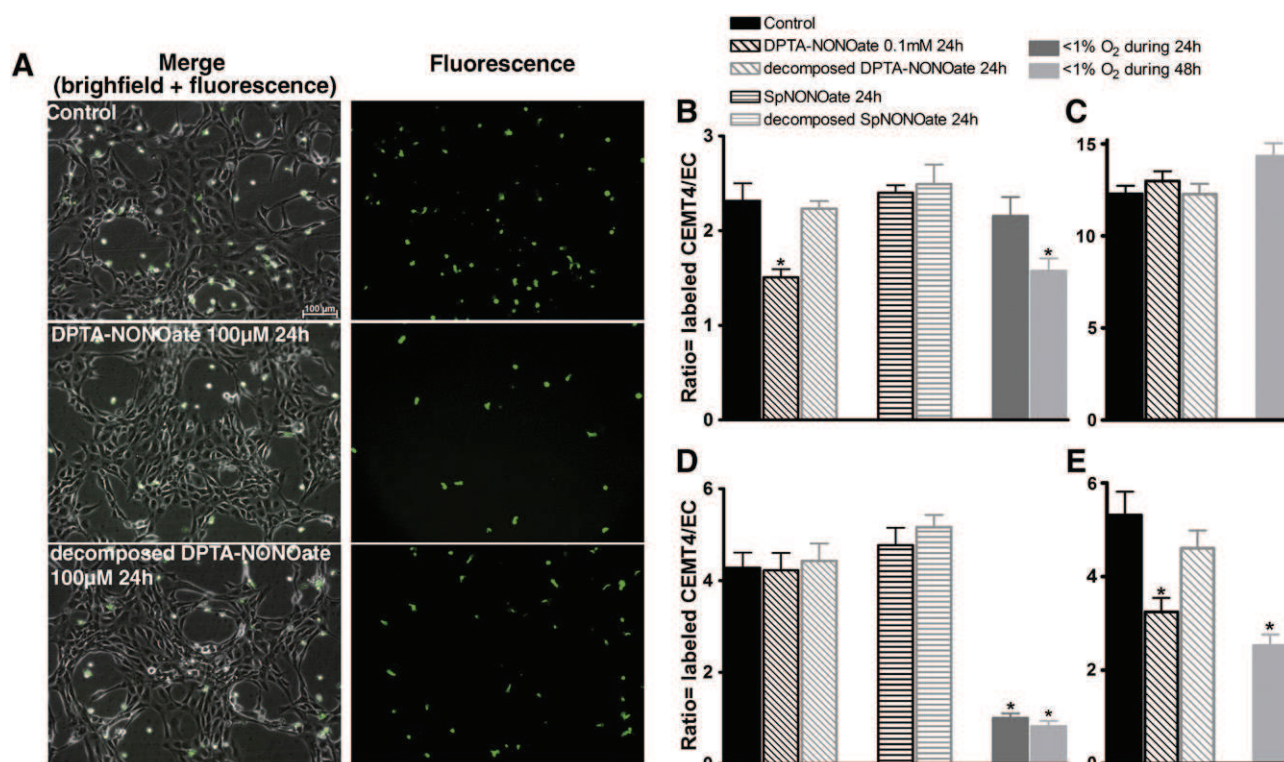


Fig. 6 – Role of NO[•] on adhesion between endothelial cells and leukocytes. Cells were treated with NO donors, decomposed NO donors (0.1 mM) for 24 h or maintained in hypoxia (1%O₂) during 24 h or 48 h. (A, C and E) Dynamic adhesion: PKH26-labeled-CEMT4 were overlaid onto endothelial monolayer, in flow condition during 5 min. Adherent cells were visualized on Zeiss Axiovert 200 M fluorescent inverted microscope and a minimum of 10 photos per slide were taken. (A) photos from dynamic adhesion of PKH26-labeled-CEMT4 on treated HSKMEC; quantitative results for HPLNEC.B3 (C) and HSKMEC (E). (B and D) Static adhesion: PKH26-labeled-CEMT4 were overlaid onto endothelial monolayer, during 30 min at 37 °C and adherent cells were quantified by flow cytometry. Quantitative results for HPLNEC.B3 (B) and HSKMEC (D). Results are expressed as the adhesion ratio: number of labeled cells bound to one adherent EC (mean from 2 experiments performed in triplicate, for static adhesion, or duplicate, for dynamic adhesion, ± SEM; **p* < 0.05).

apoptotic signal on EC. To assess comparatively the effect of an endogenous NO[•] production, we used hypoxia because intratumoral hypoxia induces endogenous NO[•] production [2,4,5,7,8] as described in the Introduction. Knowing that other signals than NO[•] may be involved in hypoxic context, in addition, we tried to precise the NO[•] origin when possible by the use of NOS inhibitors.

In the first part of the study, we investigated the role of NO[•] during angiogenic process. Jones *et al.* [12] observed, in a rat gastric microvascular EC model, that less than 0.3 mM of SNAP (approximately 26 µM NO[•]) induces a stimulatory effect whereas a SNAP concentration higher than 0.5 mM (corresponding to approximately 36 µM NO[•] and above) inhibits *in vitro* angiogenesis. Based on the above considerations, we assessed the impact of endogenous NO[•] by using NOS inhibitors and presented inhibitory effects clearly confirming that endogenous NO[•] in normoxic or in hypoxic cultures is one of the main promoters of vessel formation by human microvascular EC lines, possibly by modulation of cGMP signaling [11]. At the opposite, high concentrations of exogenous NO[•] from NO donors inhibit the formation of capillary-like structures by HSKMEC and HPLNEC.B3, maybe by affecting cell migration. In fact, first, Ziche *et al.* [28], and, then, Murohara *et al.* [29] reported that NO[•] mediates EC migration in the angiogenic process. Therefore, only an optimal range of NO[•] concentration

(reached in the hypoxic context of the tumor) contributes to angiogenesis. Lower or higher concentrations induced a lack or an inhibition of pseudo-vessels formation, respectively.

To elucidate the mechanisms by which NO[•] modulates angiogenesis, we studied the cell adhesion mechanisms between ECs by evaluating EC-EC interactions in static conditions, reflecting the local interactions required for the formation of new vessels, and the expression level of three adhesion molecules described as fundamental for these interactions, PECAM-1/CD31, ICAM-1/CD54 and VE-cadherin/CD144 [30–32]. We show here that inter-EC interactions in both cell lines are inhibited in a NO[•]-dependent manner which provides a possible explanation for the inhibition of pseudo-vessels formation.

At a molecular level, the direct implication of PECAM-1/CD31 in angiogenic process, especially involved in homotypic interactions, was shown by Cao *et al.* [30], demonstrating that through PECAM-1/CD31 transfection, REN cells acquire the capacity to migrate and form tubular structures on Matrigel™. Furthermore, ligand engagement of PECAM-1/CD31 may stimulate the integrins activity (in particular β₃) required for cell migration [33]. Here, we show the NO[•]-dependent down-regulation of PECAM-1/CD31 expression by NO donors and also in hypoxic conditions. The basal expression of PECAM-1/CD31 was previously reported to be reduced by Fluvastatin at the same

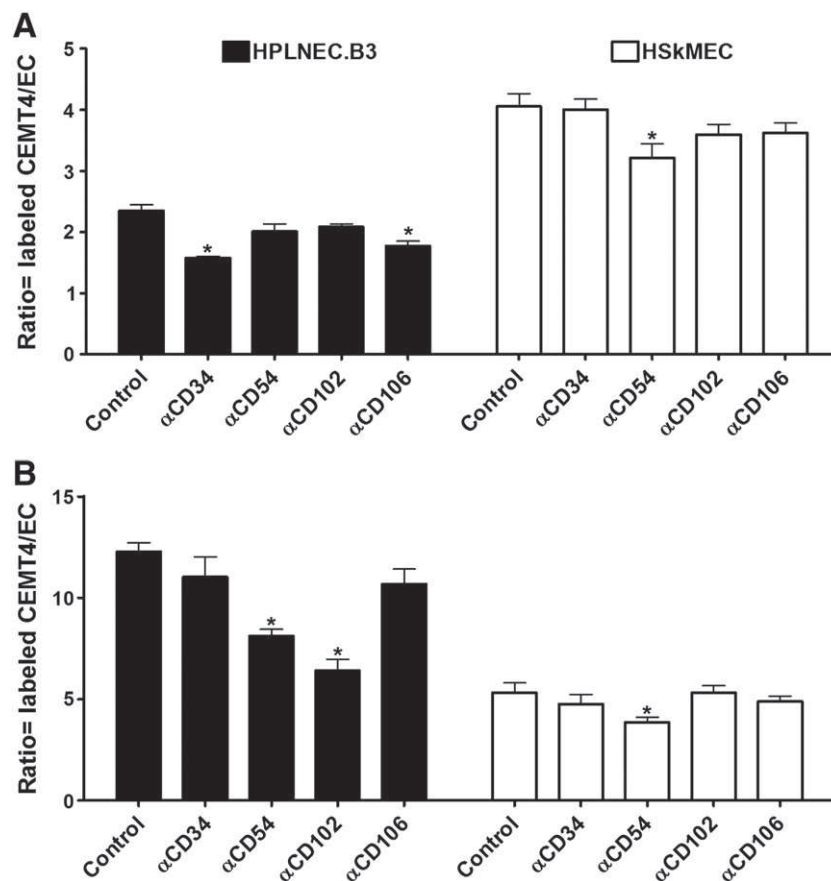


Fig. 7 – Role of adhesion molecules involved in leukocyte recruitment. HPLNEC.B3 (in black) and HSkMEC (in white) were treated with neutralizing antibodies for 1 h at 37 °C. Static adhesion (A): PKH26-labeled-CEMT4 were overlaid onto endothelial monolayer, during 30 min at 37 °C and adherent cells were quantified by flow cytometry. Dynamic adhesion (B): PKH26-labeled-CEMT4 were overlaid onto endothelial monolayer, in flow condition during 5 min. Adherent cells were visualized on Zeiss Axiovert 200 M fluorescent inverted microscope and a minimum of 10 photos per slide were taken. Results are expressed as the adhesion ratio: number of labeled cells bound to one adherent EC (mean from 2 experiments performed in triplicate, for static adhesion, or duplicate, for dynamic adhesion, \pm SEM; * $p < 0.05$).

time as phosphorylation of ser1177-eNOS and NO[•] production by human iliac artery ECs [34]. Our present results demonstrate that NO[•] is directly responsible for this decrease in PECAM-1/CD31 expression and potentially in the PECAM-1/CD31-PECAM-1/CD31 interactions leading to inter-EC adhesion. Consequently, PECAM-1/CD31 seems to be a major adhesion molecule involved in angiogenesis and in its NO[•]-inhibition.

Besides PECAM-1/CD31, Kevil *et al.* [31] reported the involvement of ICAM-1/CD54 in migration by using mouse aortic ECs knocked-out for ICAM-1/CD54. Several papers described a down-regulation of this molecule in macrovascular models and/or after TNF α activation [16,35]. We show here, at the opposite, that ICAM-1/CD54 expression increases strongly after NO[•] treatment or in hypoxic culture. Our results are concordant with those of Radisavljevic *et al.* [36] also obtained with microvascular ECs but from rat brain and upon VEGF treatment.

A very interesting observation is the VE-cadherin/CD144 induction by NO[•] in an organospecific manner (only on lymph node ECs). A similar VE-cadherin/CD144 induction was observed by Chang *et al.* [37] on rat placental trophoblasts, after VEGF, SNP or L-arginine stimulation. Furthermore, VE-cadherin/CD144 and iNOS have been

shown to colocalize on ECs in human periapical granulomas and the authors suggested a NO[•] regulation of the adhesion molecule [38]. We have clearly demonstrated here the first direct observation of VE-cadherin/CD144 induction by NO[•] in a human microvascular endothelial model.

Altogether, these results show that high concentrations of NO[•] prevent ECs from interacting and therefore forming pseudo-vessels mainly by decreasing PECAM-1/CD31, which appears essential for EC migration, EC adhesion and angiogenesis. The increase in ICAM-1/CD54 and VE-cadherin/CD144 on HPLNEC.B3 may be a substitution mechanism for the inhibition of PECAM-1/CD31. Nevertheless, none of them is sufficient to restore angiogenesis. All our results are in agreement with the reported increase of endothelium vascular permeability by NO[•] [39,40]. Finally, the inhibition of endothelial interactions in hypoxia, mimicking tumor microenvironment, may explain why tumor vascular permeability is higher than in normal vessels, leads to a chaotic angiogenesis and make it possible metastasis dissemination in lymph nodes.

Beside angiogenesis, leukocyte recruitment, which is crucial in host defense against tumor, has been shown to be down-regulated by NO[•] [13,26] and is reported to involve several widely described

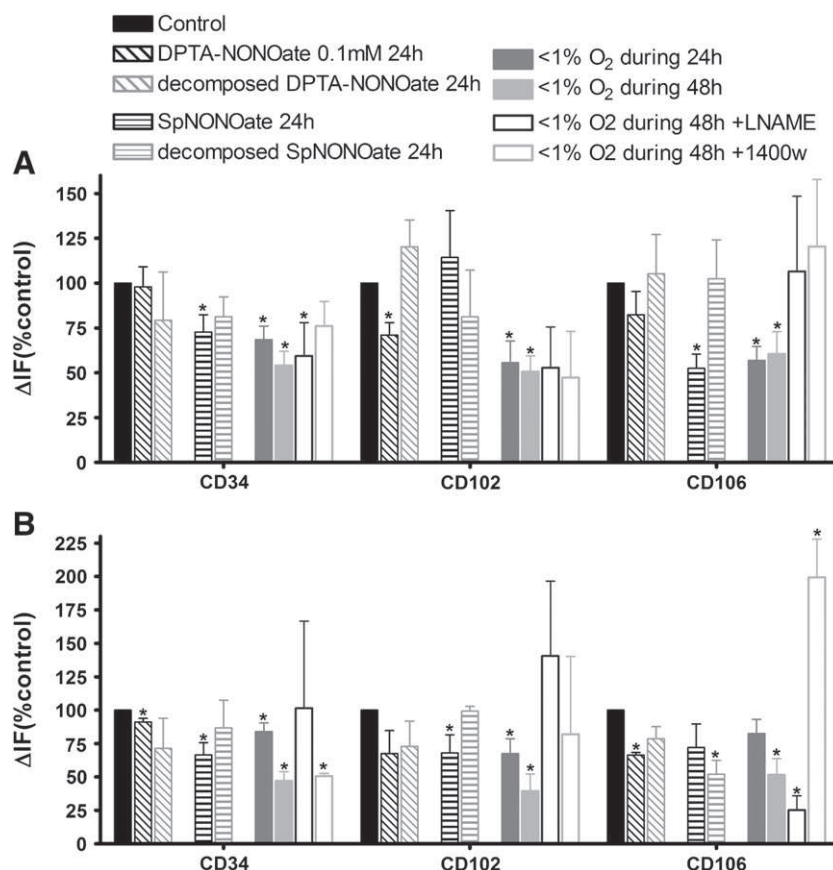


Fig. 8 – Role of NO donors or hypoxia on expression of adhesion molecules involved in leukocyte recruitment. Cells were treated by NO donors, decomposed NO donors (0.1 mM) or maintained in hypoxia (1%O₂) during 24 h or 48 h, with or without NOS inhibitors then they were labeled with specific antibodies against various adhesion molecules and incubated with a fluorescent secondary antibody. Fluorescence was quantified by flow cytometry. Changes in adhesion molecule expression on HPLNEC.B3 (A) and HSKMEC (B) are shown as % of the relative fluorescence intensity related to the relative fluorescence intensity of non-treated cells (mean from 3 to 6 experiments \pm SEM; * $p < 0.05$).

adhesion molecules [41]. Interestingly, we demonstrate here that static and in-flow adhesion processes, mimicking two distinct steps of cell recruitment, do not involve the same molecules on the two cell lines. Static conditions showed CD34-VCAM-1/CD106 and in-flow conditions ICAM-1/CD54-ICAM-2/CD102 to be involved in lymph node EC, versus only ICAM-1/CD54 in skin EC adhesion. We report here that NO[•] produced either by NONOates or by hypoxia is able to decrease leukocyte adhesion on endothelial cells either in static or in dynamic conditions according to the origin of the cell line. Based on the above considerations, we investigated the role of NO[•] on the main adhesion molecules involved in leukocyte recruitment.

CD34, one of the counterreceptors of L-selectin, is known as a hematopoietic marker and is shown to play a role in endothelial progenitor recruitment and in lymphocyte adhesion and trafficking [42]. Its fundamental role in lymphocyte homing in secondary lymphoid organs may explain its higher expression on ECs from lymph nodes than from skin and its involvement in interactions between EC and leukocytes in static conditions. CD34 expression is shown to be preferentially down-regulated by spermine-NONOate or long hypoxia treatment on lymph node and skin ECs, suggesting its modulation by high NO[•] concentration.

ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106 and ICAM1/CD54, three immunoglobulin-like cell adhesion molecules, are able to interact with integrins to induce transmigration. ICAM-1/CD54 is the main cell adhesion molecule mediating strong adhesion [43]. Besides, VCAM-1/CD106 is described to support leukocyte rolling, firm adhesion and transcellular migration [44], whereas ICAM-2/CD102 is only implicated in the last step [45]. Several groups have shown an inhibition of VCAM-1/CD106 and ICAM-1/CD54 expression by NO[•] after cytokines stimulation, but only few cases correlated with rolling modulation [13,16]. Our results demonstrate the involvement of VCAM-1/CD106 only in static adhesion, suggesting its implication in the late steps of the recruitment. Its down-regulation by DPTA-NONOate and in hypoxic culture on skin ECs correlates with the inhibition of both static and in-flow leukocyte adhesion. VCAM-1/CD106 is decreased by spermine-NONOate and in hypoxia on lymph node EC whereas adhesion is not affected, suggesting a more important role of NO[•] in the modulation of cell recruitment in the primary site of melanoma than in lymph node. At the opposite, ICAM-2/CD102 is significantly decreased only on lymph node cells in hypoxia, while adhesion is not affected, confirming that ICAM-2/CD102 may be involved in late events. Although all these immunoglobulin-like cell adhesion molecules

present a comparative regulation of transcription [46], it is important to underline that their regulation by NO[•] is different, showing a high level of complexity of these mechanisms.

To summarize according to its concentration, exogenous NO[•] induces an inhibition of cell interactions linked to the down-regulation of several adhesion molecule expressions. The same inhibitions are induced by hypoxic culture being attributable to NO[•] generation from L-arginine by NO synthases or not.

These observations, showing a decrease in leukocyte–endothelial interactions following NO[•] treatment, together with hypoxia, contribute to explain tumor cell escape from immune surveillance, in particular from melanoma primary site, and suggest a possible therapy by microenvironmental NO[•] modulation.

In conclusion, our data prove that NO[•] is able to modulate the expression of adhesion molecule and regulates cellular mechanisms, like angiogenesis and leukocyte rolling by modifying cell adhesion. These modulations are dependent on shear stress, kinetics of NO[•] liberation, its local concentration as well as endothelial cell origin. In addition to their different adhesion molecule expression pattern, ECs present an organospecific response to NO[•]. Finally, our results demonstrate that the static and in-flow cell adhesion processes may require distinct adhesion molecules, which depend on the origin of the ECs. We have demonstrated here a new level of organospecificity of ECs uncovering the differential role of NO[•] and pointing out different main mechanisms of cell recruitment.

Acknowledgments

Authors want to thank Michèle Mitterrand, Alan Guichard and Aurore Cléret for their technical skilful help, the CBM cytometry platform with David Gosset for technical assistance, in particular, with FACS and microscopy analyses, and finally Agata Matejuk and Myron Waxdal for their help in correcting the manuscript.

REFERENCES

- [1] E.A. Grimm, J. Ellerhorst, C.-H. Tang, S. Ekmekcioglu, Constitutive intracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society* 19 (2008) 133–137.
- [2] B. Fitzpatrick, M. Mehibel, R.L. Cowen, I.J. Stratford, iNOS as a therapeutic target for treatment of human tumors, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*. 19 (2008) 217–224.
- [3] S. Ekmekcioglu, J.A. Ellerhorst, V.G. Prieto, M.M. Johnson, L.D. Broemeling, E.A. Grimm, Tumor iNOS predicts poor survival for stage III melanoma patients, *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*. 119 (2006) 861–866.
- [4] F. Coulet, S. Nadaud, M. Agrapart, F. Soubrier, Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter, *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) 46230–46240.
- [5] T. Presley, K. Vedam, M. Velayutham, J.L. Zweier, G. Ilangovan, Activation of Hsp90-eNOS and increased NO generation attenuate respiration of hypoxia-treated endothelial cells, *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 295 (2008) C1281–C1291.
- [6] C. Gautier, E. van Faassen, I. Mikula, P. Martasek, A. Slama-Schwok, Endothelial nitric oxide synthase reduces nitrite anions to NO under anoxia, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341 (2006) 816–821.
- [7] I. Mikula, S. Durocher, P. Martasek, B. Mutus, A. Slama-Schwok, Isoform-specific differences in the nitrite reductase activity of nitric oxide synthases under hypoxia, *The Biochemical Journal* 418 (2009) 673–682.
- [8] T.M. Millar, C.R. Stevens, N. Benjamin, R. Eisenthal, R. Harrison, D.R. Blake, Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions, *FEBS Letters* 427 (1998) 225–228.
- [9] L.A. Ridnour, D.D. Thomas, S. Donzelli, M.G. Espey, D.D. Roberts, D.A. Wink, J.S. Isenberg, The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology, *Antioxidants Redox Signaling* 8 (2006) 1329–1337.
- [10] D.D. Thomas, M.G. Espey, L.A. Ridnour, L.J. Hofseth, D. Mancardi, C.C. Harris, D.A. Wink, Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004) 8894–8899.
- [11] J.S. Isenberg, L.A. Ridnour, E.M. Perruccio, M.G. Espey, D.A. Wink, D.D. Roberts, Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 13141–13146.
- [12] M.K. Jones, K. Tsugawa, A.S. Tarnawski, D. Baatar, Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318 (2004) 520–528.
- [13] J.L. Shelton, L. Wang, G. Cepinskas, R. Inculet, S. Mehta, Human neutrophil-pulmonary microvascular endothelial cell interactions in vitro: differential effects of nitric oxide vs. peroxyntirite, *Microvascular Research* 76 (2008) 80–88.
- [14] D. Wong, R. Prameya, V. Wu, K. Dorovini-Zis, S.R. Vincent, Nitric oxide reduces T lymphocyte adhesion to human brain microvessel endothelial cells via a cGMP-dependent pathway, *European Journal of Pharmacology* 514 (2005) 91–98.
- [15] T. Waldow, W. Witt, E. Weber, K. Matschke, Nitric oxide donor-induced persistent inhibition of cell adhesion protein expression and NFkappaB activation in endothelial cells, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society* 15 (2006) 103–113.
- [16] R. De Caterina, P. Libby, H.B. Peng, V.J. Thannickal, T.B. Rajavashisth, M.A. Gimbrone, W.S. Shin, J.K. Liao, Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines, *The Journal of Clinical Investigation* 96 (1995) 60–68.
- [17] C. Kieda, M. Paprocka, A. Krawczenko, P. Załecky, P. Dupuis, M. Monsigny, C. Radzikowski, D. Duš, New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes, *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research* 9 (2002) 247–261.
- [18] Y. Baumer, D. Funk, B. Schlosshauer, Does telomerase reverse transcriptase induce functional de-differentiation of human endothelial cells? *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (2010) 2451–2465.
- [19] I. Arnaoutova, J. George, H.K. Kleinman, G. Benton, The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art, *Angiogenesis* 12 (2009) 267–274.
- [20] A. Bikfalvi, E.M. Cramer, D. Tenza, G. Tobelem, Phenotypic modulations of human umbilical vein endothelial cells and human dermal fibroblasts using two angiogenic assays, *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 72 (1991) 275–278.
- [21] W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *The Biochemical Journal* 357 (2001) 593–615.
- [22] M.-Z. Jiang, H. Tsukahara, Y. Ohshima, Y. Todoroki, M. Hiraoka, M. Maeda, M. Mayumi, Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression and

- NF-kappaB activation in human dermal microvascular endothelial cells, *Life Sciences* 75 (2004) 1159–1170.
- [23] M.-Z. Jiang, H. Tsukahara, K. Hayakawa, Y. Todoroki, S. Tamura, Y. Ohshima, M. Hiraoka, M. Mayumi, Effects of antioxidants and NO on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression in human pulmonary microvascular endothelial cells, *Respiratory Medicine* 99 (2005) 580–591.
- [24] E. Langenkamp, G. Molema, Microvascular endothelial cell heterogeneity: general concepts and pharmacological consequences for anti-angiogenic therapy of cancer, *Cell and Tissue Research* 335 (2009) 205–222.
- [25] D. Fukumura, T. Gohongi, A. Kadambi, Y. Izumi, J. Ang, C.-O. Yun, D.G. Buerk, P.L. Huang, R.K. Jain, Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2001) 2604–2609.
- [26] S. Lindemann, M. Sharafi, M. Spiecker, M. Buerke, A. Fisch, T. Grosse, K. Veit, C. Gierer, W. Ibe, J. Meyer, H. Darius, NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression, *Thrombosis Research* 97 (2000) 113–123.
- [27] M.R. Miller, I.L. Megson, Recent developments in nitric oxide donor drugs, *British Journal of Pharmacology* 151 (2007) 305–321.
- [28] M. Ziche, L. Morbidelli, E. Masini, S. Amerini, H.J. Granger, C.A. Maggi, P. Geppetti, F. Ledda, Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P, *The Journal of Clinical Investigation* 94 (1994) 2036–2044.
- [29] T. Murohara, B. Witzenbichler, I. Spyridopoulos, T. Asahara, B. Ding, A. Sullivan, D.W. Losordo, J.M. Isner, Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19 (1999) 1156–1161.
- [30] G. Cao, C.D. O'Brien, Z. Zhou, S.M. Sanders, J.N. Greenbaum, A. Makrigiannakis, H.M. DeLisser, Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration, *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282 (2002) C1181–C1190.
- [31] C.G. Kevil, A.W. Orr, W. Langston, K. Mickett, J. Murphy-Ullrich, R.P. Patel, D.F. Kucik, D.C. Bullard, Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway, *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 19230–19238.
- [32] U. Cavallaro, S. Liebner, E. Dejana, Endothelial cadherins and tumor angiogenesis, *Experimental Cell Research* 312 (2006) 659–667.
- [33] R. Chiba, N. Nakagawa, K. Kurasawa, Y. Tanaka, Y. Saito, I. Iwamoto, Ligand of CD31 (PECAM-1) on endothelial cells increases adhesive function of alpha5beta3 integrin and enhances beta1 integrin-mediated adhesion of eosinophils to endothelial cells, *Blood* 94 (1999) 1319–1329.
- [34] E.S. Xenos, S.L. Stevens, M.B. Freeman, D.C. Cassada, M.H. Goldman, Nitric oxide mediates the effect of fluvastatin on intercellular adhesion molecule-1 and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells, *Annals of Vascular Surgery* 19 (2005) 386–392.
- [35] B.V. Khan, D.G. Harrison, M.T. Olbrych, R.W. Alexander, R.M. Medford, Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996) 9114–9119.
- [36] Z. Radisavljevic, H. Avraham, S. Avraham, Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells, *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 20770–20774.
- [37] C.-C. Chang, T.-Y. Chang, C.-H. Yu, M.-L. Tsai, Induction of VE-cadherin in rat placental trophoblasts by VEGF through a NO-dependent pathway, *Placenta* 26 (2005) 234–241.
- [38] S. Hama, O. Takeichi, M. Hayashi, K. Komiyama, K. Ito, Co-production of vascular endothelial cadherin and inducible nitric oxide synthase by endothelial cells in periapical granuloma, *International Endodontic Journal* 39 (2006) 179–184.
- [39] A. Bielawska-Pohl, S. Blesson, H. Benlalam, A. Trenado, P. Opolon, O. Bawa, V. Rouffiac, D. Dus, C. Kieda, S. Chouaib, The anti-angiogenic activity of IL-12 is increased in iNOS-/- mice and involves NK cells, *Journal of Molecular Medicine* 88 (2010) 775–784.
- [40] W.C. Sessa, Molecular control of blood flow and angiogenesis: role of nitric oxide, *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 7 (Suppl 1) (2009) 35–37.
- [41] K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nature Reviews. Immunology* 7 (2007) 678–689.
- [42] A. Suzuki, D.P. Andrew, J.A. Gonzalo, M. Fukumoto, J. Spellberg, M. Hashiyama, H. Takimoto, N. Gerwin, I. Webb, G. Molineux, R. Amakawa, Y. Tada, A. Wakeham, J. Brown, I. McNiece, K. Ley, E.C. Butcher, T. Suda, J.C. Gutierrez-Ramos, T.W. Mak, CD34-deficient mice have reduced eosinophil accumulation after allergen exposure and show a novel crossreactive 90-kD protein, *Blood* 87 (1996) 3550–3562.
- [43] C.W. Smith, Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 71 (1993) 76–87.
- [44] R.A. Carter, I.P. Wicks, Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation, *Arthritis and Rheumatism* 44 (2001) 985–994.
- [45] A.R. Schenkel, Z. Mamdouh, W.A. Muller, Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation, *Nature Immunology* 5 (2004) 393–400.
- [46] T. Collins, M.A. Read, A.S. Neish, M.Z. Whitley, D. Thanos, T. Maniatis, Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers, *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (1995) 899–909.

ANNEXE 3: Revue publiée dans *Journal of cellular and molecular medicine*

Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia

Aude Carreau, PhD student, Centre de biophysique moléculaire CNRS UPR 4301

Bouchra El Hafny-Rahbi, postdoctoral scientist, Centre de biophysique moléculaire CNRS UPR 4301

Agata Matejuk senior scientist, Department of Plastic Surgery, Laboratory of Immunology, Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Avenue, Cleveland Ohio 44195, USA.

Catherine Grillon*, senior scientist, Centre de biophysique moléculaire CNRS UPR 4301

and Claudine Kieda, research director, Centre de biophysique moléculaire CNRS UPR 4301 45071 Orléans cedex 2, France;

phone: 00 33 238 25 78 04; fax: 00 33 238 25 54 59; email: grillon@cnrs-orleans.fr

PLAN

Introduction

Imaging of hypoxic areas

Hypoxia markers
Positron emission tomography (PET)
Near-infrared spectroscopy (NIRS)
Magnetic resonance spectroscopy (MRS)
Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR)

Oxygen partial pressure measurement

Polarographic sensor
Optical sensor
Mass spectrometry

What does tumor hypoxia mean?

Small molecules and hypoxia

Chemotherapeutic drugs
Radiation sensitizers: the nitroimidazoles
Hypoxia prodrugs: tirapazimine and anthraquinone
PO₂ modulator: myo-inositol trispyrophosphate
Hypoxia mimetics: dimethyloxallyl glycine, desferrioxamine and metal ions

What does physioxia mean?

From air to blood
In brain
In lungs
In skin
In intestinal tissue
In liver
In kidney
In muscle
In bone marrow
In umbilical cord blood
To summarize physioxia

Cellular and molecular consequences of physioxia versus normoxia and hypoxia

Hypoxia inducible factors actions
Role of microRNAs in hypoxia-dependent regulations
Cell adhesion molecules: their regulation by oxygen partial pressure
Soluble molecules: example of angiogenin

Conclusion

Abstract

Oxygen supply and diffusion into tissues are necessary for survival. The oxygen partial pressure (PO_2), which is a key component of the physiological state of an organ, results from the balance between oxygen delivery and its consumption. In mammals, oxygen is transported by red blood cells circulating in a well-organized vasculature. Oxygen delivery is dependent on the metabolic requirements and functional status of each organ. Consequently, in a physiologic condition, organ and tissue are characterized by their own unique “tissue normoxia” or “physioxia” status. Tissue oxygenation is severely disturbed during pathological conditions such as cancer, diabetes, coronary heart disease, stroke, *etc.*, which are associated with decrease in PO_2 , ie “hypoxia”. In this review we present an array of methods currently used for assessing tissue oxygenation. We show that hypoxia is marked during tumor development and has strong consequences for oxygenation and its influence upon chemotherapy efficiency. Then we compare this to physiological PO_2 values of human organs. Finally we evaluate consequences of “physioxia” on cell activity and its molecular modulations. More importantly we emphasize the discrepancy between *in vivo* and *in vitro* tissue and cells oxygen status which can have detrimental effects on experimental outcomes. It appears that the values corresponding to the “physioxia” are ranging between 11% and 1% O_2 while current *in vitro* experimentations are usually performed in 19.95% O_2 , an artificial context as far as oxygen balance is concerned. It is important to realize that most of the experiments performed in so-called normoxia might be dangerously misleading.

Keywords: oxygen, normoxia, physioxia, hypoxia, oxygen partial pressure

Main topic: Biological setting, % N_2 % O_2

Introduction

Oxygen is vital for living cells; it plays a fundamental role in their metabolism. However, the simple molecular diffusion of gases in tissues, as well as nutrients is not sufficient for the metabolic needs of large, complex and active multicellular organisms. In consequence, it is necessary to provide tissues and cells with optimal oxygen concentrations.

Several strategies have been developed to maximize oxygen capture and oxygen transport into organs. In mammals, oxygen is absorbed by the lungs. Because of its poor solubility, oxygen

is bound to hemoglobin which is packaged within red blood cells. A well-organized vasculature enables the delivery of oxygenated red blood cells to the tissues. The macrovasculature allows a rapid blood circulation and the microvasculature which irrigates each organ provides locally the optimal oxygen supply. A highly controlled oxygenation of cells is vital, particularly in animals with very high metabolic requirements.

Recent knowledge, about the microenvironment significance both for normal and pathological issues, implies the tight control of *in vitro* experimental conditions to which the cells are exposed.

Oxygen is a basic component of the microenvironment required for cell activity; remarkably, *in vitro* cultures are mostly performed in a 95% air (79% N₂/21% O₂) atmosphere, supplemented by 5% of carbon dioxide, thus providing 19.95% O₂. As described in this review, these conditions are largely overestimated in terms of O₂ content of the atmosphere and do not represent the endogenous oxygen pressure of the organ the cells come from. Knowing the drastic consequences of an oxidative stress on the cell physiology, it appears fundamental to determine what are the exact levels of oxygen pressure in various tissues in normal physiology. This will allow comparing normal to pathological situations pointing out that the oxygen levels in experimental settings represent an essential parameter.

The present review is to exemplify how the oxygen partial pressure (PO₂) in tissues influences the molecular and subsequent cellular behaviors. As a result, the PO₂ used in *in vitro* experiments should be tightly controlled, in order to get as close as possible to the physiological conditions. We first provide an overview of the methods available up-to-now for assessing tissue oxygenation: imaging techniques usually used in the tumor context and PO₂ quantification techniques. The second part compiles the state of the art of the oxygen partial pressures in tumor, then, by comparison, the physiological status in various human organs. In the last part, to illustrate the primordial role of oxygen in physiology, we present and discuss several examples of significantly modulated cellular activities that depend on the oxygen level. Several units are used to define PO₂. In the international system, the pressure unit is the pascal (Pa). Other units include: the bar (1 bar = 100 kPa), the atmosphere (1 atm = 101.325 kPa), the Torr (1 torr = 133.322 Pa) and two units mostly used in medicine: the millimeter of mercury (1 mmHg = 133.322 Pa) and the percentage of oxygen (1 % = 1.013 kPa).

To distinguish between the various levels of oxygenation, the following terms are currently used: “normoxia” corresponding to atmospheric oxygen pressure, the commonly used oxygen pressure for cell cultures (i.e. around 150 mmHg or 19.95% oxygen, 20.3 kPa); “tissue

normoxia” that we also call “physioxia” for the partial pressure of oxygen measured in different organs in a physiologic condition; “hypoxia” representing a partial pressure of oxygen lower than physioxia and indicative for a lack of oxygenation in the tissue.

Imaging of hypoxic areas

The chemical and physical properties of oxygen enable a wide variety of methods adequate to mapping oxygen content *in vivo*. Techniques to visualize oxygenation are highly described in cancer studies, because hypoxia in tissues is a characteristic pathophysiological property of advanced solid tumors [1]. In this context, imaging tools that specifically target hypoxic environments are imperative for cancer diagnosis and treatment. The choice of the method, in the following studies, is based on applicability to the experimental model and the nature of information sought.

Hypoxia markers

In the development of imaging probes for tumor hypoxia, nitroimidazoles have received particular attention as hypoxia markers because of their unique behavior in hypoxic environments. 2-Nitroimidazole (azomycin) was originally found to be an antibiotic against anaerobic bacteria and protozoa in 1953 [2]. Nitroaromatics are selectively reduced by nitroreductase enzymes under hypoxic conditions to form hydroxylamine intermediates that can bind irreversibly to cellular nucleophilic groups in proteins or DNA. This property permits their antibacterial action. The irreversible retention of nitroimidazoles in the cells is also a prerequisite to differentiate normoxic from hypoxic tissue [3] (figure 1A).

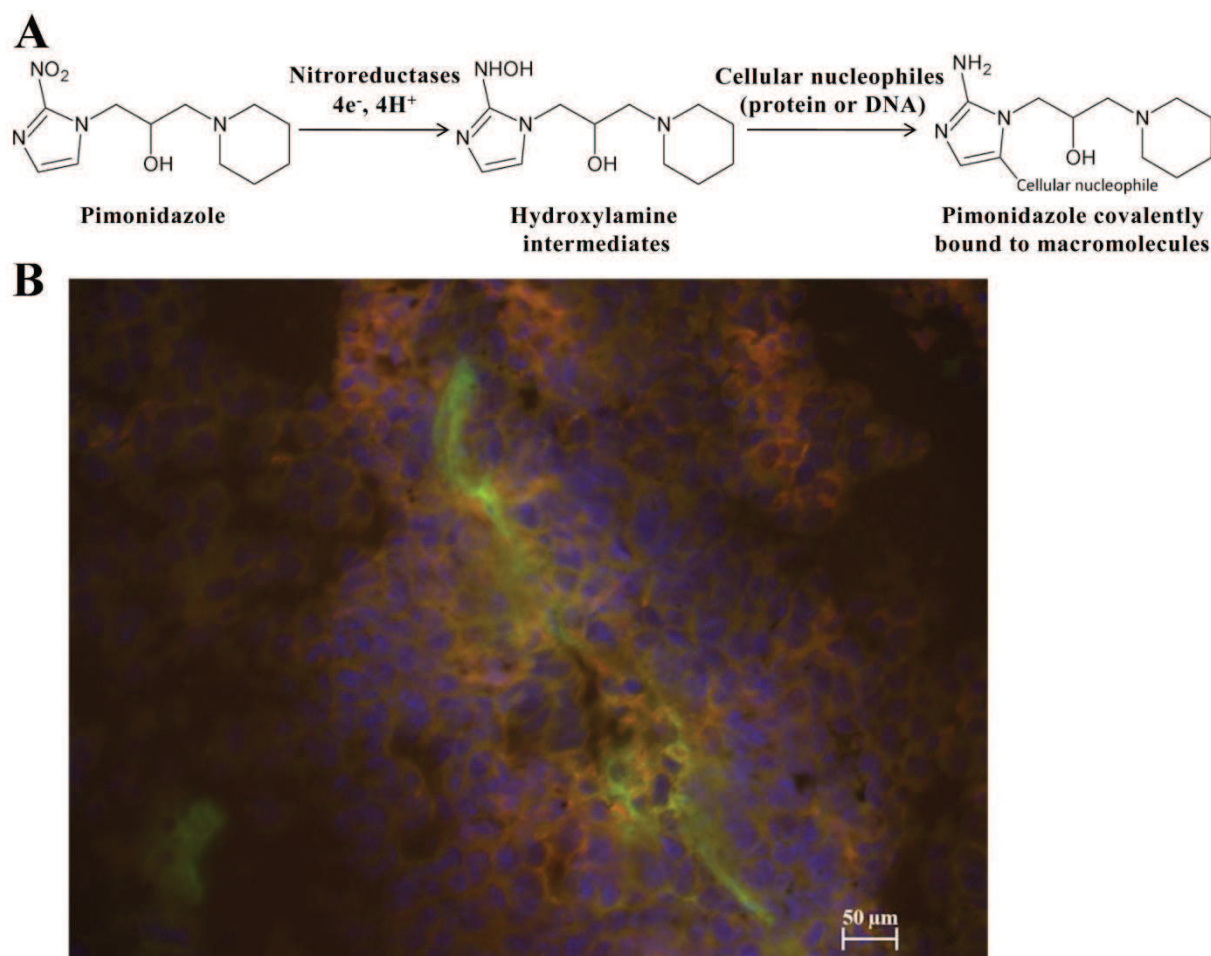


Figure 1: Nitroimidazole derivatives used as hypoxia markers. A/ Schematic of the proposed mechanism underlying the binding of pimonidazole to cellular macromolecules, as an example of nitroimidazole tracer. B/ Hypoxic sites detection in B16-melanoma induced tumor by pimonidazole binding, visualized in red. More cells are proliferating (DAPI-labeled cells in blue) close to the blood vessel. Endothelial cells lining the blood vessel wall are stained in green after incubation with a fluorescent antibody specific for PECAM-1 (CD31).

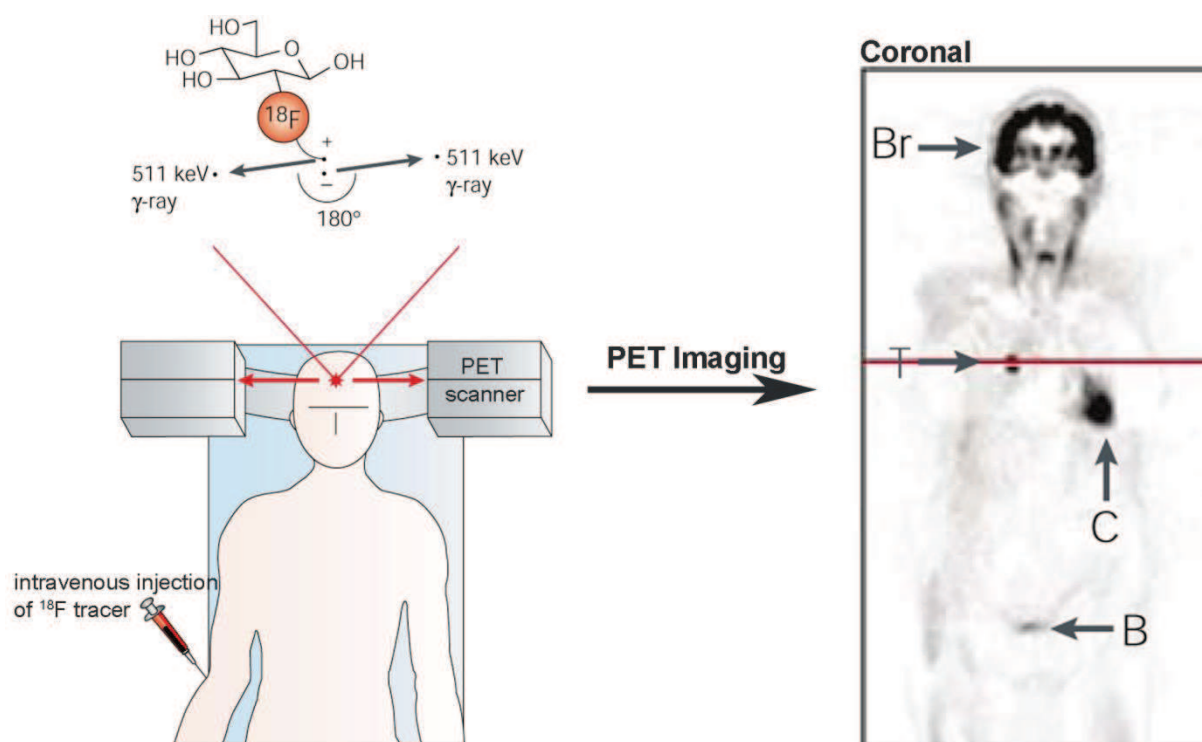
The detection of these exogenous hypoxia markers are based on immunohistochemical methods. 2-nitroimidazole derivatives, such as pimonidazole or 2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N*-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl) acetamide (EF5), are injected into the patient before surgical resection of tumor tissue. Immunohistochemical methods yield microscopic information on hypoxia in relation to tissue histology. However, such data provide only relative information on PO_2 values (figure 1B).

The pimonidazole is considered to be the “standard” exogenous hypoxic marker. This injectable molecule is commercially available. The binding of exogenous hypoxia markers such as pimonidazole to cellular macromolecules has been shown to increase dramatically below an oxygen concentration of 10 mmHg [4]. In fact, oxygen-independent staining with

anti-pimonidazole antibodies was reported, indicating that other hypoxia-independent events may occur in exogenous hypoxia markers.

Positron emission tomography (PET)

PET is an *in vivo* tomographic imaging technique. It is based on the detection of anti-parallel 511 keV photons emitted during the annihilation of positrons with electrons. PET radiotracers are physiologically and pharmacologically relevant compounds labeled with short-lived positron-emitting radionuclides. After internalization by injection or inhalation, the tracer reaches the target and the quantity is then detected with a PET scanner, with a ring-shaped array of photoelectric crystals [5] (figure 2).



adapted from Gambhir, Nature reviews Cancer, 2002.

Figure 2: Principles of positron emission tomography (PET). A ^{18}F radiotracer can be intravenously injected. The tracer decays by emitting a positron, which annihilates with a nearby electron to produce two gamma-rays. The PET scanner can detect the coincident gamma-rays, and images can be reconstructed showing the location(s) and concentration of the tracer of interest. Sectional PET image is shown: normal uptake in brain (Br) and myocardium (C), and renal excretion into the urinary bladder (B) are visible. Also seen is a tumor (T) in the lungs that takes up more ^{18}F radiotracer than the surrounding tissues. *Adapted with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer, Gambhir, copyright 2002 [5].*

The main strategy for tracer imaging of tissue hypoxia to date has involved use of compounds that are preferentially absorbed and trapped within cells in the reduced state. As the first such agent to be developed, ^{18}F - fluoromisonidazole is the gold standard and has been used to identify hypoxic tumors in human patients [6]. Because it has many disadvantages (slow clearance and low cellular uptake), newer radiotracers for hypoxia imaging have been intensively investigated. For example, Copper(II)-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) (Cu-ATSM) is a hypoxia-targeted PET agent, which displays a higher uptake (<1 h) in hypoxic tissues than the nitroimidazoles, allowing better quality images. After successful pre-clinical studies, Cu-ATSM has also been evaluated in humans [7]. Even so, the anatomical resolution of PET (approximately 4–8 mm³ in clinical and 1–2 mm³ in small animal imaging systems) is noticeably poorer than that achieved by magnetic resonance imaging. Moreover, PET can be used to calculate oxygen consumption after ^{15}O -radioisotope administration [8] or to show hypoxic area, but this technique does not allow direct PO_2 evaluation.

Near-infrared spectroscopy (NIRS)

NIRS is a non-invasive, optical technique applying the principles of light transmission and absorption to investigate dynamic changes in tissue oxygenation by measuring hemoglobin saturation [9]. NIRS uses visible light (700-1000 nm) in the near-infrared region which crosses readily through biological tissues. The NIRS signal is obtained from the absorption of light by hemoglobin in the vasculature (small arterioles, capillaries, and venules). For clinical studies, this method can be used under normal conditions without a major restriction of motion. Its main advantage is the ability to perform real-time measurements and their repeatability [10]. One drawback of the NIRS method is that it does not measure tissue PO_2 but provides information on vascular oxygenation (oxygen saturation), which results from the balance between oxygen delivery and oxygen consumption [11].

Magnetic resonance spectroscopy (MRS)

MRS is an application of magnetic resonance imaging (MRI) whereby spectra of metabolic changes in living tissue are obtained. In 1988, Busse *et al.* [12] showed that MRI could be used for imaging tumor PO_2 *in vivo*, after intravenous injection of perfluorocarbon (PFC) probes. This technique is referred as ^{19}F -MRI. Mason *et al.* [13] used hexafluorobenzene because it gives a single, narrow ^{19}F -MRI signal and is highly sensitive to oxygen concentration compared to the rest of PFCs. In fact, the ^{19}F spin lattice relaxation rate (R1) of

PFCs varies linearly with the dissolved oxygen concentration, thus, the ^{19}F -based oximetry reports absolute values of oxygen concentration [14]. An example of monitoring hypoxia of rat tumor is presented in figure 3.

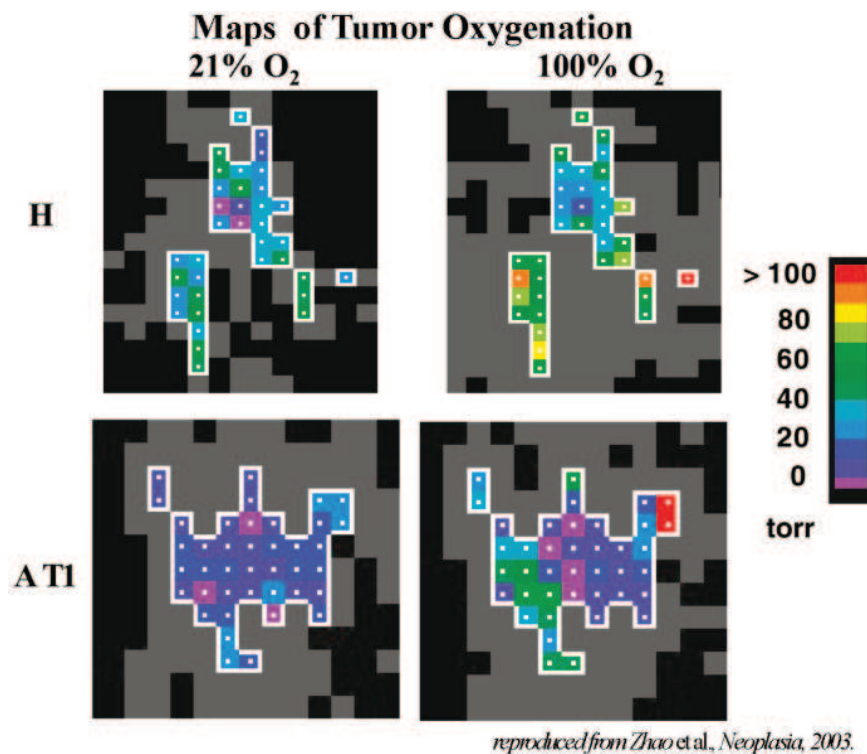


Figure 3: PO₂ maps of rat tumors obtained using ^{19}F nuclear magnetic resonance using hexafluorobenzene as the reporter molecule. The H tumor (a well-differentiated and slow-growing tumor) was significantly better oxygenated than the AT1 tumor (an anaplastic and faster-growing subline). In response to oxygen inhalation, pO₂ increased significantly in both the H and the AT1 tumors. *Adapted with permission from Neoplasia press, Zhao et al., 2003 [14]*

Two other MRI techniques such as blood oxygen level-dependent MRI (BOLD-MRI) [15] and dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI) [16] have been applied to measure oxygenation into inaccessible tissue. BOLD-MRI, also referred to flow and oxygenation dependent (FLOOD) MRI, reflects the changes in the amount of oxygen bound to hemoglobin in blood. The blood content of deoxyhemoglobin (a paramagnetic species) compared to oxyhemoglobin (nonparamagnetic) induces differences in susceptibility (i.e., changes in the local magnetic field) around the blood vessels. This affects the relaxation properties of the surrounding protons. The major disadvantage of the BOLD oximetry is that it does not provide the absolute oxygen concentration in tissue but only the changes in blood oxygenation [17].

In the last several years, DCE-MRI has emerged as a promising method for measuring perfusion including blood flow and blood volume in tissue. This technique makes the use of

paramagnetic contrast agent, mostly consisting of a low-molecular-weight gadolinium (Gd)-based tracer. However, by itself, DCE-MRI cannot provide a comprehensive picture of oxygen status. Much of the success of DCE-MRI, to date, can be attributed to its ability to provide high resolution images of tumor that depict perfusion and permeability of the smallest vessels, especially the capillary network.

Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR)

EPR (or electron spin resonance, ESR) presents the unique capability to detect unpaired electrons. Thus, it can provide information about the composition and chemical features of a milieu or a tissue including oxygenation. The measurement of oxygen concentration by EPR (EPR oximetry) involves the use of an external probe (most commonly lithium phthalocyanine) consisting of either implantable paramagnetic particles, or soluble probe molecules (nitroxides) that physically interact with, but do not consume oxygen [18]. The changes in the EPR signal caused by the interaction of two paramagnetic species, molecular oxygen and the probe, allow determining PO_2 . The EPR characteristics which appear to be potentially advantageous include the capability of making repeated measurements at the same sample, site-specificity and accuracy of the obtained information. However, although paramagnetic ions that, such as nitroxides, are likely to be used in EPR studies and unlikely to have significant toxicity, they have not yet been fully tested in human patients [19]. Also, with existing instrumentation, the sensitivity of the non-invasive method is restricted to 10 millimeters from the surface of the body.

Oxygen partial pressure measurement

The previous techniques achieve a precise imaging of hypoxic area, most often by labeling the oxygen content in a tissue. However, these tools provide information on the relative oxygenation, but they fail quantifying PO_2 and allowing comparable data between techniques. On the contrary, the following techniques directly measure PO_2 . As previously, the choice of the method is based on its applicability to the experimental model and the nature of information sought.

Polarographic sensor

The polarographic PO_2 electrode has been considered as the “gold standard” for measuring oxygen tension [20]. Oxygen electrodes for the measurement in tissue and microcirculation

are conventionally based on the classical Clark's electrode [21]. This type of electrodes consists of a noble metal (e. g. silver, gold and platinum) which reduces oxygen due to a negative polarizing voltage. The difference in voltage between the reference electrode (anode) and the measuring electrode (cathode) is proportional to the amount of oxygen molecules being reduced on the cathode. In the Clark's electrode, both the anode and cathode are placed behind an oxygen-permeable and electrically insulating membrane.

Measurements with the polarographic electrode probe are made by rapidly stepping a 300-micron needle electrode through the tissue, thus providing an assessment of oxygenation in the local microenvironment. This technology has been used for several decades and was, up to recent dates, the only technique that could directly measure tissue PO_2 .

However, despite the relative ease to use this device, several important disadvantages need to be reported. First, the needle electrode cannot measure oxygenation in a given micro-region over time because it consumes oxygen during the measurement process. To obtain reliable measurements, O_2 consumption by the electrode should be minimal compared to O_2 tension within the tissue, otherwise the electrodes alter their own O_2 environment. Second, the use of a needle is invasive and potentially damages the tissue. Miniaturized electrochemical sensors have two major advantages compared to larger electrodes: shorter time of responses and better spatial resolution. Third, as needle tip oxygen electrodes measure PO_2 at a single point, the heterogeneous oxygen distribution in the tissues is not represented. Lübbers and co-workers [22] overcame this problem by using a device which punctures the tissue in a stepwise manner; they were thus able to show the expected heterogeneity and distribution of quantitatively measured PO_2 . Last, the median PO_2 values vary widely among the different laboratories although they are using the same model, thus requiring several comparative studies [23].

Optical sensor

Recently, an optic fiber-based system has been developed based on PO_2 -dependent changes in lifetime of the pulse of a fluorescent dye placed at the tip of a probe. The most commonly used fluorescent dye is ruthenium chloride. The oxygen in tissue or fluids quenches the light emitted by ruthenium; the light quenching is proportional to oxygen tension in the vicinity of the dye. Oxygen is not consumed during the reaction, so a continuous readout of tissue PO_2 can be obtained [24]. An example of PO_2 measurement is presented in figure 4.

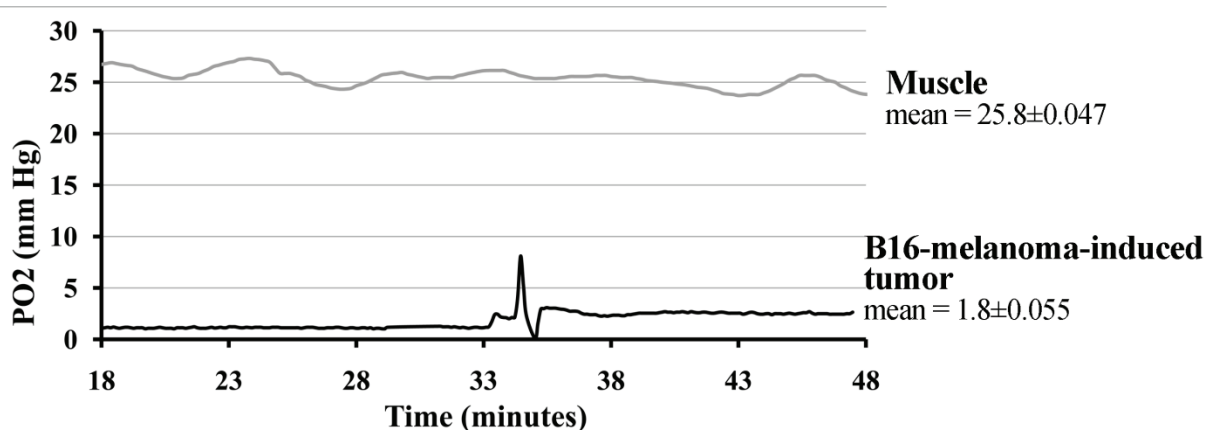


Figure 4: B16-melanoma-induced tumor and muscle PO₂ measured using polarographic needle, in mouse. B16 tumor cells are injected subcutaneously in mouse and PO₂ tumor is measured after 14 days, in comparison to the healthy muscle tissue. Experiment representative of 5 (mean ± SEM).

The emitted fluorescent light is transmitted through an optical fiber to a microprocessor which quantifies the changes compared to calibration data [25]. This process does not consume oxygen, but relies solely on the amount of oxygen present. The optic-fiber probe can stay in a position for a long period of time, which allows measuring both temporal PO₂-changes as well as the effect of tissue oxygen modifying agents.

Mass spectrometry

The mass spectrometry principle consists of ionizing chemical compounds to generate charged molecules and the measurement of their mass-to-charge ratios. Moreover, this technique permits the quantification of the amount of a compound in a sample. In consequence, molecular oxygen can be identified and measured quantitatively by mass spectrometry. For example, Seylaz *et al.* [26] were able to measure gas partial pressures, including PO₂, of rabbit brain. They used a single cannula implanted stereotaxically in a given structure, then sampled a part of the organ and analyzed gases in it. The measurements of PO₂ were continuous and quantitative. The invasiveness and the time of response make mass spectrometry less attractive than the other methods [27].

What does tumor hypoxia mean?

As described above, numerous techniques have been developed over the past decades to evaluate the oxygenation status of tumors, but none has entered widespread clinical use. The critical PO₂ in tumors is proposed to be 8-10 mmHg [28]. Below this level, detrimental changes associated with reduced oxygen consumption have been observed (ATP depletion,

intracellular acidosis, apoptosis...). For example, this is confirmed in human renal carcinoma, in which mean PO₂ value was measured at 9.6 mmHg [29] using a polarographic oxygen sensor probe. In the same way, median PO₂ was 6 mmHg within human liver tumors [1]. Even if tumors could present higher level of oxygenation than 10 mmHg, PO₂ value is always lower in the tumor than in the respective normal tissue, which is the true definition of hypoxia. Oxygenation in primary brain tumors has been measured at 13 mmHg in 104 cases, the fraction of strong hypoxia (≤ 2.5 mmHg) representing 26% [1]. In comparison, normal oxygenation of brain tissue is assured when PO₂ reaches 35 mmHg, as reported in the next section.

In fact, these discrepancies in the oxygenation pattern are partially explained by strong inter-tumor variability. Measurements of tumor oxygenation within 28 tumors with 12 different histologies [30] exhibited an overall PO₂ ranging from 0 to 54 mmHg (median = 24 mmHg). Moreover, an inadequate perfusion in the tumor, due to severe abnormalities of the tumor microcirculation, causes a heterogeneous distribution of hypoxic and/or anoxic tissue area.

In conclusion, hypoxia is an independent negative prognostic indicator in solid tumors, but intratumoral PO₂ cannot be predicted by size, grade or histology of the tumor, but is, in part, dependent on the initial oxygenation status of the host tissue.

Small molecules and hypoxia

Chemotherapeutic drugs

Tumor cells are highly unresponsive to most anticancer drugs [31]. Tumor blood vessels are chaotic, leaky and disorganized. This results in a poor perfusion efficacy, reduced oxygen delivery to tumor cells and induction of chronic hypoxia. This lack of O₂ in tumors tends to select cells with stronger malignant phenotype. Moreover increased DNA mutations in tumor cells activate genes that influence the uptake, metabolism and export of drugs, in favor of tumor survival. For example, in tumor cells P-glycoprotein expression and multidrug resistance receptors are enhanced [32]. Furthermore, modifications in sensitivity to p53-mediated apoptosis and in DNA mismatch repair make cells be resistant to platinum-based chemotherapeutic agents (as carboplatin or cisplatin) [33,34]. Transient hypoxia can also disturb protein folding in the endoplasmic reticulum, which confers to tumor cells resistance to topoisomerase II-targeted drugs [35] as etoposide, doxorubicin *etc.*

The abnormal structure and function of tumor vasculature make it inefficient for red blood cells mediated oxygen supply as well as blood-borne drug delivery. The distribution of many

drugs within tumors is also heterogeneous, therefore only a portion of the target tumor cells is exposed to a potentially lethal concentration of the cytotoxic agent.

Moreover cell proliferation decreases as a function of its distance from blood vessels, an effect that is at least partially due to hypoxia [36]. This relatively low rate of cell proliferation in hypoxia limits the effectiveness of chemotherapeutic drugs active mainly against highly proliferative cells. Thus, many anticancer agents such as methotrexate, 5-fluorouracil, doxorubicin, carboplatin, melphalan, bleomycin, etoposide *etc.* have reduced *in vitro* cytotoxicity in experimental hypoxic conditions.

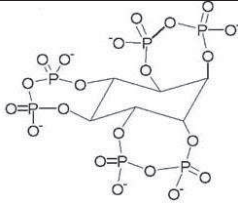
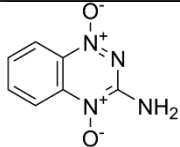
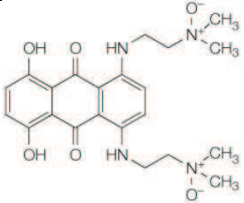
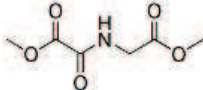

Radiation sensitizers: the nitroimidazoles

Nevertheless, by its specificity and its major role in drug resistance, tumor hypoxia represents a unique and attractive target to develop strategies for cancer therapy. For this reason studies were conducted on drugs that are selectively toxic against hypoxic cells. For example, nitroimidazoles could mimic the effects of oxygen and thereby sensitize hypoxic cells to radiation. In clinical trials, radiotherapy added to nitroimidazoles (metronidazole, misonidazole and etanidazole) did not result in significant improvements over radiotherapy alone, mainly because the overall toxicity of these derivatives prevented them from being given at high enough doses [37].

Hypoxia prodrugs: tirapazimine and anthraquinone

Another strategy uses hypoxia-activated prodrugs. Tirapazimine is the first compound to be developed specifically as a hypoxic cytotoxin and whose clinical development has been the most important [38] (Table 1). This benzotriazine di-N-oxide is selectively activated by multiple reductases to form free radicals in hypoxic cells thereby resulting in radical damage directly to the topoisomerase II enzyme [39] or to DNA. Despite the very promising results obtained in various preclinical studies, survival benefit is not clearly demonstrated in clinical trials [40,41].

Table 1: Examples of small molecules targeting or mimicking hypoxia. Their chemical structure, mechanism.

Small molecules			
	Structure	Mechanism	References
<i>PO₂ modulator</i>			
myo-inositol triphosphate (ITPP)		Allosteric effector of hemoglobin	[42-44]
<i>Hypoxia-activated prodrugs</i>			
Tirapazimine		Forms free radicals when activated	[38-41]
anthraquinone (AQ4N)		Cytotoxic when reduced to AQ4	[45]
<i>Hypoxia mimetics</i>			
Dimethyloxallyl glycine (DMOG)		Inhibition of prolyl-4-hydroxylase by competition with the substrate	[46,47]
Desferrioxamine		Inhibition of prolyl hydroxylase by Fe ²⁺ chelation of the catalytic core	[48,49]
Metal ions (for example, Co ²⁺ and Cu ²⁺)		Inhibition of prolyl hydroxylase by substitution for Fe ²⁺ of the catalytic core	[49,50]

The only other hypoxia-activated prodrug now in clinical trials is the anthraquinone AQ4N (Table 1). AQ4N is a prodrug of a potent DNA intercalator/topoisomerase poison, AQ4. AQ4N has substantial activity against hypoxic cells in various transplanted tumors [42] and has recently completed a Phase I clinical trial.

PO₂ modulator: myo-inositol trispyrophosphate

At the opposite of these drugs whose activity is modified by hypoxia, myo-inositol trispyrophosphate (ITPP) is, as we know, the only compound able to directly modulate PO₂. ITPP acts as an allosteric effector, by enhancing the capacity of hemoglobin to release bound oxygen [43]. This leads to higher oxygen tension in the hypoxic environment, and thus inhibits hypoxia-induced angiogenesis. ITPP is a promising molecule for cancer [43] as well as heart failure [44] therapies, by restoring physiologic level of oxygenation in hypoxic tissues (Table 1). Such a molecule could be beneficially used to combine and potentialize drugs that preferentially induce apoptosis of endothelial cells in the tumor as DMXAA [45] and that was recently shown to act through the redox pathway [46].

Hypoxia mimetics: dimethyloxallyl glycine, desferrioxamine and metal ions

For tumor hypoxia modeling *in vitro*, the use of a hypoxia chamber, in which 95% N₂/5% CO₂ gas mixture was introduced up to obtain the desired PO₂, was the technique of choice. Small molecules mimicking the hypoxic signal were also attractive tools. Dimethyloxallyl glycine, desferrioxamine and metal ions were commonly used as hypoxia mimetics (Table 1). In general, these molecules block the catalytic activity of prolyl-hydroxylases, an oxygen sensor able to inactivate HIF1 α activity in normoxic conditions.

This shows how meaningful the knowledge of the oxygen status in normal compared to pathological tissues can be for the design of diagnosis settings, on the one hand, and for therapeutic strategies, on the other hand. This led us to define the physioxia concept.

What does physioxia mean?

The fundamental purpose of the vasculature is to deliver oxygen and nutrients to the cells and to remove dioxide (and other metabolic products) from them. Therefore, oxygenated blood is distributed in each tissue according to its function and its needs. These differ from one tissue to the other. A balance is consequently established between the supply/consumption and retrieval/loss. This is the reason why studying the biology of distinct cell types in the same so-called “normoxia” is not scientifically correct.

From air to blood

Oxygen is carried through the body from the breathed air to the various organs. This transport occurs in two different media: a gaseous medium (air and airways), then a liquid medium

(blood). First, the oxygen transport is primarily achieved by breathing movements, helping the oxygen to go into lungs during the inspiration. Then, oxygen diffuses passively across the alveolar-capillary membrane in the blood, according to concentration gradients. Partial oxygen pressures during the transport from air to the blood that are considered as physiologic in human are indicated in figure 5.

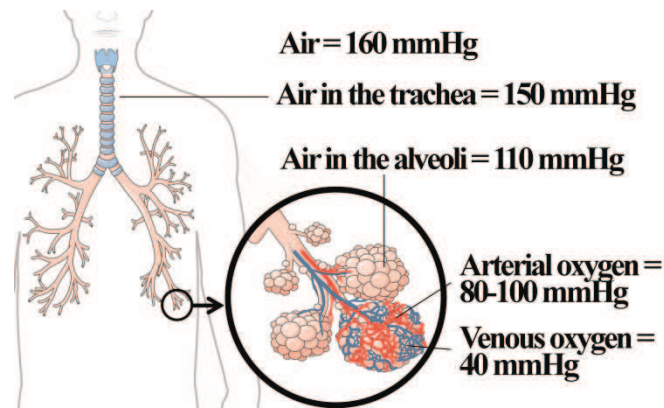


Figure 5 : Delivery of oxygen from the atmosphere to the blood, in human and “normal” partial pressure of oxygen (PO₂) in millimeter of mercury (mmHg). *Figure was produced using Servier Medical Art. <http://www.servier.com>*

In brain

The inability of the brain to store metabolic products, despite its high oxygen and glucose requirements, makes it very susceptible to ischemic alterations/damages. It is the reason why brain is actively studied in terms of oxygen monitoring.

The partial oxygen pressure in the brain extra-cellular fluid results from the balance between oxygen delivery and consumption, and is influenced by changes in capillary perfusion. It reflects the availability of oxygen for oxidative energy-dependent (ATP dependent) activity and, therefore, brain activity. To measure oxygen partial pressure in the brain, the two most commonly used systems to date are electrodes (Licox and Neurotrend). Using probes, Assad *et al.* [53] first reported average PO₂ values to be 33-36 mmHg in the brain of 3 patients. Meixensberger *et al.* [54] measured the brain tissue PO₂ after craniotomy and opening of the *dura mater* in 26 patients and determined a pressure of 48 mmHg as normal values. In the same way, Hoffman *et al.* [55] used a sensor inserted 4 cm deep into the cortex of patients after craniotomy and opening of the *dura*. Out of six patients with a noncompromised brain circulation, were found a tissue PO₂ of 37 ± 12 mmHg.

Dings *et al.* [56] in 1998 undertook complete monitoring of brain tissue oxygen partial pressure as a function of the depth underneath the *dura* level. The heterogeneity of brain PO₂

levels was determined by measurements performed on 27 patients, by removing the brain-inserted probe in a stepwise manner. The mean PO₂ was shown to decrease with the brain depth (23.8 ± 8.1 mmHg at 22 to 27 mm below the dura, 25.7 ± 8.3 mmHg at 17 to 22 mm, 33.0 ± 13.3 mmHg at 12 to 17 mm and 33.3 ± 13.3 mmHg at 7 to 12 mm).

Scientific community agrees to say that if the brain tissue PO₂ is above 35 mmHg (4.6%), normal oxygenation of the brain tissue should be assured.

In lungs

In clinical analysis, evaluation of tidal breathing (air volume inhaled and exhaled during restful/normal breathing) and alveolar O₂ pressure are the most studied oxygen status-related parameters. While breathing in, oxygen partial pressure ranges around 160 mmHg, it moves down along a gradient to about 100-120mmHg in the alveolus. These data concern air oxygen. In fact, only few papers discuss the oxygen partial pressure inside the tissue. Using a polarographic electrode in twenty patients the median normal lung PO₂ was found to range from 23 to 656 mmHg (median, 42.8) [57]. Variability was explained by three patients with extremely high lung PO₂ resulting from incomplete lung breathing out during measurements using Eppendorf type microelectrode.

In skin

Much of the experimental work on skin has been limited to estimation of mean tissue PO₂ from measurements of transcutaneous PO₂ or has used needle electrodes that were large relative to the dermal papilla. Therefore we focused on the spatial distribution of PO₂ related to the arrangement of the cutaneous microcirculation.

Wang *et al.* [58] published the study of spatial variations of PO₂ measurements in human skin using microelectrodes. The outer layers of human skin consist of dermal papillae and epidermis. The subpapillary plexus gives rise to a single papillary loop in each dermal papilla. Epidermis is the outer layer of the skin, composed of terminally differentiated stratified squamous epithelium and not vascularised.

In the superficial region of the skin (5-10 µm), PO₂ was approximately 8.0 ± 3.2 mmHg (n = 6). The value increased to 24.0 ± 6.4 mmHg (n = 8) in dermal papillae (45-65 µm), and at the depth just above the sub-papillary plexus (100-120 µm), PO₂ was approximately 35.2 ± 8.0 mmHg (n = 9). These data demonstrate that PO₂ increases with depth from the surface of the skin to the dermis.

Although there is now a strong evidence that O₂ may enter the skin from the atmosphere, this paper shows that, when this is prevented, oxygen supply to the epidermis and superficial dermis can be maintained by the papillary microcirculation, suggesting a regulation of the papillary microcirculation to achieve the O₂ requirements of the tissue at a very local level [58].

In intestinal tissue

From 1985, Thermann *et al.* [59] have determined, the local PO₂ of the small bowel wall, using a multiwire Pt surface electrode. Local PO₂ values of the serosal site of the small bowel of 12 patients were measured at 61.2 (53.0-71.0) mmHg.

Interestingly, few studies evaluated the effects of volatile anaesthetics on oxygenation. Müller *et al.* [60] investigated the effect of bupivacaine, a local anaesthetic drug, on PO₂ by polarography, using a multiwire surface probe. At the serosal side of the colon wall the tissue PO₂ increased from 34 to 51 mmHg after epidural bupivacaine administration. This molecule blocks spinal nerve, which certainly produces sympathetic denervation of the bowel with an increase of regional nutritive blood flow. Later, the same group evaluated the effects of desflurane, a highly fluorinated methyl ethyl ether, and isoflurane, a halogenated ether, both used for maintenances of general anesthesia. Tissue oxygen pressure was measured on the serosal side of the large intestine. No difference in oxygenation was observed for these molecules and, again, PO₂ mean values were high: desflurane group 60.7 ± 21.7 mmHg vs. isoflurane group: 57.7 ± 20.2 mmHg [61].

In liver

Data on tissue oxygen partial pressure in human liver tissue were limited until the clinical study of Leary *et al.* [62] in 2002. They used a multiparameter sensor to enable continuous monitoring of liver tissue oxygen tension in the early postoperative period in 12 patients after liver transplantation. Tissue oxygen tension values decreased in the first 24 h and subsequently increased to a mean of 55.5 ± 21.3 mmHg at 48 h after surgery. This was associated with a decrease in the degree of acidosis.

In 2004, liver tissue oxygenation was measured in healthy and anaesthetized patients. Measurements were done by a sensor inserted under the liver capsule before liver resection. In these conditions, the median liver PO₂ was 30.7 mmHg [63]. Another study was published describing the changes that occur in liver tissue partial pressure of oxygen during hepatic

ischemia consequently to hepatic vascular occlusion. Thirteen patients took part in this study, distributed in 2 groups depending of the clamp period. Before clamping, in group 1, the median preclamp of PO₂ was 42.04 mmHg and of 34.53 mmHg in group 2. There was no significant change in PO₂ whatever clamping or reperfusion durations in both groups [64].

In kidney

In kidneys, oxygen was necessary for the organ function. Within the medulla, tubules and vasa recta are disposed in a hairpin pattern to maximize the concentration of urine by countercurrent exchange. Oxygen diffuses from arterial to venous vasa recta, which leaves the outer medulla deficient in oxygen. In this region, the medullary thick ascending limb is responsible for the generation of an osmotic gradient by active reabsorption of sodium, a process that requires a large amount of oxygen.

Medullary physioxia under normal conditions has been documented in several mammalian species. The medullary partial pressure of oxygen is in the range of 10 to 20 mmHg, contrasting with the partial pressure of oxygen in the cortex, which is about 50 mmHg [65]. In humans, Müller *et al.* [66] have reported a study in patients undergoing living donor kidney transplantation. The tissue oxygen pressure was measured in the superficial cortex of the kidney before nephrectomy by using a multiwire tissue surface PO₂ electrode. The PO₂ mean value in the cortex was 72 ± 20 mmHg which is slightly higher than the previously found values. Data about human medulla are not yet available.

In muscle

Muscle oxygenation was highly documented and studied for 30 years. Bylund-Fellenius *et al.* [67] have precisely determined the oxygen partial pressure into the medial head of the gastrocnemius muscle, using an oxygen probe. Normal values for healthy patient groups were 28.9 ± 3.4 and 29.6 ± 1.8 mmHg. Using the same technique, several laboratories have published similar data. Beerthuisen and al. [68], have positioned a polarographic needle electrode in the vastus lateralis of the quadriceps femoris muscle. The electrode was withdrawn stepwise and, after each 200 μ m step, the PO₂ value was measured. In this way 100 PO₂ values from 100 different places in the same skeletal muscle were obtained. The skeletal muscle PO₂ assessments in 31 healthy humans showed a mean of 4.2 ± 1.8 kPa (31.9 ± 13.7 mmHg). Boekstegers *et al.* [69] have determined a mean muscular oxygen partial pressure of 25 mmHg within biceps muscle of 29 patients. More recently, Ikossi *et al.* [70]

have evaluated deltoid muscle tissue oxygenation by insertion of a Licox polarographic probe and determined a mean PO_2 of 34 ± 11 mmHg.

Two other techniques were described by the literature allowing the evaluation of oxygen partial pressure in skeletal muscle: mass spectrometry and MRS. The first technique was used since 1988 by Kiaer and Kristensen to measure PO_2 in the resting anterior tibial muscle of healthy adults. The partial pressure of oxygen was 21 ± 3.6 mmHg [71]. The second method, MRS, was not used to directly measure PO_2 but for measurement of deoxymyoglobin as a marker of skeletal muscle oxygenation. 1H -MRS of myoglobin is non-invasive and is clearly limited to muscle tissue, the only site in which this endogenous intracellular marker of oxygenation is found. The experimental protocol was focused on resting muscle oxygenation in the muscles of the lower leg of 10 volunteers. This investigation has shown a $9 \pm 1\%$ Mb desaturation and a calculated intracellular PO_2 of 34 ± 6 mmHg [72].

In bone marrow

Several articles have reported evaluation of the oxygen partial pressure in bone marrow compartment and the impact of oxygen in stem cell biology. Accessibility of the marrow explained the quantity of available data about this tissue. Indeed, this tissue can be easily obtained by aspiration into a syringe and analyzed using a blood gas analyzer. In “Textbook of the medical physiology”, Guyton estimated the tissue oxygen tension *in vivo* to be approximately 40 mmHg [73]. In fact, PO_2 seems to be a little higher. Ischikawa and Ito have determined a pressure of 51.8 ± 14.5 mmHg [74]. More recently, Harrison *et al.* [75] performed gas analysis in a series of 5 healthy volunteer bone marrow donors. The mean PO_2 of the marrow aspirates was 54.9 ± 0.98 mmHg. While oxygenation is a critical reference point for determining the effects of hypoxemia upon the bone marrow microenvironment in clinical situations, two studied pathologies (leukemia [76] and chronic bronchitis with respiratory insufficiency [77]) showed no significant modification of bone marrow PO_2 .

In umbilical cord blood

For few decades, utility of cord blood was established: it contains undifferentiated stem cells, which can be used for bone marrow transplant. Since 1989 and the first cord blood transplant in a French boy with Fanconi's anemia [78], aspiration from the umbilical cord at the time of childbirth was accentuated. It is the reason why analyses of cord blood gas were commonly done and physiologic values of PO_2 were determined. Partial pressure of oxygen in umbilical

vein blood should be normally between 20 and 30mmHg, whereas blood PO₂ within umbilical artery is around 10-15mmHg.

To summarize physioxia

In this review, we clearly point to the characteristic fact that each tissue presents a distinct/specific mixture of gases balance, depending on its vascularization and its supply. Mean values of PO₂ in several human tissues are presented in Table 2.

Table 2: "Normal" values of oxygen partial pressure in various human tissue, expressed in millimeter of mercury (mmHg) and in percentage of oxygen in the microenvironment.

Oxygen partial pressure			
	mmHg	%	References
air	160	21,1	
inspired air (in the tracheus)	150	19,7	
air in the alveoli	110	14,5	
arterial blood	100	13,2	
venous blood	40	5,3	
cell	9,9-19	1,3-2,5	[79]
mitochondria	<9,9	<1,3	[79]
brain	33,8 ± 2,6	4,4 ± 0,3	[53-56,80]
lung	42,8	5,6	[57]
skin (sub-papillary plexus)	35,2 ± 8	4,6 ± 1,1	[58]
skin (dermal papillae)	24 ± 6,4	3,2 ± 0,8	[58]
skin (superficial region)	8 ± 3,2	1,1 ± 0,4	[58]
intestinal tissue	57,6 ± 2,3	7,6 ± 0,3	[59-61]
liver	40,6 ± 5,4	5,4 ± 0,7	[62-64]
kidney	72 ± 20	9,5 ± 2,6	[66]
muscle	29,2 ± 1,8	3,8 ± 0,2	[67-72]
bone marrow	48,9 ± 4,5	6,4 ± 0,6	[73-75]

Cellular and molecular consequences of physioxia versus normoxia and hypoxia

In the latter part of this review, we describe several modulation processes shown to be involved in the response to hypoxia. We propose and discuss that they may also be the result

of controlled physioxia. In fact, physiologic phenotypes could be hidden during studies conducted in so-called normoxia and further investigations have been done in the newly defined oxygen conditions, to validate our hypothesis.

Hypoxia inducible factors actions

As mentioned above, physioxia presents PO_2 values close to those used in numerous *in vitro* studies for mimicking hypoxia. The hypoxia inducible factor (HIF) is now recognized to play a central role in a variety of systemic and local adaptive responses, including the control of red blood cell production, regulation of angiogenesis, modulation of vascular tone, enhancement of glycolysis and cellular glucose uptake [81]. In mammalian cell lines, two isoforms of HIF α , HIF-1 α and HIF-2 α are induced by hypoxia within minutes and show very similar regulation characteristics.

HIF-1 α stabilization in strong hypoxic conditions is primarily an acute response to hypoxia and the HIF-1 α protein levels are reduced or disappear for prolonged hypoxia. HIF-2 α levels, on the other hand, continue to increase with time in hypoxia and become more important during the later phases of hypoxia [82]. Moreover, prolonged moderate hypoxia (5% O_2 or 38 mmHg) seems to be sufficient to stabilize HIF-2 α , but not to induce HIF-1 α as showed in figure 6.

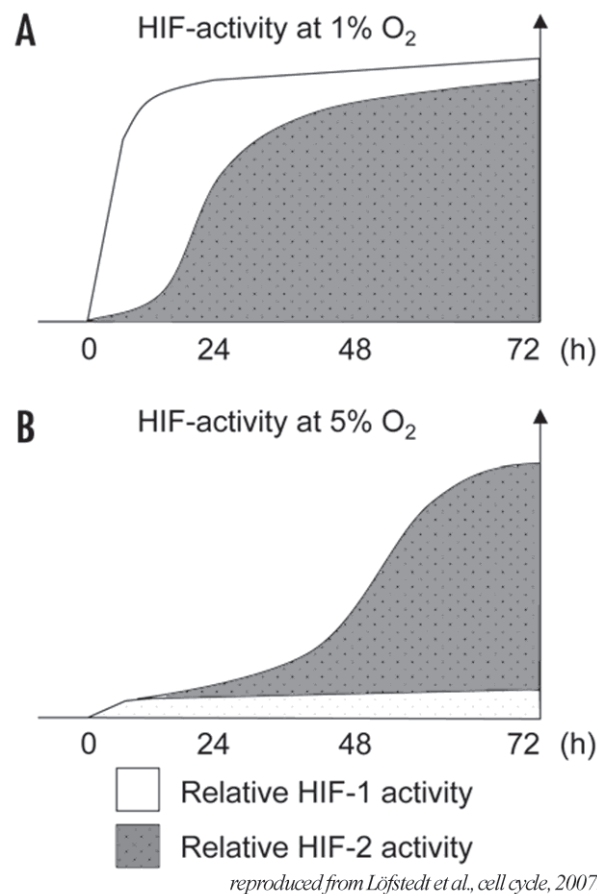


Figure 6: Relative HIF-1 and HIF-2 contributions to the hypoxic response over time at 1% (A) and 5% (B) oxygen as demonstrated in human neuroblastoma cells.

Model based on a summary of data obtained from protein level variations (Western blot), chromatin immunoprecipitations (ChIP) and activation of target genes +/- siRNA treatment. *Reproduced with permission from Löfstedt et al., Cell Cycle, 2007. [82]*

Since the majority of tissue PO_2 ranges between 3 and 10% (23-70mmHg), HIF-2 α may be responsible for the transcription of genes involved in physioxia. Consequently, cells express a protein pattern in physiologic conditions distinct than in “classical”/21% oxygen culture conditions. Anyway, it is clear that HIFs are under a precise control that is dependent on any change in the oxygen level. A variation, as low as the difference between physioxia and hypoxia, becomes highly significant. Recently, Ben-Shoshan *et al.* [83] evaluated precisely the effect of HIF-1 α and HIF-2 α expression on the endothelial cell physiology. Both factors enhance cellular mechanisms, but their contributions are distinct. Together, these data highlight the crucial role of HIF-2 α in cell physiology in tissue conditions.

Role of microRNAs in hypoxia-dependent regulations

MicroRNAs have emerged as crucial players regulating the magnitude of gene expression in a variety of organisms [84]. MicroRNAs are short (20-24 nucleotides) non-coding RNAs that negatively regulate gene expression with complementary RNA sequence. Extensive research has revealed the existence of more than 1000 different human microRNAs, which represent approximately 3% of the eukaryotic transcriptome. Numerous reports have demonstrated the importance of microRNA-mediated regulation in key processes, such as proliferation, apoptosis, differentiation and development, cellular identity and pathogen-host interactions. In consequence, their deregulation is observed in different human pathologies including cancer, heart disease and neurodegeneration [85].

Study from Kulshreshtha's group identified a set of hypoxia-regulated microRNAs (HRMs), providing an additional link between a hypoxic-specific stress factor and gene expression control. The HRM group includes: miR-21, 23a, 23b, 24, 26a, 26b, 27a, 30b, 93, 103, 103, 106a, 107, 125b, 181a, 181b, 181c, 192, 195, 210 and 213, which were consistently induced in response to hypoxia in breast and colon cancer cells [86]. In addition, few microRNAs were identified as downregulated in hypoxic cells, including miR-15b, 16, 19a, 20a, 20b, 29b, 30b, 30e-5p, 101, 141, 122a, 186, 197 and 320. These gene expression regulators were also dependent of the oxygen percentage. Few microRNA were shown to be expressed from 38 mmHg (5%) of oxygen pressure [87]. Candidate targets for HRM were searched by *in silico* analyses and revealed genes involved in proliferation, apoptosis, DNA repair, chromatin remodeling, metabolism and migration. Each HRM is predicted to downregulate an amount of 10 genes, sometimes as many as 200, which could confound the effort to identify biologically relevant targets [88]. There is growing evidence that microRNAs are strong regulators of the transcriptome, especially in hypoxia and physioxia. However further investigations are necessary to determine the exact role of microRNAs in cellular physiology. Importantly microRNAs are studied extensively and show promises as selective targets for future therapeutic strategies.

Cell adhesion molecules: their regulation by oxygen partial pressure

Cell adhesion molecules (CAMs) are cell surface glycoproteins that mediate physical interactions between adjacent cells and between cells and the surrounding extracellular matrix. CAMs belong to different protein families, including integrins, cadherins, selectins, addressins and immunoglobulin-like cell molecules [89] and their expression is restricted to

specific cell types. Besides playing a key homeostatic role in maintaining the architecture of quiescent tissues, CAMs have also to adapt to the microenvironmental changes that occur during some physiological and pathological processes [90]. We have previously shown that endothelial CAMs are modulated by nitric oxide [91] whose production is dependent on oxygen pressure. To visualize the direct impact of oxygen tension on the cell surface phenotype of endothelial cells, we studied three members of immunoglobulin-like CAMs, involved in inflammatory processes: ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102 and VCAM-1/CD106.

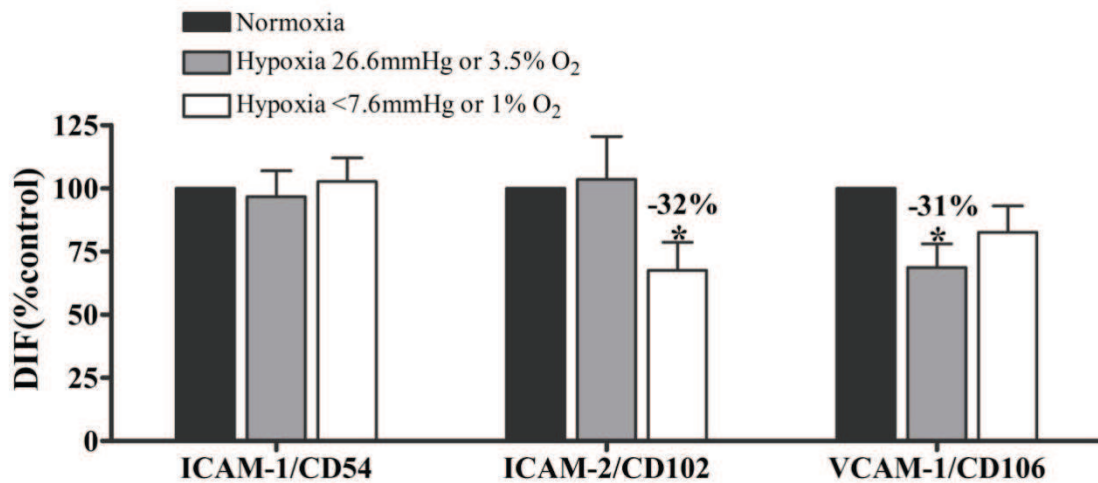


Figure 7: Partial oxygen pressure dependence of the expression of three cell adhesion molecules in skin microvascular endothelial cells: ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102 and VCAM-1/CD106. Cells were maintained in normoxia, skin physioxia (26.6mmHg or 3.5% O₂) or hypoxia (less than 7.6mmHg or 1% O₂) during 24h. Skin microvascular endothelial cells coming mostly from the dermis, physioxia was considered to be around 3-3.5% O₂ [58]. Then they were incubated with specific antibodies and labeled with a fluorescent secondary antibody. Fluorescence was quantified by flow cytometry. Changes in adhesion molecules expression are shown as percentage of fluorescence intensity related to fluorescence intensity of non treated cells (mean from 3 experiments \pm SEM ; *p<0.05).

As shown in figure 7, ICAM-1/CD54 expression is stable whatever was the oxygen level. But skin physioxia (26.6 mmHg or 3.5% O₂) decreases VCAM-1/CD106 whereas only hypoxia (less than 7.6 mmHg or 1% O₂) is able to inhibit ICAM-2/CD102.

From this example, we can conclude that CAMs expression is sensitive to oxygen and, that CAMs do not present the same sensitivity. Thus, results coming from experiments carried out in the classical 21% O₂ culture condition do not represent the physiological state of cells.

Soluble molecules: example of angiogenin

An other example that illustrates the crucial role of physiological oxygen pressure is the secretion of soluble factors. They are fundamental molecules for cell communication,

allowing information delivery from one cell to another by a paracrine signaling. Soluble factors are constituents of the microenvironment and a variation in their concentrations is prerequisite of a rapid cellular and tissue response.

As an example, angiogenin is upregulated in various types of human cancers and takes part in tumor progression by stimulating both angiogenesis and cancer cell proliferation [92]. The release of angiogenin from various cells present in the skin is very sensitive to oxygen pressure (figure 8).

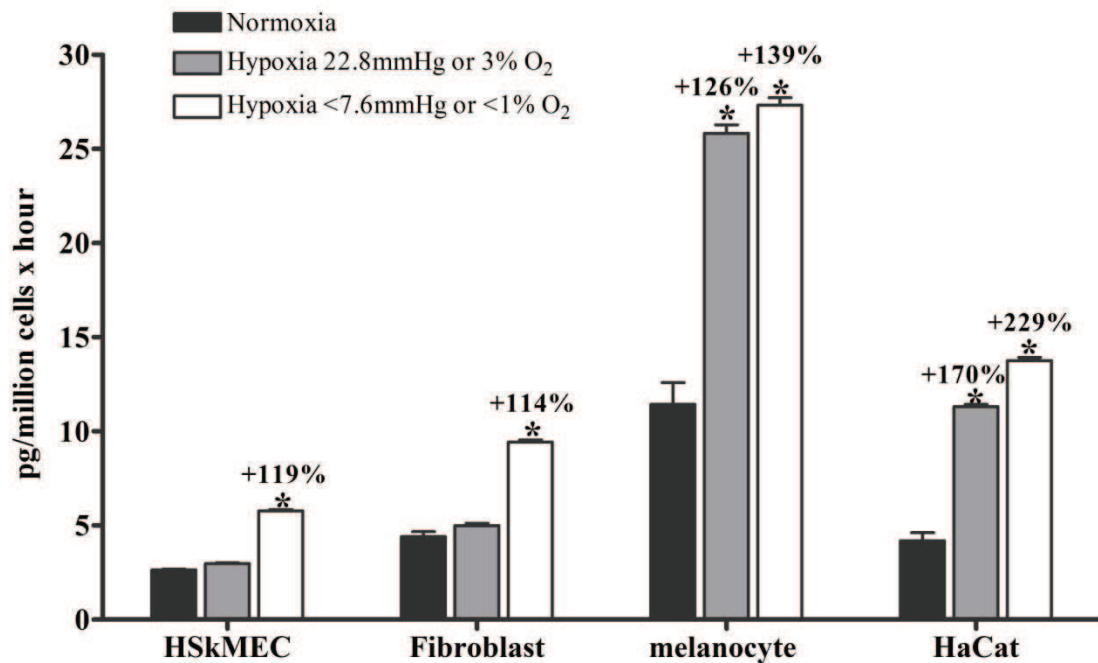


Figure 8: Oxygen dependent modulation of angiogenin secretion by 4 distinct cell lines constituting the skin, Human skin endothelial microvascular cell line (HskMEC), fibroblasts MSU 1.1, normal melanocyte cell line and HaCat keratinocytes have been maintained in normoxia, skin physioxia (22.8 mmHg or 3% O₂) or hypoxia (less than 7.6 mmHg or 1% O₂) during 16h. Supernatants have been collected and angiogenin content assessed by the CBA beads assay. Results are expressed as picogrammes of angiogenin secreted by 10x6 cells in one hour (mean ± SEM).

Strong hypoxia (less than 7.6 mmHg or 1% O₂) induces an increase in angiogenin secretion for the cell lines derived from fibroblasts, human skin microvascular endothelial cells, normal melanocytes and keratinocytes. But skin physioxia (22.8 mmHg of O₂ or 3% O₂) is already able to lead to the same increase of angiogenin by keratinocytes and normal melanocyte cell line. On the opposite, this partial oxygen pressure does not modify the angiogenin expression by human skin microvascular endothelial cell line or fibroblasts. Here again, results from normoxia does not reflect the real behavior of cells in physioxia. Furthermore, this example points out the difference of sensitivity to oxygen pressure of distinct cell lines.

Conclusion

In this review, we have pointed to the importance of taking into account the physioxia. First, for *in vitro* studies, it is important to know the organ PO₂ we want to mimic, to be closer to the physiology. Each organ has its own oxygenation status, depending of its function. Second, we have reported that cell activity could be modulated by oxygen from the gene level to the proteome expression, with a fine regulation. A literature survey points out that only few experiments were done in physioxia. Thus, we should consider differently the biological experimental approaches in order to take into account the real value of PO₂ in tissues and be relevant of *in vivo* situation. Third, in *in vivo* experiments, PO₂ “normal” values can be used to evaluate the metabolic state of an organ. For instance in brain, PO₂ value is more sensitive and relevant than others parameters to diagnose and follow injuries [80].

Nevertheless, in addition to physioxia, we must take into account the blood stream distribution which is dynamically adjusted to the needs of different organs. Whereas large organs with high oxygen consumption primarily receive a greater proportion of the cardiac output than smaller or metabolically less demanding tissues, the distribution for tissues may vary greatly depending on the time-related functional requirements. While some tissues (such as the brain) have very uniform energy requirements, the perfusion and energy expense of other tissues (such as liver and bowel) varies largely depending on their functional state. Therefore, precise knowledge of the functional changes in oxygen delivery is mandatory to, first; correctly interpret data from monitoring tissue oxygenation and, second, culture cell in oxygen conditions corresponding to “natural” tissue/organ *in vivo* environment. The impact of such knowledge is particularly illustrated by the tumor tissue biology and its consequences on therapy efficacy.

In conclusion, physioxia is different and involves distinct cellular aspects compared to so called normoxia and consequently, distinct reactions to hypoxia. We would like to highlight the importance of opening a new way of research, using reliable oxygen conditions that will allow interpretation and translation of *in vitro* scientific findings into real life settings.

Conflict of interest statement

The authors confirm that there are no conflicts of interest

References

1. **Vaupel P, Höckel M, Mayer A.** Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9: 1221-5.
2. **Maeda K, Osato T, Umezawa H.** A new antibiotic, azomycin. *J Antibiot.* 1953; 6: 182.
3. **Nunn A, Linder K, Strauss HW.** Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur J Nucl Med.* 1995; 22: 265-80.
4. **Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H.** Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer Science.* 2009; 100: 1366-73.
5. **Gambhir SS.** Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 683-93.
6. **Jensen RL.** Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J Neurooncol.* 2009; 92: 317-35.
7. **Holland JP, Lewis JS, Dehdashti F.** Assessing tumor hypoxia by positron emission tomography with Cu-ATSM. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2009; 53: 193-200.
8. **Ter-Pogossian MM, Herscovitch P.** Radioactive oxygen-15 in the study of cerebral blood flow, blood volume, and oxygen metabolism. *Semin Nucl Med.* 1985; 15: 377-94.
9. **Boushel R, Piantadosi CA.** Near-infrared spectroscopy for monitoring muscle oxygenation. *Acta Physiol Scand.* 2000; 168: 615-22.
10. **Intes X, Chance B.** Non-PET functional imaging techniques: optical. *Radiol Clin North Am.* 2005; 43: 221-34, xii.
11. **Boushel R, Langberg H, Olesen J, et al.** Monitoring tissue oxygen availability with near infrared spectroscopy (NIRS) in health and disease. *Scand J Med Sci Sports.* 2001; 11: 213-22.
12. **Busse LJ, Pratt RG, Thomas SR.** Deconvolution of chemical shift spectra in two- or three-dimensional [¹⁹F] MR imaging. *J Comput Assist Tomogr.* 1988; 12: 824-35.
13. **Mason RP, Antich PP, Babcock EE, et al.** Non-invasive determination of tumor oxygen tension and local variation with growth. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994; 29: 95-103.
14. **Zhao D, Ran S, Constantinescu A, et al.** Tumor Oxygen Dynamics: Correlation of In Vivo MRI with Histological Findings. *Neoplasia.* 2003; 5: 308-18.
15. **Howe FA, Robinson SP, McIntyre DJ, et al.** Issues in flow and oxygenation dependent contrast (FLOOD) imaging of tumours. *NMR Biomed.* 2001; 14: 497-506.
16. **Taylor JS, Tofts PS, Port R, et al.** MR imaging of tumor microcirculation: promise for the new millennium. *J Magn Reson Imaging.* 1999; 10: 903-7.

17. **Baudelet C, Gallez B.** How does blood oxygen level-dependent (BOLD) contrast correlate with oxygen partial pressure (pO₂) inside tumors? *Magn Reson Med.* 2002; 48: 980-6.
18. **Swartz HM.** Using EPR to measure a critical but often unmeasured component of oxidative damage: oxygen. *Antioxid Redox Signal.* 2004; 6: 677-86.
19. **Swartz HM, Walczak T.** Developing in vivo EPR oximetry for clinical use. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 454: 243-52.
20. **Stone HB, Brown JM, Phillips TL, Sutherland RM.** Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. Summary of a workshop held November 19-20, 1992, at the National Cancer Institute, Bethesda, Maryland. *Radiat Res.* 1993; 136: 422-34.
21. **Clark LC.** Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions. *ASAIO Journal.* 1958; 2: 41-8.
22. **Lübbers DW, Baumgärtl H, Zimelka W.** Heterogeneity and stability of local PO₂ distribution within the brain tissue. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 345: 567-74.
23. **Nozue M, Lee I, Yuan F, et al.** Interlaboratory variation in oxygen tension measurement by Eppendorf "Histogram" and comparison with hypoxic marker. *J Surg Oncol.* 1997; 66: 30-8.
24. **Vanderkooi JM, Maniara G, Green TJ, Wilson DF.** An optical method for measurement of dioxygen concentration based upon quenching of phosphorescence. *J Biol Chem.* 1987; 262: 5476-82.
25. **Griffiths JR, Robinson SP.** The OxyLite: a fibre-optic oxygen sensor. *Br J Radiol.* 1999; 72: 627-30.
26. **Seylaz J, Pinard E, Meric P, Correze JL.** Local cerebral PO₂, PCO₂, and blood flow measurements by mass spectrometry. *Am J Physiol.* 1983; 245: H513-8.
27. **Ndubuizu O, LaManna JC.** Brain tissue oxygen concentration measurements. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9: 1207-19.
28. **Höckel M, Vaupel P.** Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol.* 2001; 28: 36-41.
29. **Lawrentschuk N, Poon AMT, Foo SS, et al.** Assessing regional hypoxia in human renal tumours using 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography. *BJU Int.* 2005; 96: 540-6.
30. **Aquino-Parsons C, Luo C, Vikse CM, Olive PL.** Comparison between the comet assay and the oxygen microelectrode for measurement of tumor hypoxia. *Radiother Oncol.* 1999; 51: 179-85.
31. **Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF.** Drug resistance and the solid tumor

microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 1441-54.

32. **Ledoux S, Yang R, Friedlander G, Laouari D.** Glucose Depletion Enhances P-Glycoprotein Expression in Hepatoma Cells. *Cancer Research.* 2003; 63: 7284-90.

33. **Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al.** Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* 1996; 379: 88-91.

34. **Kondo A, Safaei R, Mishima M, et al.** Hypoxia-induced Enrichment and Mutagenesis of Cells That Have Lost DNA Mismatch Repair. *Cancer Research.* 2001; 61: 7603-7.

35. **Gray MD, Mann M, Nitiss JL, Hendershot LM.** Activation of the Unfolded Protein Response Is Necessary and Sufficient for Reducing Topoisomerase II α Protein Levels and Decreasing Sensitivity to Topoisomerase-Targeted Drugs. *Molecular Pharmacology.* 2005; 68: 1699-707.

36. **Tannock IF.** The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer.* 1968; 22: 258-73.

37. **Brown JM.** Clinical trials of radiosensitizers: what should we expect? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1984; 10: 425-9.

38. **Zeman EM, Brown JM, Lemmon MJ, et al.** SR-4233: a new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1986; 12: 1239-42.

39. **Peters KB, Brown JM.** Tirapazamine: a hypoxia-activated topoisomerase II poison. *Cancer Res.* 2002; 62: 5248-53.

40. **von Pawel J, von Roemeling R, Gatzemeier U, et al.** Tirapazamine plus cisplatin versus cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A report of the international CATAPULT I study group. Cisplatin and Tirapazamine in Subjects with Advanced Previously Untreated Non-Small-Cell Lung Tumors. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 1351-9.

41. **Williamson SK, Crowley JJ, Lara PN, et al.** Phase III trial of paclitaxel plus carboplatin with or without tirapazamine in advanced non-small-cell lung cancer: Southwest Oncology Group Trial S0003. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 9097-104.

42. **Patterson LH.** Bioreductively activated antitumor N-oxides: the case of AQ4N, a unique approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy. *Drug Metab Rev.* 2002; 34: 581-92.

43. **Fylaktakidou KC, Lehn J, Greferath R, Nicolau C.** Inositol tripyrophosphate: a new membrane permeant allosteric effector of haemoglobin. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15: 1605-8.

44. **Biolo A, Greferath R, Siwik DA, et al.** Enhanced exercise capacity in mice with severe heart failure treated with an allosteric effector of hemoglobin, myo-inositol trispyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 1926-9.

45. **Ching L, Cao Z, Kieda C, et al.** Induction of endothelial cell apoptosis by the

antivascular agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Br J Cancer*. 2002; 86: 1937-42.

46. **Brauer R, Wang LS, Woon S, et al.** Preferential labelling of oxidisable proteins with a photoactivatable analogue of the anti-tumor agent DMXAA and evidence for redox signalling in its mode of action. *Neoplasia*. 2010; 12: 755-65.

47. **Kieda C, Greferath R, Crola da Silva C, et al.** Suppression of hypoxia-induced HIF-1 α and of angiogenesis in endothelial cells by myo-inositol trispyrophosphate-treated erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 15576-81.

48. **Baader E, Tschank G, Baringhaus KH, et al.** Inhibition of prolyl 4-hydroxylase by oxalyl amino acid derivatives in vitro, in isolated microsomes and in embryonic chicken tissues. *Biochem J*. 1994; 300 (Pt 2): 525-30.

49. **Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, et al.** Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 13459 -64.

50. **Wang GL, Semenza GL.** Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*. 1993; 82: 3610-5.

51. **Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ.** Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1995; 268: C1362-8.

52. **Schofield CJ, Ratcliffe PJ.** Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004; 5: 343-54.

53. **Assad F, Scultheiss R, Leniger-Follert E, Wullenweber R.** Measurement of local oxygen partial pressure (PO₂) of the brain cortex in cases of tumors. *Adv Neurosurg*. 1984; 12: 263-6.

54. **Meixensberger J, Dings J, Kuhnigk H, Roosen K.** Studies of tissue PO₂ in normal and pathological human brain cortex. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1993; 59: 58-63.

55. **Hoffman WE, Charbel FT, Edelman G.** Brain tissue oxygen, carbon dioxide, and pH in neurosurgical patients at risk for ischemia. *Anesth Analg*. 1996; 82: 582-6.

56. **Dings J, Meixensberger J, Jäger A, Roosen K.** Clinical experience with 118 brain tissue oxygen partial pressure catheter probes. *Neurosurgery*. 1998; 43: 1082-95.

57. **Le Q, Chen E, Salim A, et al.** An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 1507-14.

58. **Wang W, Winlove CP, Michel CC.** Oxygen partial pressure in outer layers of skin of human finger nail folds. *J Physiol (Lond)*. 2003; 549: 855-63.

59. **Thermann M, Jostarndt L, Eberhard F, et al.** [Oxygen supply of the human small intestine in mechanical ileus]. *Langenbecks Arch Chir*. 1985; 363: 179-84.

60. **Müller M, Schück R, Erkens U, et al.** Effects of lumbar peridural anesthesia on tissue pO₂ of the large intestine in man. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 1995; 30: 108-10.
61. **Müller M, Schindler E, Roth S, et al.** Effects of desflurane and isoflurane on intestinal tissue oxygen pressure during colorectal surgery. *Anaesthesia.* 2002; 57: 110-5.
62. **Leary TS, Klinck JR, Hayman G, et al.** Measurement of liver tissue oxygenation after orthotopic liver transplantation using a multiparameter sensor. A pilot study. *Anaesthesia.* 2002; 57: 1128-33.
63. **Brooks AJ, Eastwood J, Beckingham IJ, Girling KJ.** Liver tissue partial pressure of oxygen and carbon dioxide during partial hepatectomy. *Br J Anaesth.* 2004; 92: 735-7.
64. **Brooks AJ, Hammond JS, Girling K, Beckingham IJ.** The effect of hepatic vascular inflow occlusion on liver tissue pH, carbon dioxide, and oxygen partial pressures: defining the optimal clamp/release regime for intermittent portal clamping. *J Surg Res.* 2007; 141: 247-51.
65. **Brezis M, Rosen S.** Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med.* 1995; 332: 647-55.
66. **Müller M, Padberg W, Schindler E, et al.** Renocortical tissue oxygen pressure measurements in patients undergoing living donor kidney transplantation. *Anesth Analg.* 1998; 87: 474-6.
67. **Bylund-Fellenius AC, Walker PM, Elander A, et al.** Energy metabolism in relation to oxygen partial pressure in human skeletal muscle during exercise. *Biochem J.* 1981; 200: 247-55.
68. **Beerthuizen GI, Goris RJ, Kreuzer FJ.** Skeletal muscle Po₂ during imminent shock. *Arch Emerg Med.* 1989; 6: 172-82.
69. **Boekstegers P, Riessen R, Seyde W.** Oxygen partial pressure distribution within skeletal muscle: indicator of whole body oxygen delivery in patients? *Adv Exp Med Biol.* 1990; 277: 507-14.
70. **Ikossi DG, Knudson MM, Morabito DJ, et al.** Continuous muscle tissue oxygenation in critically injured patients: a prospective observational study. *J Trauma.* 2006; 61: 780-90.
71. **Kiaer T, Kristensen KD.** Intracompartmental pressure, PO₂, PCO₂ and blood flow in the human skeletal muscle. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1988; 107: 114-6.
72. **Richardson RS, Duteil S, Wary C, et al.** Human skeletal muscle intracellular oxygenation: the impact of ambient oxygen availability. *J Physiol (Lond).* 2006; 571: 415-24.
73. **Guyton A.** Textbook of medical physiology. 6 ed. Philadelphia: Saunders; 1981.
74. **Ishikawa Y, Ito T.** Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture. *Eur J Haematol.* 1988; 40: 126-9.

75. **Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P.** Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*. 2002; 99: 394.
76. **Fiegl M, Samudio I, Clise-Dwyer K, et al.** CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure. *Blood*. 2009; 113: 1504-12.
77. **Skouby AR.** Haematologic adaptation in patients with chronic bronchitis and pulmonary insufficiency. *Acta Med Scand*. 1976; 199: 185-90.
78. **Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al.** Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989; 321: 1174-8.
79. **Gleadle J, Ratcliffe PJ.** Hypoxia. In: Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 2001.
80. **Korsic M, Jugović D, Kremzar B.** Intracranial pressure and biochemical indicators of brain damage: follow-up study. *Croat Med J*. 2006; 47: 246-52.
81. **Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, et al.** Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*. 2003; 17: 271-3.
82. **Löfstedt T, Fredlund E, Holmquist-Mengelbier L, et al.** Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer. *Cell Cycle*. 2007; 6: 919-26.
83. **Ben-Shoshan J, Maysel-Auslender S, Luboshits G, et al.** Hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha additively promote endothelial vasculogenic properties. *J Vasc Res*. 2009; 46: 299-310.
84. **Ambros V.** MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*. 2003; 113: 673-6.
85. **Suárez Y, Sessa WC.** MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res*. 2009; 104: 442-54.
86. **Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al.** A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007; 27: 1859-67.
87. **Hebert C, Norris K, Scheper MA, et al.** High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2007; 6: 5.
88. **Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M.** A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ*. 2008; 15: 667-71.
89. **Mousa SA.** Cell adhesion molecules: potential therapeutic & diagnostic implications. *Mol Biotechnol*. 2008; 38: 33-40.
90. **Juliano RL.** Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton:

functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002; 42: 283-323.

91. **Carreau A, Kieda C, Grillon C.** Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Experimental Cell Research*. 2011;317: 29-41.

92. **Gao X, Xu Z.** Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008; 40: 619-24.

ANNEXE 4: Collaboration à publication, en révision dans *Cytometry*

CD133 positive progenitor endothelial cell lines from human cord blood

Maria Paprocka^{a,b}, Agnieszka Krawczenko^a, Danuta Dus^a, Aneta Kantor^b, Aude Carreau^b, Catherine Grillon^b and Claudine Kieda^b

^aLudwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, PAN, 53114 Wrocław, Poland; ^bCentre de Biophysique Moléculaire, CNRS, 45071 Orléans, Cedex2, France.

Running head: human progenitor endothelial cell lines

Author contribution: M. P.: conception and design, collection of data, manuscript writing; A.K.: collection of data, manuscript writing; D. D.: conception and design, final approval of manuscript; A. K.: collection of data; A. S.: collection of data; C. G.: conception and design, collection of data, manuscript writing; C. K.: conception and design, manuscript writing, final approval of manuscript.

Correspondence to: Catherine Grillon, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, 45071 Orléans, Cedex2, France; phone: 00 33 238 25 78 04 ; FAX: 00 33 238 25 54 59, e- mail : catherine.grillon@cnrs-orleans.fr; web site <http://www.cnrs-orleans.fr>.

Disclaimers: the Authors declare no potential conflicts of interest.

Acknowledgements: this work was supported by the Polish French GDRE 182 from CNRS, the Jérôme Lejeune Foundation, the Canceropôle Grand Ouest.

Authors want to thank Professor Jerzy Heimrath for the kind providing of biological samples, Michèle Mitterrand for her skilful technical help.

Abstract

Endothelial progenitor cells (EPCs) modulate postnatal vascularization and contribute to vessel regeneration in adults. Stem cells and progenitor cells were found in umbilical cord blood, bone marrow and mobilized peripheral blood cells, from where they were isolated and cultured. However, the yield of progenitor cells is usually not sufficient for clinical application and their quality varies.

The aim of the study was the immortalization of early progenitor cells with high proliferative potential, capable to differentiate to EPCs and, further, toward endothelial cells. Two cell lines, namely HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 (human endothelial progenitor cells – cord blood) were isolated. As assessed by specific antibody labeling and flow cytometric analysis, they express a panel of stem cell markers: CD133, CD13, CD271, CD90 and also endothelial cell markers: CD202b, CD309 (VEGFR2), CD146, CD105 and CD143 but they do not present markers of finally differentiated endothelial cells: CD31, vWf, nor CD45 which is a specific hematopoietic cell marker. Using the multiplex Cytometric Bead Assay, the simultaneous production of proangiogenic cytokines IL8, angiogenin and VEGF was demonstrated in normoxia and was shown to be increased by hypoxia. Both cell lines, similarly as mature endothelial cells, underwent *in vitro* pre-angiogenic process, formed pseudovessel structures and present an accelerated angiogenesis in hypoxic conditions. To date, these are the first CD133 positive established cell lines from human cord blood cells.

Keywords: stem cell; endothelial progenitor cell; angiogenesis

Introduction

Endothelial progenitor cells (EPCs) may be found in many tissues as well as in the circulation (1). These cells are endowed with the ability to actively find and adhere to damaged endothelial surface and differentiate into endothelial cells to reconstitute vascular integrity (2-4). This process is especially important during the repair of damaged myocardial tissue after infarction (5). In animal models of ischemia, it has been proven that EPCs incorporated into sites of active angiogenesis (6). EPCs participate also to pathological processes like tumor growth or retinopathy. EPCs were discovered 10 years ago but their identification, characterization and actual differentiation potential are still controversial. EPCs identification is complex because they represent a very rare population both in bone marrow and circulation. The main problem for EPCs identification arises from the absence of specific markers and the lack of strict criteria to define their functions.

Putative endothelial cell progenitors i.e. angioblasts were first isolated from human peripheral blood by magnetic bead selection on the basis of cell surface expression of CD34 antigen (7). *In vitro*, these cells were demonstrated to differentiate into endothelial cells (ECs) (8). Presently, a combination of CD133 and/or CD34 markers and sometimes specific ECs markers like VEGFR2 (CD309), VE-Cadherin (CD144) and Mel-CAM (CD146) are used to separate stem and progenitor cells (9) (10). EPCs were then propagated in various conditions and characterized by *in vitro* and/or *in vivo* methods which led to conflicting results. Additionally, in each individual EPCs donor, different stages of their differentiation are supposed to be present and, furthermore, EPC phenotype may differ according to the nature of the tissue they originate from (11).

After the separation step, several markers (CD45, CD13, CD31, CD105, CD144, CD202b, *Ulex* Agglutinin-1 (UEA-1)) were usually used to characterize the obtained cell populations and to discriminate the putative EPCs from hematopoietic stem cells (HSCs). Keeping in mind that both endothelial and hematopoietic lineages originate from a common progenitor – hemangioblast – the closer the progenitors are, the higher are their similarities.

As a marker helping to discriminate hematopoietic and endothelial lineages, the common leukocyte antigen CD45 was suggested as it is not expressed on embryonic hemangioblast and is acquired during differentiation by cells of the hematopoietic lineage only (12). It was also demonstrated that in adults, CD34⁺ CD45⁻ cells only were able to differentiate towards EPCs (13).

Additional functional assays may facilitate the discrimination of both lineages. *In vitro* tube formation assay seems to mimic endothelial cell abilities to migrate, align, branch and

form polygonal network structures. All these functions are not achieved by CD45 positive cells (13) (14).

In this work we have isolated and successfully immortalized human endothelial progenitor cells from the cord blood. Two cell lines were established and studied for their properties and potentials of providing a cell model of endothelial precursors in terms of phenotype and angiogenic properties.

Materials and Methods

Human umbilical cord blood

Cord blood was collected from four normal, full-term deliveries at the Chair of Obstetrics and Gynecology of Wrocław Medical University. The umbilical vein was punctured with a 17-gauge needle attached to a closed system collection bag containing citrate phosphate dextrose solution as an anticoagulant blood packs (MACO Pharma, Wrocław, Poland). The harvested volume was an average of 50-110 ml from a single placenta. Written informed consent was obtained from all mothers before delivery. Protocols for sampling human umbilical cord blood were approved by the Commission of Bioethics at Wrocław Medical University.

Isolation of mononuclear cells

Umbilical cord blood mononuclear cells were isolated by density-gradient centrifugation using Lymphoflot (1.077 g/ml, Biotest, Dreieich, Germany). The mononuclear cell layer was collected; cells were washed twice with 1 mM EDTA in PBS and stored frozen in liquid nitrogen until use.

Mononuclear cell culture and immortalization

Isolated mononuclear cells (1×10^6 ml) were cultured on human fibronectin-coated tissue culture dishes (Biocoat; BD Biosciences, Grenoble, France) at 37°C in 95% air/5% CO₂ atmosphere. Cells were cultured in EBM-2 medium (Clonetics, Lonza, Saint Beauzire, France), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Hyclon, Longan, Utah, USA) and rhSCF (100 ng/ml, from Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), rhSCGF (100 ng/ml from AbD Serotec, Dusseldorf, Germany), rhFlt-3 ligand (50 ng/ml) and rhVEGF (50 ng/ml) purchased from R&D systems, Lille, France).

After 3 days of culture, the medium was supplemented with cell free supernatant (50% vol/vol) of retroviral TE FLY GA hTERT cell line obtained in our laboratory (15). These cells produce retrovirus containing human telomerase reverse transcriptase gene. 8µg/ml of polybrene (Sigma) was added to the infection supernatant to increase the transduction efficiency. Transduction procedure was repeated 3 times every 24 hr. After 3 weeks of culture, 2 clones of proliferating cells were replicated. Cells were kept for one month in culture in EBM-2 medium, supplemented with 10% FBS and growth factors. The medium was then gradually changed to OptiMEM (Invitrogen, Fischer Bioblock, Illkirch, France) supplemented with 3% of FBS. The two clones obtained were named HEPC-CB.1 and HEPC-

CB.2. Pictures of growing cells (Figures 1A and 1B) were taken using Axiovert S Zeiss microscope (Jena, Germany) equipped with a digital camera Fine Pix 5602 (Fuji Film).

For hypoxia treatments, cells were placed in a humidified atmosphere containing 1% of oxygen. This oxygen pressure was obtained by introducing 95% N₂/5% CO₂ gas mixture (Air Liquide, Paris, France) in an automated PROOX *in vitro* chamber (C-174; BioSpherix, Redfield, NY) under the control of a PROOX sensor-model 110 (BioSpherix).

Ability of HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines to grow and differentiate toward hematopoietic cells in semisolid medium

Ability of HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cells to grow and differentiate toward hematopoietic cells was evaluated using MethoCult GF H4434 (StemCell Technologies Inc. Vancouver, Canada), containing the following recombinant cytokines: rh SCF (50ng/mL), rh GM-CSF (10ng/mL), rh IL-3 (10ng/mL) and rh erythropoietin (3units/mL).

10³ cells of both tested cell lines were suspended in 1 mL of semisolid MethoCult medium and transferred to 24 well plate wells. After 7 days of culture, pictures of growing cell clusters were taken using Axiovert S Zeiss microscope (Jena, Germany) equipped with a digital camera Fine Pix 5602 (Fuji Film).

Immunostaining of HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines

Phenotype of cultured cells was analyzed with the use of non conjugated polyclonal rabbit anti-von Willebrand factor antibodies (Sigma) and the following monoclonal mouse antibodies: PE-conjugated anti-CD133 and FITC-conjugated anti-CD271 (Miltenyi Biotec, Paris, France), PE-conjugated anti-CD105, anti-CD143, anti-CD146, anti-CXCR4, anti-hVEGFR2 and non conjugated anti-CD202 (R&D Systems), PE-conjugated anti-CD13, anti-CD34, anti-CD38, anti-CD54, anti-CD90 (BD Biosciences), FITC-conjugated anti-CD45, anti-CD44 and non conjugated anti-CD15s (BD Biosciences), FITC-conjugated anti-CD31 (Sigma).

All directly labeled antibodies were used for 1 x 10⁵ cells/sample suspended in PBS supplemented with 1% FBS at the concentration suggested by the manufacturer and incubated for 30 min at 4°C. After incubation cells were carefully washed. IgG isotype matched, PE or FITC labeled immunoglobulins were used as controls.

Similarly three non labeled antibodies were used for 1 x 10⁵ cells/sample suspended in PBS supplemented with 1% FBS at the concentrations suggested by the manufacturer and incubated for 30 min at 4°C. After incubation, cells were carefully washed and second anti-mouse or anti-rabbit FITC labeled antibodies were applied for subsequent 30 min at 4°C.

Before FACS analysis cells were washed with PBS. Isotype matched mouse or rabbit immunoglobulins were used as controls.

Before CD143 and von Willebrand factor labeling, cells were fixed and permeabilized with 2% paraformaldehyde and 0.2% saponin solution in PBS for 10 min to allow intracellular labeling.

Cells were analysed by flow cytometry using FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, USA). Data were recorded for 5000-10000 events using CellQuest software (Becton Dickinson) and presented as histograms using WINMDI 2.7 software.

Secretion of cytokines by HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines

Secretion of cytokines was evaluated by using the Cytometric Bead Assay from Becton Dickinson Biosciences. The following molecules were assessed: IP-10, IL-6, IL-8, VEGF, angiogenin.

Supernatants from HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines were collected after culture for 16h either in normoxia (20% O₂) or in hypoxia (1% O₂) and kept frozen at -80°C before use. Experiments were performed according to the manufacturer's protocol. Flow cytometric analysis of bead labeling was performed using LSR (Becton Dickinson) and results were analyzed using FCAP array software (Becton Dickinson).

Formation of pseudovessels

Matrigel™ matrix (BD Biosciences) was diluted ½ in OptiMEM basal medium at 4°C, distributed in 96 well microplates in a volume of 50 µl and allowed to polymerize at 37°C for 30 min. Cells (1.2 x 10⁴) of HSkMEC (human skin microvascular endothelial cells), HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 lines were seeded on Matrigel™-coated microplates in a volume of 100 µl and cultures were performed either in normoxic (20% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions. The pictures were taken with the help of an inverted microscope (Axiovert 200M; Zeiss, Le Pecq, France) equipped with an AxioCam high resolution numeric camera linked to a computer driving the acquisition software Axiovision (Zeiss). The direct real-time visualisation of the formation of pseudo-vessels was monitored during 24 h.

Results

Human mononuclear cord blood cells were transduced with a supernatant of TE FLY GA hTERT cell line producing retrovirus containing the gene of human telomerase reverse transcriptase. Transductions were done on four different samples of cord blood mononuclear cells, cultured in the same conditions, in the presence of a mixture of growth promoting factors. Only two clones from one sample were obtained and named HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2.

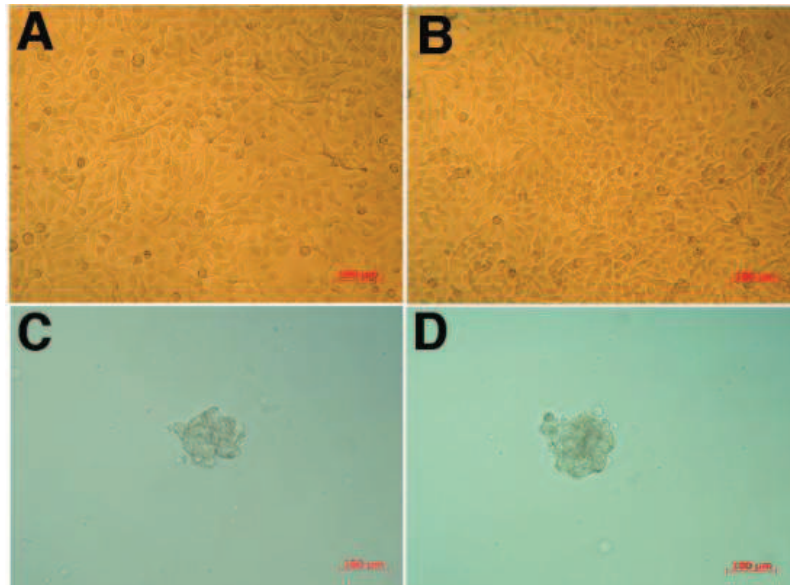


Figure 1. Morphology of human cord blood derived HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines cultured as monolayers in liquid cell culture medium and as spheroids in semisolid, hematopoietic cell differentiation medium

HEPC-CB.1 (A) and HEPC-CB.2 (B) lines were grown for 24 h in OptiMEM medium supplemented with 3% of FBS. HEPC-CB.1 (C) and HEPC-CB.2 (D) lines were grown for 7 days in MethoCult GF H4434 differentiation medium. Pictures of growing cells were taken using Axiovert S Zeiss microscope equipped with digital camera Fine Pix 5602.

Morphology of both cell lines is presented in Figure 1A and 1B. Both cell lines were also cultured in semisolid medium supplemented with hematopoietic growth and differentiation factors to evaluate their abilities to differentiate toward hematopoietic cells. Both appeared to be able to grow in semisolid medium but not to differentiate. After 7-9 days in culture, the cells formed compact multicellular spheroids. They displayed no sign of differentiation towards erythrocytes, granulocytes or monocytes, as presented in Figure 1C and 1D.

Immunophenotype of HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines

Both cell lines were first analyzed for the expression of stem cell/progenitor cell markers and for the expression of endothelial cell markers, including selected growth factor receptors and adhesion molecules (Figure 2A).

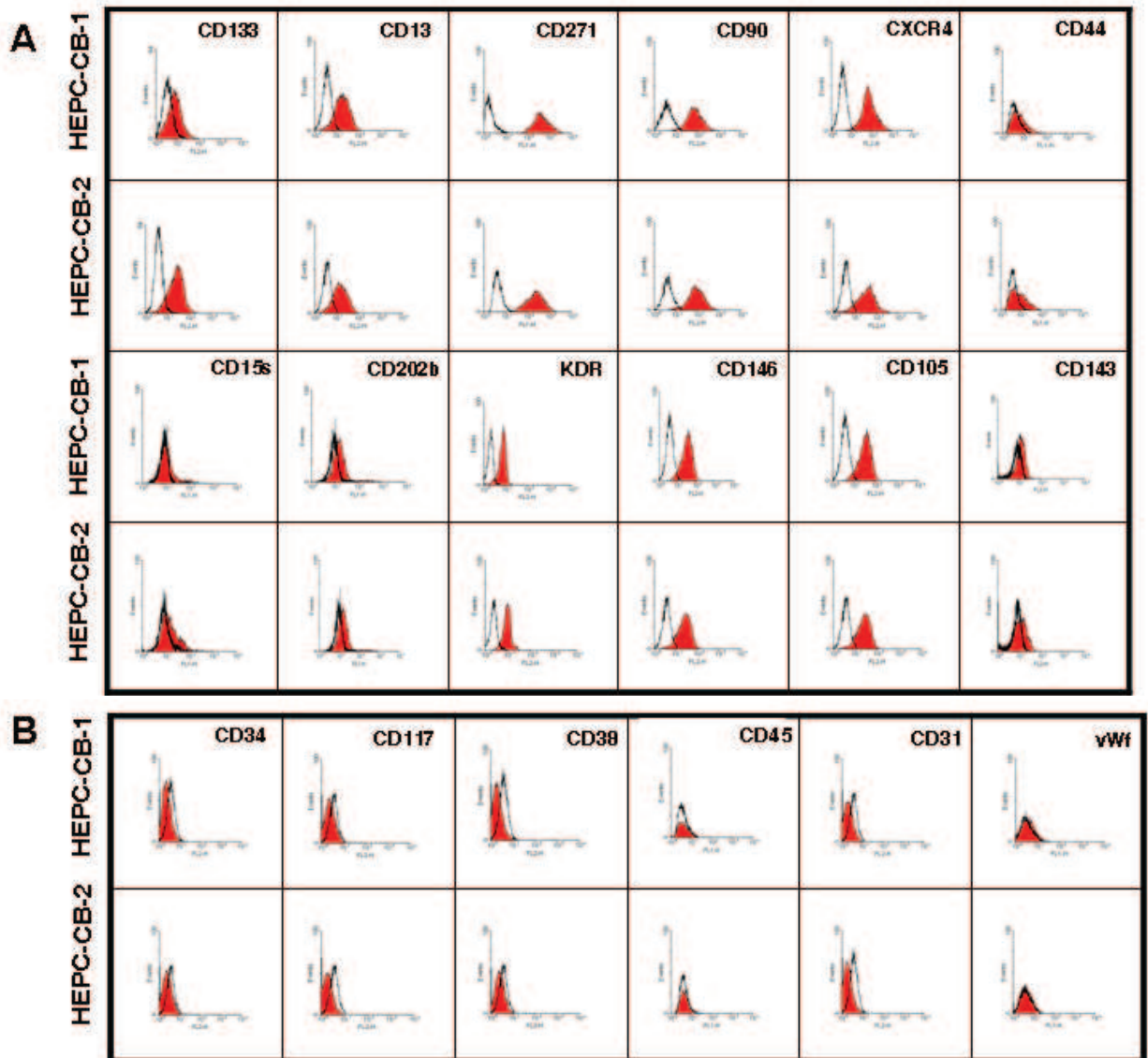


Figure 2. Positive (A) and negative (B) markers on HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines

HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell were labelled with selected antibodies as described in Methods. After washing cells were analysed by flow cytometry . Data were recorded for 5000-10000 events using CellQuest software and presented as histogram overlays. Empty histograms represent isotypic controls and coloured histograms the cell labelled with various antibodies.

Both cell lines expressed CD133 which is known to be a general marker of stem cells. They expressed also CD13 (marker of hematopoietic stem cells), CD271 (marker of non hematopoietic stem cells) and CD90 (marker of mesenchymal stem cells). Both cell lines were positive for the expression of CXCR4 and weakly positive for CD44 and CD15s, which may be expressed both on stem cells and endothelial cells. Additionally, they expressed endothelial cell markers: CD202b, VEGFR2, CD146, CD105 and, weakly, CD143. Markers which were not expressed by the cell lines were gathered in Figure 2B. Both HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 lines were negative for CD34, CD117, CD38 and CD45 which suggests these

cells were not from hematopoietic origin. They were also negative for CD31 and vWf – markers of differentiated endothelial cells.

Cytokine secretion by HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines

Cytometric Bead Assay was used to evaluate the secretion of selected cytokines (IP-10, IL6, IL8, VEGF and angiogenin) by HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cells growing in normoxic and hypoxic conditions.

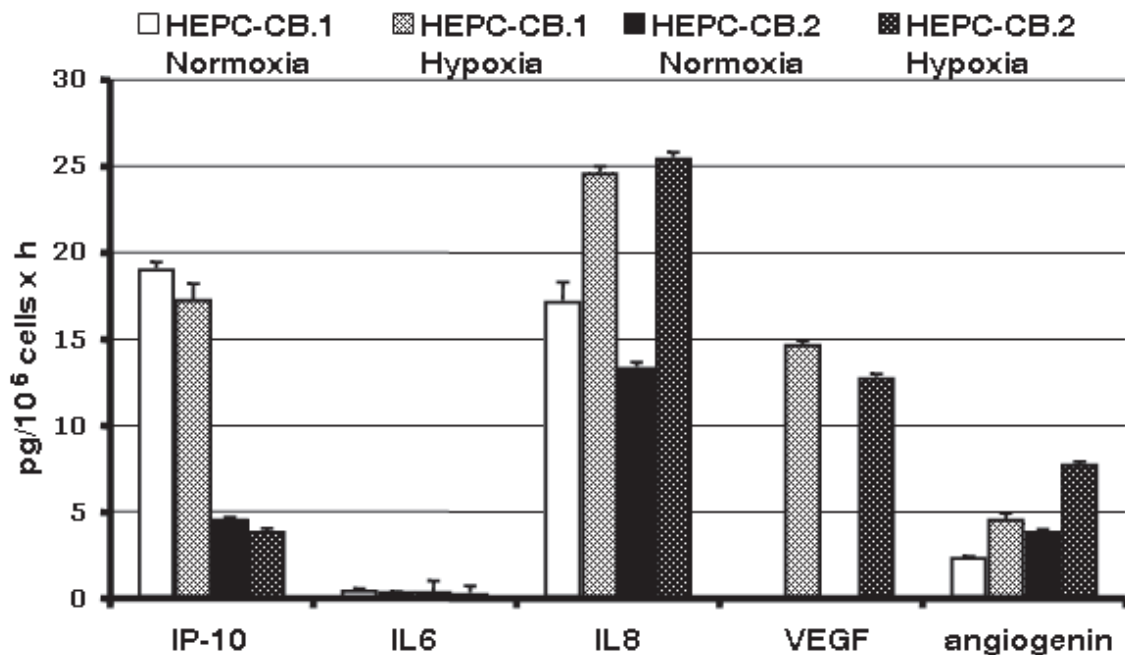


Figure 3. Secretion of selected cytokines produced by HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines in normoxic and hypoxic conditions as evaluated by the multiplex BD Cytometric Bead Assay

Supernatants from HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines were collected after culture for 16h either in normoxia (20% O₂) or in hypoxia (1% O₂). Secretion of cytokines was evaluated by using the Cytometric Bead Assay. Flow cytometric analysis of bead labeling (about 300 beads were analyzed for each cytokine) was performed and results analyzed using FCAP array software. Results are expressed as pg/million cells x hour ± SEM.

Figure 3 shows that the alteration of partial oxygen pressure influenced the production of proangiogenic cytokines to variable extents by the two cell lines. Indeed, the production of proangiogenic cytokines IL8 and angiogenin was substantially augmented in hypoxia. Both cell lines did not produce VEGF in normoxia but the expression of this proangiogenic factor was induced by hypoxia in both cell lines.

IP10, which is an antiangiogenic cytokine, was produced at much higher levels by HEPC-CB.1 compared to HEPC-CB.2 and was not changed by hypoxia.

Angiogenic properties of HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines

Both cell lines were assessed for their angiogenic potential on Matrigel and compared with the differentiated human skin-derived microvascular endothelial cell line, HSKMEC (16).

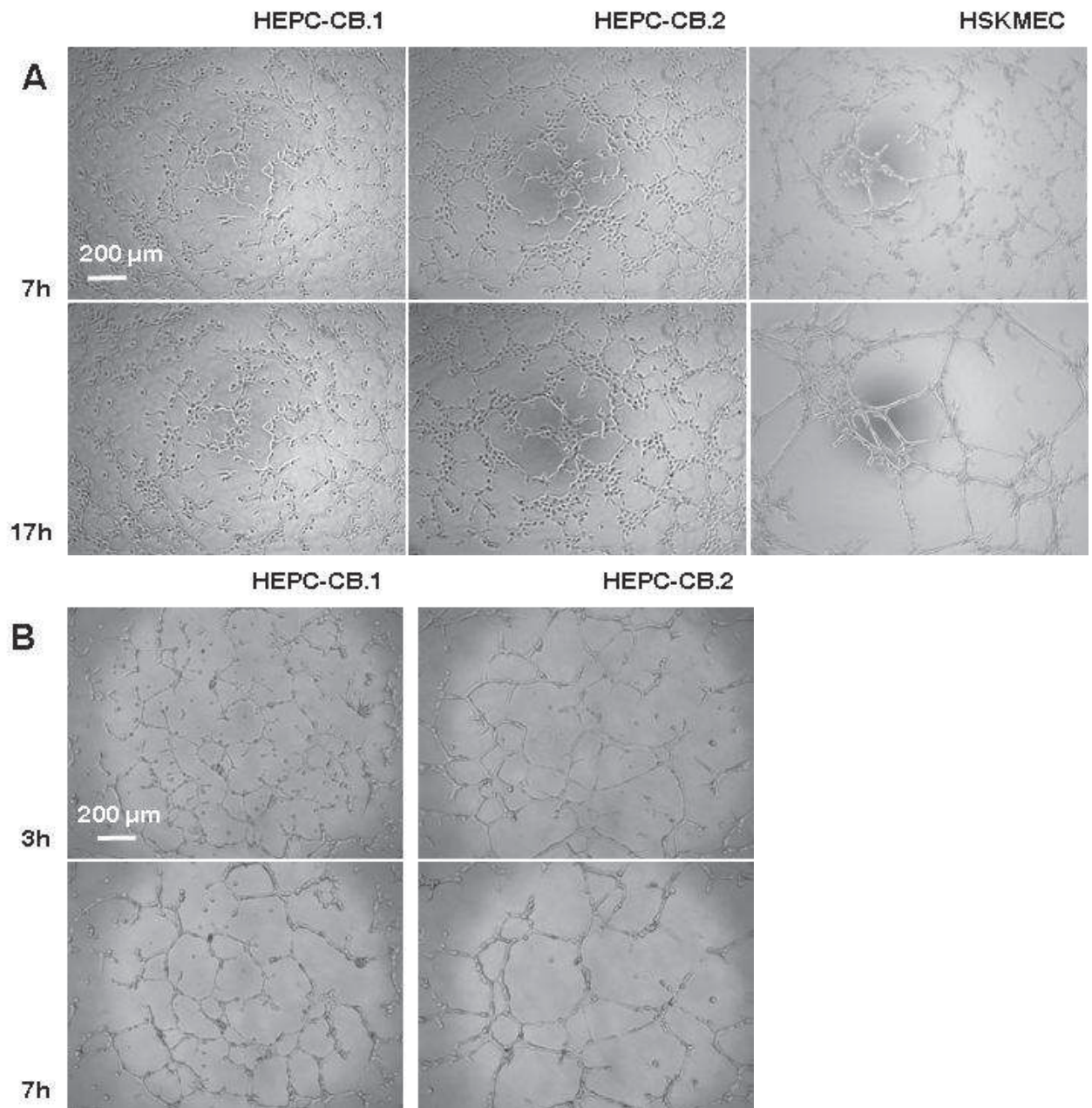


Figure 4. Pseudovessels formation in Matrigel by HEPC-CB.1, HEPC-CB.2 and HSKMEC cell lines

HEPC-CB.1, HEPC-CB.2 and HSKMEC cells (1.2×10^4 cells) were seeded on MatrigelTM-coated microplates in a volume of 100 μ l and cultures were performed either in (A) normoxic (20% O₂) or in (B) hypoxic (1% O₂) conditions. The pictures were taken with the use of the microscope Axiovert 200M equipped with an Axiocam high resolution numeric camera linked to a computer driving the Axiovision acquisition software. The direct real-time visualisation of the formation of pseudo-vessels was monitored over 24h.

Figure 4 shows that HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines were both able to start the angiogenic process in a comparable way, similarly to the reference HSKMEC. It means that

cells are connected together to form a network. The evolution of this network proceeded for less than 7 h in the case of the HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines and then stopped, while it was completed by HSkMECs in 17 h. After 7 h HEPC cells stayed at the same place and started to proliferate.

Hypoxia is the microenvironmental condition which turns on angiogenesis *in vivo*. It accelerated very efficiently the process of tube formation for HEPC-CB.2 cells, as it is shown in Figure 4B. This process was also accelerated for the HEPC-CB.1 line although it remained slower than in the case of HEPC-CB.2 hypoxia-dependent tube formation. Besides tube formation acceleration, hypoxia caused a more complete differentiation towards vessel-like structure that was not reached in normoxia by any of the HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines.

Discussion

The aim of our study was the immortalization of early stem/progenitor cells with high proliferative and differentiation potentials. For this purpose human cord blood mononuclear cells were selected and transduced with the use of TE FLY GA hTERT retrovirus containing human telomerase reverse transcriptase gene. Because the transduction of resting stem and progenitor cells is usually non effective, cord blood mononuclear cells were first cultured for 3 days with a mixture of growth factors to augment their proliferation and viability. Four cord blood samples were treated in the same way but only in one case two cell clones appeared and two cell lines named HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 were established.

The cell lines obtained expressed CD133 and CD271, markers specific for early stem/progenitor cells. To our knowledge these two cell lines are the first CD133 positive cell lines obtained from human cord blood cells. Interestingly enough, despite the positive reaction with anti CD133 antibody these cells were negative for CD34 molecule.

HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 cell lines expressed also CD13, activated by angiogenic signals molecule essential for capillary tube formation (17) and CD90 molecule that, besides their expression on differentiated cells, are considered as hematopoietic and mesenchymal stem cell markers, respectively.

Expression of CXCR4, CD44 and CD15s antigens was found on both stem and more differentiated cells especially of hematopoietic origin but data concerning their expression on EPCs are rather scarce. CXCR4 is a general marker of cells able to translocate and home to bone marrow and other tissues especially during inflammation. Its role was studied in HSCs differentiation and migration (18) as well as in cancer cells spreading (19). In the case of EPCs, a higher expression of CXCR4 was found on EPCs separated from umbilical cord blood than those coming from bone marrow (20). CD44 presents a variety of forms that modulate its activity in various cellular functions including lymphocyte activation, adhesion, recirculation and homing. For example, during hematopoiesis, its specific sialofucosylated glycoform, called HCELL, is found on human hematopoietic stem cells and functions as a "bone homing receptor", directing migration of human hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells to the bone marrow (21). Studies on hematopoietic cells differentiation demonstrated that the expression of CD15s (sLex) determinant is associated with the most primitive subset of bone marrow-derived cells. Myeloid cell maturation is accompanied by a relative loss of CD15s and a gain of CD15 expression (22).

The expression studies of main markers for stem cells and progenitor cells, as documented in this work, were completed by the markers of more differentiated cells, namely endothelial cell typical antigens. Both HEPC-CB lines were positive for the following early endothelial markers: CD202b, VEGFR2, CD146, CD105, CD143 but both were negative for

markers of differentiated endothelial cells: CD31 and vWF. They were also negative for CD45 antigen, suggesting that they are not from hematopoietic lineage but rather of endothelial origin.

The relative expression and activity of these markers along with the differentiation process of endothelial precursors might influence the release of cells in the circulation and modulate their recruitment into tissues. This may explain the variety of differentiation markers levels on circulating precursors (23).

Both HEPC-CB cell lines seem to be of endothelial origin, however, some differences between them were uncovered. CD133 and CD271 markers were not expressed equally. HEPC-CB.1 cell line displayed invariably a higher level of CD271 and a lower level of CD133 than HEPC-CB.2 line did. The differences between both cell lines in their antigens expression indicate that they may represent distinct steps of differentiation. Another feature discriminating these two cell lines was the production of IP-10, which is an antiangiogenic cytokine. It is produced at much higher level by HEPC-CB.1 compared to HEPC-CB.2 and its production is not changed by hypoxia. A feature pointing at endothelial rather than hematopoietic origin of HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 lines is their ability to respond to hypoxic conditions. Immunophenotype of both lines was not significantly changed after 24hr culture in hypoxia (data not shown). Moreover, functional assays performed on cells cultured in hypoxia gave different results when compared to normoxia. Production of proangiogenic cytokines IL8 and angiogenin was augmented after a 16 h culture in hypoxia and the most meaningful endothelial feature was evidenced by the hypoxia-induced production of VEGF by both cell lines, like mature endothelial cells do.

Pseudovessel formation in Matrigel is a property of endothelial cells. Both cell lines presented here are endowed in this ability although they do not finish the formation of the network like more differentiated endothelial cells do. This suggests that growth and differentiation factors are needed to augment this ability. This is indeed shown by the effect of hypoxic conditions which prompted the angiogenic process compared to normoxia. Furthermore, HEPC-CB cells were able to achieve a completed network in hypoxia as differentiated endothelial cells did in normoxia.

Because of their capacity to home into the pathological sites, EPCs are natural tools for repair of endothelia after ischemia or other injury. Phenotype and angiogenic properties of HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2 allow us considering these cell lines as suitable *in vitro* models of endothelial progenitor cells. These cells will provide a valuable mean for the *in vitro* studies of EPC differentiation and future use for the design of cell-mediated tissue repair therapies.

References

1. Dome B, Timar J, Ladanyi A, Paku S, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Lang G, Dome P, Bogos K, Tovari J. Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: From biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;69(2):108-24.
2. Yamahara K, Itoh H. Potential use of endothelial progenitor cells for regeneration of the vasculature. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2009;3(1):17-27.
3. Suh W, Kim KL, Kim JM, Shin IS, Lee YS, Lee JY, Jang HS, Lee JS, Byun J, Choi JH and others. Transplantation of endothelial progenitor cells accelerates dermal wound healing with increased recruitment of monocytes/macrophages and neovascularization. *Stem Cells* 2005;23(10):1571-8.
4. Slayton WB, Li XM, Butler J, Guthrie SM, Jorgensen ML, Wingard JR, Scott EW. The role of the donor in the repair of the marrow vascular niche following hematopoietic stem cell transplant. *Stem Cells* 2007;25(11):2945-55.
5. Mobius-Winkler S, Hollriegel R, Schuler G, Adams V. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease. *Cytometry A* 2009;75(1):25-37.
6. Arbab AS, Pandit SD, Anderson SA, Yocum GT, Bur M, Frenkel V, Khuu HM, Read EJ, Frank JA. Magnetic resonance imaging and confocal microscopy studies of magnetically labeled endothelial progenitor cells trafficking to sites of tumor angiogenesis. *Stem Cells* 2006;24(3):671-8.
7. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.
8. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR and others. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92(2):362-7.
9. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000;105(1):71-7.
10. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA and others. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95(3):952-8.
11. Tarnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A* 2010;77(1):6-10.
12. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 2006;6(11):835-45.
13. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, Gillebert TC, Plum J, Vandekerckhove B. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(7):1572-9.
14. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzadeh MR, Bhavsar JR, Yoder MC, Haneline LS, Ingram DA. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 2007;35(7):1109-18.

15. Szyda A, Paprocka M, Krawczenko A, Lenart K, Heimrath J, Grabarczyk P, Mackiewicz A, Dus D. Optimization of a retroviral vector for transduction of human CD34 positive cells. *Acta Biochim Pol* 2006;53(4):815-23.
16. Kieda C, Paprocka M, Krawczenko A, Zalecki P, Dupuis P, Monsigny M, Radzikowski C, Dus D. New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium* 2002;9(4):247-61.
17. Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 2001;97(3):652-9.
18. Kahn J, Byk T, Jansson-Sjostrand L, Petit I, Shivtiel S, Nagler A, Hardan I, Deutsch V, Gazit Z, Gazit D and others. Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. *Blood* 2004;103(8):2942-9.
19. Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2006;60(6):273-6.
20. Finney MR, Greco NJ, Haynesworth SE, Martin JM, Hedrick DP, Swan JZ, Winter DG, Kadereit S, Joseph ME, Fu P and others. Direct comparison of umbilical cord blood versus bone marrow-derived endothelial precursor cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(5):585-93.
21. Gunthert U. CD44: a multitude of isoforms with diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993;184:47-63.
22. Gadhoom SZ, Sackstein R. CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. *Nat Chem Biol* 2008;4(12):751-7.
23. Timmermans F, Plum J, Yoder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med* 2009;13(1):87-102.

Aude SÉLO-CARREAU

Rôle du monoxyde d'azote dans la modulation de la reconnaissance cellulaire: étude d'un modèle endothélial lié au mélanome.

Le mélanome est le cancer de la peau le plus rare, mais celui qui cause le plus de mortalité. L'étape critique de sa progression est l'angiogenèse, processus détourné par la tumeur pour s'oxygéner et se nourrir. Les cellules tumorales peuvent alors former des métastases dans les ganglions lymphatiques, notamment. D'autre part, la tumeur inhibe les réponses immunitaires de l'hôte à son encontre. Tous ces mécanismes font intervenir le monoxyde d'azote (NO[•]). Le but de ce projet a été d'approfondir le rôle du NO[•] dans l'angiogenèse et le recrutement leucocytaire, mécanismes basés sur la reconnaissance cellulaire de l'endothélium.

Nous avons montré que le NO[•] est nécessaire à l'angiogenèse, mais que des doses plus fortes sont anti-angiogéniques. Cet effet inhibiteur peut s'expliquer par la diminution des interactions cellules-cellules, et l'inhibition de l'expression de PECAM-1/CD31, principalement.

D'autre part, nous avons établi que l'adhésion des leucocytes est inhibée par le NO[•] ce qui a été relié à la modulation de l'expression des molécules capables de fixer des chimiokines : les glycosaminoglycannes et les récepteurs de chimiokines, ainsi qu'à la sous-expression des molécules d'adhésion CD34, ICAM-2/CD102 et VCAM-1/CD106.

En conclusion, le NO[•] est capable de réguler des mécanismes cellulaires majeurs de la progression tumorale, par modulation de l'expression des molécules de surface de l'endothélium. Tout au long de ce travail, nous avons observé que les différences de réponse sont dépendantes des doses de NO[•] et du type cellulaire, ce qui démontre le rôle pivot du NO[•] dans la progression du cancer.

Mots clés : monoxyde d'azote, angiogenèse, recrutement leucocytaire, reconnaissance cellulaire

Role of nitric oxide in the modulation of cell recognition: study of a melanoma-related endothelial model.

Melanoma is the rarest skin cancer, but one that causes the most of deaths. The critical step of its progression is angiogenesis, a physiological tumor-activated process which allows the delivery of oxygen and nutrients. Tumor cells may then metastasize to the lymph nodes, in particular. Moreover, the tumor inhibits the host immune responses toward itself. All these mechanisms are regulated by nitric oxide (NO[•]). The aim of the project was to deepen the role of NO[•] in angiogenesis and leukocyte recruitment, two mechanisms based on endothelial cell recognition.

We have shown here that NO[•] is necessary for angiogenesis, but that high concentrations are anti-angiogenic. This inhibitory effect of NO[•] can be attributed to the decrease of cell-cell interactions and the inhibition of the PECAM-1/CD31 expression, mainly.

Besides, we have demonstrated that leukocyte adhesion on endothelium is inhibited by NO[•]. This can be explained by the modulation of the expression of molecules able to bind to chemokines: glycosaminoglycans and chemokine receptors, as well as by the down-regulation of the adhesion molecules CD34 and ICAM-2/CD102 VCAM-1/CD106.

In conclusion, NO[•] is able to regulate the main cellular mechanisms of tumor progression by modulating the expression of surface molecules on endothelial cells. Throughout this work, we have observed that these modulations depend on NO[•] concentrations and on the cell type, demonstrating the pivotal role of NO[•] in cancer progression.

Keywords: nitric oxide, angiogenesis, leukocyte recruitment, cellular recognition



Centre de Biophysique Moléculaire – UPR 4301
Rue Charles Sadron
45071 Cedex 2 Orléans

