



HAL
open science

Rôle de la VE-statine (EGFL7) dans la tumorigenèse : répression de l'activation des cellules endothéliales et contribution à l'échappement à l'immunité anti-tumorale

Suzanne Delfortrie

► To cite this version:

Suzanne Delfortrie. Rôle de la VE-statine (EGFL7) dans la tumorigenèse : répression de l'activation des cellules endothéliales et contribution à l'échappement à l'immunité anti-tumorale. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S017. tel-00693157

HAL Id: tel-00693157

<https://theses.hal.science/tel-00693157>

Submitted on 2 May 2012

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.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2

THESE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Présentée et soutenue publiquement
par

Suzanne DELFORTRIE

Le Mardi 25 octobre 2011

**ROLE DE LA VE-STATINE (EGFL7) DANS LA TUMORIGENESE :
REPRESSION DE L'ACTIVATION DES CELLULES ENDOTHELIALES
ET CONTRIBUTION A L'ECHAPPEMENT
A L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE**

Présidente : Pr. Brigitte JUDE
Rapporteurs : Pr. Agnès NOEL
Dr. Gilles PAGES
Directeur de thèse : Dr. Fabrice SONCIN

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le CNRS et la région Nord Pas de Calais pour avoir financé mes trois années de thèse, ainsi que la Ligue Nationale Contre le Cancer et l'INCA pour l'aide apportée à notre groupe.

Je remercie Madame le Professeur Brigitte Jude de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse, ainsi que Madame le Professeur Agnès Noël et Monsieur le Docteur Gilles Pagès d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail.

Je remercie Mr Yvan De Launoit de m'avoir accueillie dans son unité.

Je tiens à remercier Fabrice Soncin pour avoir dirigé cette thèse. Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour ton encadrement. J'avais décidé de rejoindre ton équipe à l'issue de mon M2 afin d'effectuer ma thèse de bonnes conditions, je ne regrette pas mon choix.

Je remercie également le Dr François Trottein et le Dr Christelle Faveeuw pour leur collaboration sur la partie immunité, le Dr Gilles Pagès, le Dr Isabelle Wolowczuk et le Pr Bart Staels pour nous avoir donné des réactifs.

Merci à tous les membres du groupe Vaisseaux :

A Sébastien Pinte, avec qui j'ai travaillé pendant une grande partie de ma thèse. Merci pour nos discussions scientifiques, tes conseils, tes relectures de mon mémoire de thèse. Merci d'avoir été là dans les moments de doutes. Ce fut un plaisir de travailler avec toi. Je ne te souhaite que le meilleur...

A Chantal Samson pour ses conseils techniques, mais également pour nos discussions non scientifiques. Merci pour ta bonne humeur et ta bienveillance ! Il devrait toujours y avoir une Chantal dans une équipe !

A Virginie Mattot pour avoir partagé son savoir sur l'immunohistochimie et à Etienne Lelièvre pour ses constructions plasmidiques.

A Loïc. Je me souviens de nos débuts au laboratoire, à essayer de maîtriser toutes les nouvelles techniques, non sans quelques ratés... Et comment ça, on ne met pas du bleu de charge dans le stock de sonde pour HIS si difficilement obtenu ?! Bon courage pour la fin de ta thèse !

A Gaëlle et Géraldine.

Plus généralement à tous les membres de l'UMR8161 pour les moments de détente, autour d'un café et de l'horoscope quotidien, et pour le nouveau concept de « soirées foot-perles » !

Merci à tous ceux qui ont toujours été là, dans les bons moments, comme dans les plus difficiles, pendant la thèse, mais également avant...

A Joanna, la bretonne, et Hélène, la parisienne, également embarquées dans l'aventure qu'est la thèse, connues sur les bancs des cours d'anglais. Du sport et des soirées entre filles, rien de tel pour confronter nos expériences et pour nous changer les idées. A Marianne et Marc pour leur chaleureux accueil orléanais. A Mumu et Chloé, mes copines d'enfance. A Natacha et sa bande pour ses soirées nancéennes. A Aline et Séb, qui ont une place toute particulière dans mon cœur. A Marjorie, bien évidemment ! Je compte sur toi pour continuer nos week-ends bisannuels !

A mes parents, jamais bien loin malgré la distance, à mes petits frères, Hugues et Clément, à mes grands-parents, et à ma famille au sens plus large, pour leur soutien sans faille.

A Dom. Après trois ans de week-ends limougeo-lillo-toulousains, ponctués d'escapades européennes, es-tu prêt pour de nouvelles aventures ?

Je termine par une grande pensée pour Yannick et Chantal W.

« Au-dessus des nuages, il y a toujours du soleil. »

Pierre Dudan

Résumé

Le gène *VE-statine/egfl7* a été découvert au sein du laboratoire en 2003 et il est majoritairement exprimé par les cellules endothéliales au cours du développement embryonnaire et du remodelage vasculaire. Plusieurs publications ont montré l'implication de la VE-statine dans la formation des vaisseaux. L'expression de la VE-statine par des tumeurs humaines a récemment été décrite, et une forte expression est associée avec un haut grade tumoral, un fort taux métastatique et un mauvais pronostic dans les hépatocarcinomes, les gliomes et les tumeurs colorectales.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier l'effet de la VE-statine dans la croissance et dans l'angiogenèse tumorales. Pour cela, nous avons surexprimé la VE-statine dans une lignée tumorale murine issue d'un carcinome mammaire (4T1) et une lignée issue d'un carcinome pulmonaire (LLC1). Nous avons étudié les caractéristiques de ces cellules tout d'abord *in vitro*, puis *in vivo* dans deux modèles murins de tumorigenèse expérimentale. La surexpression de la VE-statine induit une augmentation de la croissance tumorale et de l'invasion métastatique *in vivo*. Les vaisseaux sanguins tumoraux sont légèrement modifiés dans les tumeurs surexprimant la VE-statine, avec une augmentation de la microdensité vasculaire et de la perméabilité vasculaire. Les tumeurs surexprimant la VE-statine sont moins infiltrées par les cellules de l'immunité et les molécules d'adhérence endothéliales ICAM-1 et VCAM-1 sont réprimées au niveau des vaisseaux tumoraux. Par un modèle de tumorigenèse chez des souris immunodéficientes, nous avons montré que l'effet pro-tumoral de la VE-statine dépendait de la présence d'un système immunitaire fonctionnel. Des tests *in vitro* d'adhérence de lymphocytes sur des cellules endothéliales ont montré que la VE-statine inhibe l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine dans les cellules endothéliales normales, non activées, ce qui a pour conséquence de diminuer l'adhérence leucocytaire.

La VE-statine est donc un répresseur de l'activation de l'endothélium normal. Dans un contexte tumoral, l'expression de la VE-statine par les cellules cancéreuses permet à la tumeur d'échapper au système immunitaire et favorise donc la progression tumorale.

Mots clé : VE-statine, cancer, endothélium, adhérence leucocytaire

Laboratoire : Unité CNRS – UMR8161 – Institut de Biologie de Lille
1 rue du Professeur Calmette
59021 Lille Cedex

ROLE OF VE-STATIN (EGFL7) IN TUMORIGENESIS: REPRESSION OF ENDOTHELIAL CELL ACTIVATION AND ROLE IN TUMOR ESCAPE FROM IMMUNITY

Abstract

VE-statin/egfl7 was discovered by our team in 2003. It is specifically expressed by endothelial cells during embryonic development and vascular remodelling. Several publications have described the role of VE-statin in vessel formation. VE-statin expression by human tumors has been recently associated with a higher grade and metastatic score and with a poorer prognosis in hepatocellular carcinoma, glioma and colorectal cancer.

The aim of my work was to study the functions of VE-statin in tumor growth and angiogenesis. VE-statin was overexpressed in a mouse mammary carcinoma cell line (4T1) and in a mouse lung adenocarcinoma cell line (LLC1). The properties of these cells were studied *in vitro* and *in vivo* with two mouse models of experimental tumorigenesis. Overexpression of VE-statin promotes tumor growth and metastasis *in vivo*. Blood vessels are slightly modified in tumors which overexpress VE-statin. Microvessel density and blood vessel permeability are increased. Tumors expressing VE-statin are much less infiltrated by immune cells and adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 are repressed in their blood vessel endothelial cells. We show that the pro-tumoral effect of VE-statin is dependent on the existence of a functional immune system, as the effect is abolished when tumor cells are injected in immunosuppressed mice. In *in vitro* leukocyte-endothelial cell adhesion assays, VE-statin inhibits the expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin by normal, non activated, endothelial cells, which reduces lymphocyte adhesion.

VE-statin is thus a repressor of endothelial cell activation. When placed in a tumor context, VE-statin expression by tumor cells results in an escape from immunity and a better tumor growth.

Key words: VE-statin, cancer, endothelium, leukocyte adhesion

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
Résumé	9
Abstract.....	11
TABLE DES MATIERES	13
INDEX DES FIGURES	18
INDEX DES TABLEAUX	21
ABREVIATIONS	23
AVANT-PROPOS	27
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	29
I. Cancer et angiogenèse	31
A. Généralités sur le cancer.....	31
1. Etapes de la tumorigenèse.....	31
2. Caractéristiques des cellules cancéreuses	31
3. Importance du microenvironnement.....	35
B. L'endothélium et le processus angiogénique	37
1. Structure des vaisseaux sanguins.....	37
2. Fonctions de l'endothélium vasculaire	38
3. Angiogenèse physiologique.....	38
a) Développement vasculaire de l'embryon.....	38
b) Etapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.....	39
4. Vascularisation tumorale	42
a) Modes de perfusion des tumeurs	42
b) Angiogenèse tumorale.....	43
II. Réponse immunitaire anti-tumorale.....	46
A. Quelques notions d'immunologie	46
B. Le concept de <i>cancer immunoediting</i>	48
1. Evolution du concept d'immunosurveillance	48
2. Les trois phases de l' <i>immunoediting</i>	48

a)	Elimination	49
(1)	Cellules immunitaires et cytokines impliquées	50
(2)	Reconnaissance des cellules tumorales	51
(3)	Situation chez l'Homme.....	51
b)	Equilibre	52
(1)	Principales caractéristiques.....	52
(2)	Situation chez l'Homme.....	52
c)	Echappement.....	52
(1)	Diminution de la reconnaissance immunitaire.....	53
(2)	Augmentation de la résistance aux effets cytotoxiques de l'immunité.....	53
(3)	Mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur	54
C.	Rôle de l'endothélium dans la réponse immunitaire anti-tumorale	56
1.	Interactions leucocytes-cellules endothéliales	56
a)	Roulement des leucocytes.....	57
b)	Activation et adhérence ferme	58
c)	Transmigration endothéliale	59
2.	Régulation de l'adhérence des leucocytes.....	63
a)	Expression des molécules d'adhérence dans les vaisseaux tumoraux	63
b)	Régulation de l'adhérence par les facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les cellules tumorales.....	64
c)	Régulateurs endothéliaux de l'adhérence leucocytaire	64
(1)	Médiateurs de l'inflammation d'origine endothéliale	64
(2)	Régulation par des protéines endothéliales angiogéniques	65
III.	La VE-statine/EGLF7	69
A.	Description de la VE-statine	69
1.	Le gène <i>VE-statine</i>	69
2.	Expression de la VE-statine par les cellules endothéliales	69
3.	Structure de la protéine	70
B.	Fonctions de la VE-statine dans l'endothélium	72
1.	Rôle dans la vasculogénèse et dans l'angiogénèse	72
a)	Effet de la VE-statine sur la migration cellulaire <i>in vitro</i>	72

b)	Etudes <i>in vivo</i> du rôle de la VE-statine dans la formation des vaisseaux	73
2.	Inhibition de l'élastogenèse	76
3.	Inhibition de l'expression d'ICAM-1	77
C.	VE-statine et cancer	77
1.	Expression de la VE-statine dans les tumeurs humaines	77
2.	VE-statine et métastases.....	78
RESULTATS.....		81
I.	Surexpression de la VE-statine par un système inductible	83
A.	Surexpression de la VE-statine par un système inductible et caractérisation des clones <i>in vitro</i>	84
B.	Effet de la stimulation par la doxycycline <i>in vivo</i>	87
1.	L'induction par la doxycycline retarde la croissance tumorale	87
2.	Analyse de l'angiogenèse tumorale.....	89
3.	Problèmes de reproductibilité <i>in vivo</i>	90
II.	Etude de l'effet de la VE-statine surexprimée par infection virale sur la tumorigenèse	91
A.	Surexpression de la VE-statine par un système d'infection virale	91
B.	Caractérisation des lignées 4T1 et LLC1 infectées <i>in vitro</i>	93
C.	Effet de la surexpression de la VE-statine sur la tumorigenèse <i>in vivo</i>	94
1.	Augmentation de la croissance tumorale	94
2.	Validation de l'approche de surexpression de la VE-statine	95
3.	Augmentation de l'invasion métastatique	97
4.	Caractérisation des tumeurs.....	99
a)	Etude de la prolifération et de la mort cellulaires.....	99
b)	Etude des vaisseaux intra-tumoraux	101
(1)	Quantification des vaisseaux.....	101
(2)	Analyse qualitative des vaisseaux sanguins	102
c)	Etude par <i>PCR Arrays</i> et <i>Protein Arrays</i>	105
5.	Rôle de la VE-statine sur l'immunité anti-tumorale	109
a)	Diminution du nombre de cellules immunitaires	109
b)	Diminution de l'expression des cytokines inflammatoires	116
c)	Absence d'effets de la VE-statine en absence d'un système immunitaire fonctionnel .	117

III.	Inhibition de l'adhérence des leucocytes par la VE-statine	119
A.	Répression des molécules d'adhérence <i>in vivo</i>	119
B.	Répression des molécules d'adhérence <i>in vitro</i>	121
	DISCUSSION et PERSPECTIVES	125
1.	Système d'expression inductible par la doxycycline	127
2.	Effet de la VE-statine sur la croissance tumorale et sur la réponse immunitaire	128
3.	Implication des LOX dans les effets de la VE-statine ?.....	131
4.	Effet de la VE-statine sur l'angiogenèse tumorale	133
5.	Rôle de la VE-statine dans l'endothélium normal.....	134
	MATERIEL et METHODES	137
I.	Surexpression de la VE-statine et tests <i>in vitro</i>	139
A.	Cellules	139
B.	Stratégies de surexpression de la VE-statine	139
C.	Tests <i>in vitro</i>	140
II.	Etude de la tumorigenèse in vivo	141
A.	Modèles tumoraux	141
B.	Perfusion des vaisseaux tumoraux.....	141
C.	Analyse histologique des tumeurs et des poumons.....	142
1.	Préparation des échantillons	142
2.	Anticorps utilisés.....	142
3.	Immunohistochimie pour microscopie dans le visible	144
a)	Marquage manuel.....	144
b)	Marquages automatisés	146
4.	Immunofluorescence	146
5.	Acquisitions et analyses d'images.....	147
D.	Cytométrie en flux.....	147
III.	Analyse des taux d'ARNm et de protéines.....	148
A.	RT-PCR quantitative.....	148
B.	<i>PCR Array</i>	149
C.	Western-blot	149

D. <i>Protein Array</i>	149
IV. Statistiques	150
BIBLIOGRAPHIE.....	151
ANNEXES.....	169
Curriculum vitae.....	171
Article.....	173

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses.	32
Figure 2 : Microenvironnement d'une tumeur primaire.	35
Figure 3 : Structure des différents types de vaisseaux.	38
Figure 4 : Hiérarchisation du réseau vasculaire et lymphatique chez l'embryon.	39
Figure 5 : Différentes étapes de l'angiogenèse et molécules intervenant dans ce processus.	40
Figure 6 : Spécialisation endothéliale en <i>tip</i> et <i>stalk cells</i> lors du bourgeonnement vasculaire.	41
Figure 7 : Différents modes de formation des vaisseaux sanguins tumoraux.	43
Figure 8 : Exemple de molécules pro- et anti- angiogéniques impliquées dans le <i>switch</i> angiogénique.	44
Figure 9 : Morphologie du réseau vasculaire observée par microscopie multiphotonique à balayage laser.	45
Figure 10 : Concept de <i>cancer immunoediting</i>	49
Figure 11 : Destruction des cellules tumorales par une réaction coordonnée du système immunitaire inné et acquis.	50
Figure 12 : Différentes étapes de l'adhérence des leucocytes et les principales molécules d'adhérence impliquées.	57
Figure 13 : Transmigration leucocytaire.	60
Figure 14 : Représentation schématique des LBRC.	62
Figure 15 : Représentation schématique du gène murin <i>VE-statine/egfl7</i>	69
Figure 16 : Alignement des séquences protéiques de la VE-statine de l'Homme, la souris, le rat et le xénope.	71
Figure 17 : Représentation schématique de la protéine VE-statine.	72
Figure 18 : Nombre de cellules endothéliales inchangées mais absence de lumière des vaisseaux primaires chez les poissons injectés avec des morpholinos anti-sens ciblant la <i>VE-statine</i>	74
Figure 19 : Comparaison de l'expression du gène <i>VE-statine</i> par la lignée cancéreuse LLC1 avec celle des lignées fibroblastiques et endothéliales.	84
Figure 20 : Sélection des clones stables inductibles.	85
Figure 21 : La stimulation par la doxycycline n'affecte pas la prolifération cellulaire.	86
Figure 22 : L'induction de la surexpression par la doxycycline réduit fortement la formation de colonies en conditions indépendantes de l'ancrage et la migration.	87
Figure 23 : L'induction de la surexpression de la VE-statine par la doxycycline ralentit la croissance tumorale chez les souris.	88

Figure 24 : Vérification de la surexpression de la VE-statine dans les tumeurs induites à la doxycycline.....	89
Figure 25 : Effet de la surexpression de la VE-statine sur l'angiogenèse tumorale.....	90
Figure 26 : Problèmes de reproductibilité <i>in vivo</i>	91
Figure 27 : Surexpression de la VE-statine par un système d'infection virale.	92
Figure 28 : La surexpression virale de VE-statine n'a pas d'effet sur la croissance sur plastique, la migration et la croissance en conditions indépendantes de l'ancrage <i>in vitro</i>	93
Figure 29 : La surexpression de la VE-statine par les 4T1 augmente la croissance tumorale.....	94
Figure 30 : Confirmation de l'effet pro-tumoral de la surexpression de la VE-statine avec le modèle LLC1 en sous-cutané.	95
Figure 31 : La surexpression de la VE-statine ne modifie pas les taux de miR-126 -3p et -5p.	96
Figure 32 : La surexpression de la VE-statine par les 4T1 augmente le nombre de métastases pulmonaires.	97
Figure 33 : La surexpression de la VE-statine augmente la présence de vésicules lipidiques dans les tumeurs précoces.	98
Figure 34 : Effets de la surexpression de la VE-statine sur la prolifération et la mort cellulaires.	100
Figure 35 : La surexpression de la VE-statine augmente la microdensité vasculaire des tumeurs 4T1.	101
Figure 36 : La surexpression de la VE-statine ne modifie pas le nombre de vaisseaux VEGFR3 ⁺	102
Figure 37 : La surexpression de la VE-statine diminue le marquage collagène IV.....	103
Figure 38 : La perméabilité des vaisseaux sanguins et l'hypoxie sont augmentées dans les tumeurs 4T1-VE.....	104
Figure 39 : Comparaison de l'expression de gènes intervenant dans l'angiogenèse d'une tumeur 4T1-VE par rapport à une tumeur 4T1-Ctrl.....	106
Figure 40 : Vérification des résultats de <i>PCR Array</i> sur des groupes de tumeurs.....	107
Figure 41 : Comparaison de la quantité de protéines intervenant dans l'angiogenèse et des cytokines d'une tumeur 4T1-VE par rapport à une tumeur 4T1-Ctrl.	108
Figure 42 : Diminution de l'infiltration des lymphocytes T dans les tumeurs surexprimant la VE-statine et accumulation de petites cellules nucléées dans leurs vaisseaux.	111
Figure 43 : Diminution de l'infiltration des lymphocytes T CD4 et CD8 dans les tumeurs surexprimant la VE-statine.	112
Figure 44 : Diminution de l'infiltration des cellules NK, des macrophages et des lymphocytes B dans les tumeurs surexprimant la VE-statine.....	113
Figure 45 : Analyse des populations de cellules immunitaires dans les tumeurs par cytométrie en flux.	115
Figure 46 : Analyse des populations de cellules immunitaires dans les rates par cytométrie en flux.	115

Figure 47 : La VE-statine n'a plus d'effets dans un contexte immunodéficient.....	118
Figure 48 : Diminution de l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 dans les vaisseaux sanguins 4T1-VE.	120
Figure 49 : Le traitement des HUVEC avec du milieu conditionné par les cellules 4T1-VE diminue l'adhérence des Jurkat sur les HUVEC.	121
Figure 50 : L'inhibition de la VE-statine endothéliale endogène augmente l'adhérence des Jurkat sur les HUVEC via une surexpression des molécules d'adhérence.	123

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Interactions entre les molécules d'adhérence endothéliales et leurs ligands leucocytaires intervenant dans le roulement des leucocytes.	58
Tableau 2 : Interactions entre les molécules d'adhérence endothéliales et leurs ligands leucocytaires impliquées dans l'activation et l'adhérence ferme.....	59
Tableau 3 : Interactions des molécules jonctionnelles endothéliales avec leurs ligands leucocytaires intervenant dans la diapédèse paracellulaire.	61
Tableau 4 : Diminution du taux d'expression des marqueurs de certaines populations de cellules immunitaires dans les tumeurs surexprimant la VE-statine.	109
Tableau 5 : Effet de la surexpression de la VE-statine sur l'expression de gènes de cytokines pro- et anti- inflammatoires.	116
Tableau 6 : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.....	143
Tableau 7 : Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages.	143
Tableau 8 : Amorces utilisées pour vérifier l'expression des marqueurs des cellules immunitaires ..	148
Tableau 9 : Anticorps utilisés pour les Western-blot.	149

ABREVIATIONS

ADAM : *A Disintegrin And Metalloprotease*
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
Ang : Angiopoïétine
AoSMC : *Aortic Smooth Muscle Cells*
APC : Allophycocyanine
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
BAEC : *Bovine Aortic Endothelial Cells*
Bai1 : *Brain-specific angiogenesis inhibitor 1*
Bax : *Bcl-2 associated X protein*
BCR : *B cell receptor*
BMDC : *Bone Marrow-Derived Cells*
BSA : *Bovine Serum Albumine*
CAF : *Cancer-Associated Fibroblast*
CCL : *Chemokine (C-C motif) Ligand*
CCR7 : *Chemokine (C-C motif) Receptor 7*
Cdh5 : Cadhérine 5 (VE-cadhérine)
CD : Classe de Différenciation
CE : Cellule Endothéliale
Chga : Chromogranine 1
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Col4a3 : Pro-collagène, type IV, alpha 3
COX2 : Cyclo-Oxygénase 2
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CTLA4 : *Cytotoxic-Lymphocyte-Associated Protein 4*
CTGF : *Connective tissue growth factor*
CXCL : *Chemokine (C-X-C motif) Ligand*
CXCR4 : *Chemokine (C-X-C) Receptor 4*
Cy : Cyanine
C5a : *Complement component 5 alpha*
DAMP : *Danger Associated Molecular Pattern*
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
Del-1 : *Developmentally regulated endothelial cell locus 1*
Dll : *Delta-like*
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
Dox : Doxycycline
DSL : Delta/serrate/Lag-2
E-cadhérine : Cadhérine épithéliale
EDG1 : *Endothelial Differentiation Gene 1*
EGF : *Epidermal Growth Factor*
EGFL7 : *EGF-Like domain 7*
EGFR : *EGF Receptor*
EMI : *EMILIN*
EMR1 : *EGF-like module-containing, mucin-like hormone receptor 1*
EREG : Epiréguline
ERM : Ezrine, Radixine, Moésine
EOMA : *Mouse hemangioendothelioma endothelial cells*

ESAM : *Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule*
EtOH : Ethanol
FAK : *Focal Adhesion Kinase*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FGFb : FGF basique
FITC : *Fluorescein Isothiocyanate*
FST : Follistatine
FZD5 : *Frizzled homolog 5*
G-CSF : *Granulocyte Colony Stimulating Factor*
Gal-1 : galectine 1
GFP : *Green Fluorescent Protein*
GlyCAM : *Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule 1*
GM-CSF : *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*
H&E : Hématoxyline/Eosine
HA : *Influenza hemagglutinin*
HCAEC : *Human Coronary Artery Endothelial Cells*
HEK : *Human Embryonic Kidney*
HER-2 : *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*
Hey : *Hairy/enhancer-of split related with YRPW motif*
HGF : *Hepatocyte Growth Factor*
HIF1 α : *Hypoxia-Inducible Factor 1 α*
HLA : *Human Leucocyte Antigen*
HPSE : Héparanase
HUVEC : *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
I-TAC : *Interferon Inducible T-cell Alpha Chemoattractant*
ICAM : *Intercellular Adhesion Molecule*
IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN : Interféron
IHC : ImmunoHistoChimie
IL : Interleukine
IGF : *Insulin Growth Factor*
IP-10 : *IFN γ inducible Protein*
I κ B- α : *Nuclear factor of Kappa light chain gene enhancer in B cells Inhibitor, alpha*
JAM : *Junctional Adhesion Molecule*
Jag : Jagged
KC : *Keratinocyte-derived Chemokine*
KD : *Knock Down*
kDa : kilodalton
LB : Lymphocyte B
LBRC : *Lateral Border Recycling Compartment*
LFA-1 : *Leucocyte Function associated Antigen-1*
LLC1 : *Lung Lewis Carcinoma 1*
LOX : Lysyl oxydase
LT : Lymphocyte T
LTc : Lymphocyte T cytotoxique
LTh : Lymphocyte T *helper*
LTreg : Lymphocyte T régulateur
M Φ : Macrophage
M-CSF : *Macrophage Colony-Stimulating Factor*
Mac-1 : *Macrophage antigen 1*
MAdCAM-1 : *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1*
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCA : Méthylcholanthrène

MCP : *Monocyte Chemoattractant Protein*
MDK : *Midkine*
MDSC : *Myeloid-Derived Suppressor Cells*
MEC : *Matrice ExtraCellulaire*
MEF : *Mouse Embryonic Stem Cell*
MIG : *Monokine Induced by Gamma interferon*
MIP-1 α : *Macrophage Inflammatory Protein 1 α*
miR : *Micro-ARN*
MMP : *Matrix MetalloProteinase*
MSC : *Mesenchymal Stem Cells*
NE : *Neutrophil Elastase*
NF- κ B : *Nuclear Factor of Kappa-light chain gene enhancer in B cells*
NK : *Natural Killer*
NKT : *Natural Killer T*
NICD : *Notch IntraCellular Domain*
NO : *Nitric Oxide*
NOS : *NO synthase*
NOSe : *NOS endothéliale*
NOSn : *NOS neurale*
NOSi : *NOS inductible*
NPR : *Natriuretic Peptide Receptor*
PAF : *Platelet-Activating Factor*
PAI-1 : *Plasminogen activator Inhibitor Inhibitor 1*
PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PBS : *Phosphate-Buffered Saline*
PCE : *Progéniteurs de cellules endothéliales*
PECAM1 : *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*
PD-1 : *Programmed Death Receptor 1*
PDGF-BB : *Platelet-Derived Growth Factor-BB*
PDGFR : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*
PD-L1 : *Programmed Death receptor Ligand 1*
PE : *Phycoérythrine*
PFA : *Paraformaldéhyde*
PF4 : *Platelet Factor 4*
PGE2 : *Prostaglandine E2*
PGF : *Placental Growth Factor*
PGI2 : *Prostacycline*
PIGF : *Placenta Growth Factor*
PNAd : *Peripheral Node Addressin*
Prl2c2 : *Prolactin family 2, subfamily c, member 2*
PSGL1 : *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*
PTN : *Pleiotrophine*
RANTES : *Regulated upon Activation, Normally T-expressed, and presumably Secreted*
ROS : *Reactive Oxygen Species*
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*
Rtn : *Réticulum*
RT-PCR : *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*
S1P : *Sphingosine-1-Phosphate*
SCID : *Severe Combined ImmunoDeficiency*
SDF1 α : *Stromal cell-Derived Factor 1 α*
SDS : *Sodium Dodecyl Sulfate*
SERPINF1 : *Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1*
Shh : *Sonic hedgehog*

sh-RNA : *small hairpin RNA*
sICAM : *soluble ICAM*
si-RNA : *small interfering RNA*
SMA : *Smooth Muscle Actin*
SPHK : *Sphingosine Kinase 1*
TAM : *Tumor-Associated Macrophages*
TARC : *Thymus and Activation-Regulated Chemokine*
TBX : *T-box*
TCR : *T Cell Receptor*
TEK : *Endothelial-specific receptor Tyrosine Kinase*
TEM : *Monocytes exprimant Tie2*
TGF β : *Transforming Growth Factor beta*
Tie : *Tyrosine kinase receptor*
TIMP : *Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProteinase*
TLR : *Toll-Like Receptor*
TMPRSS6 : *Transmembrane serine protease 6*
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha*
Tnni2 : *Troponin I type 2 (skeletal, fast)*
Tnni3 : *Troponin I type 3 (cardiac)*
TSP1 : *Thrombospondine 1*
TRAIL : *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*
TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling*
uPA : *urokinase Plasminogen Activator*
VAP-1 : *Vascular Adhesion Protein 1*
VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor A*
VEGFR : *VEGF Receptor*
VE-cadhérine : *Vascular Endothelial cadherin*
VE-statine : *Vascular Endothelial-statin*
VLA-4 : *Very Late Activation 4*
VVO : *Vesiculo-Vacuolar Organelle*

AVANT-PROPOS

La VE-statine/EGFL7 est une protéine, découverte au sein du laboratoire, majoritairement exprimée par les cellules endothéliales au cours du développement embryonnaire et du remodelage vasculaire. Plusieurs publications ont montré son implication dans la formation des vaisseaux.

A mon arrivée dans l'équipe fin 2008, très peu de données reliaient la VE-statine au cancer. Cependant, une expression de la VE-statine dans des tumeurs du poumon et du rein avait été rapportée. De plus, étant donné que l'angiogenèse est indispensable au développement tumoral, le rôle de la VE-statine dans la formation physiologique de vaisseaux sanguins laissait suspecter un potentiel rôle de cette protéine dans la tumorigenèse. L'objectif de ma thèse a donc été d'étudier, pour la première fois, l'effet de la VE-statine dans la croissance et dans l'angiogenèse tumorales à l'aide de modèles de tumorigenèse expérimentale.

L'introduction bibliographique est découpée en trois chapitres. Dans la première partie, les caractéristiques des cellules cancéreuses et l'importance du microenvironnement dans la tumorigenèse sont présentées, puis l'angiogenèse physiologique et tumorale sont décrites. La deuxième partie est consacrée à la réponse immunitaire anti-tumorale, avec notamment une partie qui décrit le rôle de l'endothélium dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Enfin, je décris les connaissances actuelles sur la VE-statine.

La partie expérimentale porte sur l'étude de l'effet de la VE-statine dans la tumorigenèse. Dans un premier temps, je décris les résultats obtenus par la première stratégie de surexpression de la VE-statine par les cellules tumorales, ainsi que les problèmes techniques rencontrés. La deuxième partie est consacrée aux résultats obtenus avec une autre stratégie de surexpression. La dernière partie décrit le rôle de la VE-statine dans l'adhérence des cellules immunitaires. La deuxième et troisième partie concernent des travaux expérimentaux effectués avec le Dr Sébastien Pinte, chercheur post-doctorant au sein de l'équipe de recherche. Ces résultats font l'objet d'une publication en co-premier auteur en révision dans *Cancer Research*.

Enfin, je conclus ce mémoire par une discussion des résultats obtenus et je propose des perspectives de travail pouvant contribuer à une meilleure compréhension du rôle de la VE-statine.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Cancer et angiogenèse

A. Généralités sur le cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anarchique de certaines cellules de l'organisme au sein d'un tissu normal (tumeur primaire) et par une dissémination de ces cellules vers des sites secondaires (métastases). Plusieurs altérations génétiques sont nécessaires afin qu'une cellule normale se transforme en cellule cancéreuse et leurs conséquences sont d'autant plus importantes qu'elles consistent en l'activation d'oncogènes ou à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur.

1. Etapes de la tumorigenèse

Depuis les années 1950, des modèles de tumorigenèse expérimentale induite par un carcinogène chimique ont permis de définir trois phases dans la tumorigenèse : l'initiation, la promotion et la progression [Balmain *et al.*, 1988; Pitot, 2001].

L'initiation est caractérisée par la survenue d'une mutation génétique irréversible dans une cellule somatique, causée par un agent carcinogène (virus, agents chimiques, radiations...). Les dommages à l'ADN sont normalement réparés, ce qui permet la survie de la cellule ou alors, s'ils sont irréparables, la cellule meurt par apoptose. Cependant, dans certains cas, la mutation n'est pas corrigée et la cellule n'est pas éliminée, ce qui conduit à la formation d'une cellule dite « initiée ». Cette mutation seule n'est pas suffisante pour former une tumeur.

La phase de promotion correspond à la prolifération des cellules initiées en population cellulaire clonale sous l'action d'un agent promoteur. Cela aboutit à la formation de lésions précancéreuses. Ce phénomène est réversible car le retrait de l'agent promoteur permet d'arrêter la prolifération cellulaire.

L'évolution de ces cellules vers un phénotype malin est causée par l'accumulation de multiples altérations génétiques. Les cellules acquièrent alors des capacités d'invasion locorégionale puis métastatique, c'est la phase de progression. La dissémination métastatique nécessite l'intravasation de cellules tumorales et leur survie dans la circulation sanguine ou lymphatique, puis l'extravasation dans un tissu et le développement d'une tumeur secondaire [Chambers *et al.*, 2002].

2. Caractéristiques des cellules cancéreuses

En 2000, Hanahan et Weinberg ont décrit les six caractéristiques majeures des cellules cancéreuses, communes à tous types de tumeurs malignes [Hanahan et Weinberg, 2000]. Celles-ci ont été récemment actualisées par les mêmes auteurs (**Figure 1**) [Hanahan et Weinberg, 2011].

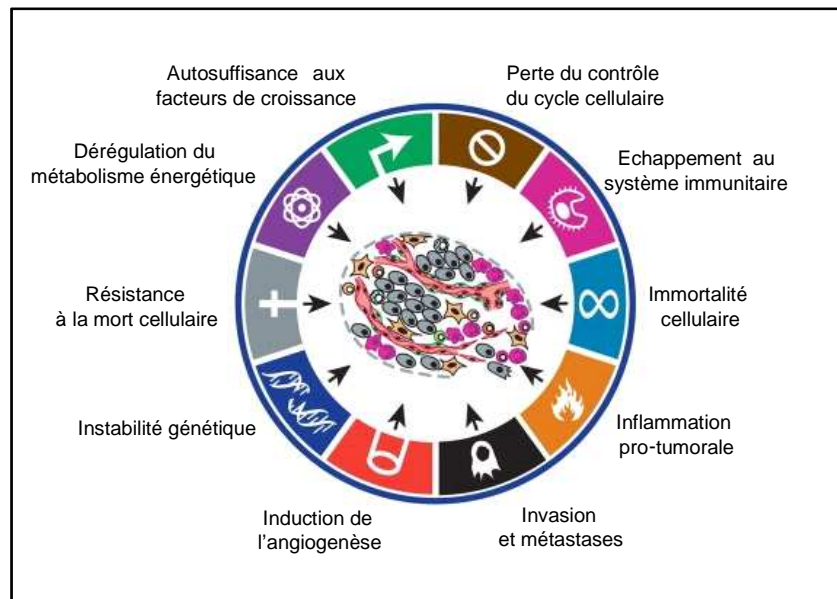


Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses.
D'après [Hanahan et Weinberg, 2011].

Ces caractéristiques sont la conséquence des altérations génétiques acquises par les cellules tumorales au cours du processus de tumorigenèse d'une part et de l'interaction entre ces cellules et les cellules stromales (endothéliales ou immunitaires par exemple) d'autre part. Je vais décrire brièvement ces différentes caractéristiques en les illustrant par des exemples.

➤ **Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération**

Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses n'ont plus besoin d'être stimulées par des signaux de prolifération produits par les cellules environnantes pour proliférer, car elles génèrent leurs propres signaux. Les causes de l'autosuffisance aux facteurs de croissance peuvent être multiples. Premièrement, la production de facteurs de croissance par les cellules tumorales ou par les cellules du microenvironnement tumoral peut être augmentée. Deuxièmement, les gènes des récepteurs aux facteurs de croissance des cellules tumorales peuvent comporter des mutations. Ces mutations sont responsables, par exemple, de la surexpression de ces récepteurs, comme c'est le cas pour le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) dans le cancer du sein [Sainsbury *et al.*, 1985]. D'autres mutations permettent l'activation constitutive du récepteur, c'est-à-dire l'activation du récepteur en absence de ligand [Lemmon et Schlessinger, 2010]. Troisièmement, des protéines impliquées dans les voies de signalisation induites par les facteurs de croissance sont constitutivement actives, comme c'est le cas pour les protéines Ras et MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) [Hoshino *et al.*, 1999].

➤ **Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance**

Les protéines régulant le cycle cellulaire sont dérégulées dans les cellules cancéreuses, par une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur *Rb* (rétinoblastome) et *p53* par exemple [Weinberg, 1995; Vogelstein *et al.*, 2000]. Les cellules tumorales perdent également leur inhibition de contact. L'un des mécanismes est la perte de l'expression du gène suppresseur de tumeur *NF2*. Ce

gène code pour la protéine cytoplasmique Merlin qui stabilise les jonctions adhérentes, en autres, en couplant la protéine jonctionnelle cadhérine épithéliale (E-cadhérine) avec le récepteur transmembranaire à l'EGF [Curto *et al.*, 2007].

➤ **Résistance à la mort cellulaire**

Au cours de leur transformation, les cellules acquièrent une résistance à l'apoptose. Celle-ci peut être due à une diminution de l'expression de protéines pro-apoptotiques, comme Bax (*Bcl-2 associated X protein*) dans les cancers du sein et les hépatocarcinomes par exemple, ou à une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2 dans les cancers du poumon, de la prostate ou les lymphomes non-hodgkiniens entre autres [Kirkin *et al.*, 2004]. Cette résistance peut également être causée par l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *p53*, car la protéine *p53* induit l'apoptose en augmentant l'expression de Bax [Miyashita et Reed, 1995]. De plus, la mort par autophagie, qui est également une barrière à la tumorigenèse, est également altérée [Roy et Debnath, 2010].

➤ **Immortalité cellulaire**

La prolifération illimitée des cellules tumorales nécessite le maintien de la longueur des télomères situés à l'extrémité des chromosomes. Dans les cellules normales, les télomères sont raccourcis à chaque division jusqu'à une taille critique qui va déclencher la sénescence ou la mort de la cellule. La télomérase est l'enzyme qui synthétise de l'ADN télomérique et son activité est augmentée dans de nombreux cancers [Kim *et al.*, 1994].

➤ **Capacité à induire l'angiogenèse**

L'angiogenèse est nécessaire à la croissance tumorale. Elle permet en effet la formation de vaisseaux sanguins, qui alimentent la tumeur en oxygène et en nutriments. Cette partie sera développée en **I.B.4.**

➤ **Capacité d'invasion métastatique**

L'invasion métastatique nécessite le détachement des cellules tumorales de leurs voisines. Plusieurs molécules intervenant dans l'adhérence cellulaire sont dérégulées dans les cellules tumorales métastatiques, telles que les cadhérines ou les intégrines. Par exemple, la E-cadhérine, une protéine intervenant dans l'adhérence entre les cellules, est réprimée ou inactivée dans les carcinomes humains [Christofori et Semb, 1999]. La dégradation de la matrice extracellulaire par des protéases est également indispensable, d'où l'augmentation de l'expression et de l'activation des protéases, telles que les métalloprotéases matricielles (MMP, *Matrix MetalloProteinase*), retrouvée dans les tumeurs invasives [Egeblad et Werb, 2002]. Les cellules tumorales intravasent ensuite dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, puis extravasent au niveau de sites d'invasion préférentiels. L'interaction de chimiokines et leurs récepteurs est l'un des mécanismes responsables de ce tropisme cellulaire. Par exemple, les récepteurs aux chimiokines CXCR4 (*chemokine (C-X-C motif) Receptor 4*) et CCR7 (*chemokine (C-C motif) Receptor 7*) sont fortement exprimés par les cellules humaines de

cancer du sein et leurs ligands respectifs, SDF1 α (*Stromal cell-Derived Factor 1* ou CXCL12, *chemokine (C-X-C motif) ligand 12*) et CCL21 (*chemokine (C-C motif) ligand 21*), sont retrouvés aux sites métastatiques préférentiels [Müller *et al.*, 2001].

➤ **Instabilité génétique**

L'instabilité génétique est l'une des caractéristiques des cellules malignes. Elle peut être de plusieurs types : petites mutations géniques, altérations du nombre de chromosomes, translocation chromosomique ou amplification de gènes [Lengauer *et al.*, 1998]. Les cellules cancéreuses possèdent également des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones) par rapport aux cellules normales [Berdasco et Esteller, 2010]. L'accumulation de ces mutations, aberrations génomiques et modifications épigénétiques permet la progression du processus de tumorigenèse.

➤ **Inflammation pro-tumorale**

L'inflammation peut avoir un effet pro-tumoral sur toutes les étapes de la tumorigenèse, de l'initiation à la progression tumorale et la dissémination métastatique. D'une part, l'inflammation chronique, induite par les maladies auto-immunes ou par l'obésité par exemple, augmente le risque de cancer. D'autre part, le recrutement au niveau de la tumeur de cellules immunitaires, telles que les macrophages de type TAM (*Tumor-Associated Macrophages*) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*), permet la mise en place d'un microenvironnement tumoral inflammatoire. Cette réponse inflammatoire peut, entre autres, promouvoir l'angiogenèse, la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Elle augmente également l'instabilité génétique [Grivennikov *et al.*, 2010].

Contrairement aux 8 caractéristiques précitées, les deux suivantes ne sont pas, dans l'état actuel des connaissances, généralisables à l'ensemble des tumeurs.

➤ **Dérégulation du métabolisme énergétique de la cellule**

Le phénotype métabolique des cellules tumorales est anormal, cela est dû aux altérations génétiques mais également à l'influence du microenvironnement. La modification des voies métaboliques permet la production rapide d'ATP pour maintenir le statut énergétique, l'augmentation de la biosynthèse de macromolécules et le maintien d'un statut redox approprié. Le phénotype le mieux caractérisé est l'effet Warburg : les cellules cancéreuses produisent de l'ATP par glycolyse, même en présence d'oxygène normal, alors que les cellules non tumorales utilisent la voie de la phosphorylation oxydative qui permet une production plus importante de molécules d'ATP. Il existe plusieurs concepts pour expliquer l'utilisation de la glycolyse aérobie par les cellules tumorales. Moins efficace que la phosphorylation oxydative, elle permet cependant de générer plus rapidement de l'ATP, ce qui est un avantage lorsque les réserves en glucose ne sont pas limitées. La deuxième explication est que le métabolisme glycolytique est une adaptation aux conditions hypoxiques fréquemment retrouvées dans les tumeurs, c'est-à-dire qu'il permet la production d'ATP en absence

d'apport d'oxygène suffisant. Selon le concept le plus récent, la glycolyse permet la synthèse des nucléotides, des aminoacides et des lipides, permettant ainsi la biosynthèse des macromolécules et organelles nécessaires pour produire une nouvelle cellule [Cairns *et al.*, 2011].

➤ Echappement au système immunitaire

De nombreux mécanismes permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à l'action anti-tumorale du système immunitaire, dont la diminution de la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunitaires ou l'augmentation de la résistance aux effets cytotoxiques de l'immunité par exemple [Vesely *et al.*, 2011]. Ils seront développés en partie **II.B.2.c**).

3. Importance du microenvironnement

Une tumeur n'est pas uniquement constituée de cellules cancéreuses, elle se développe dans un stroma tumoral. Il est composé de cellules endothéliales et lymphatiques, de fibroblastes, de cellules immunitaires et de protéines de la matrice extracellulaire (**Figure 2**). Ce microenvironnement tumoral est une composante importante pour le développement tumoral.

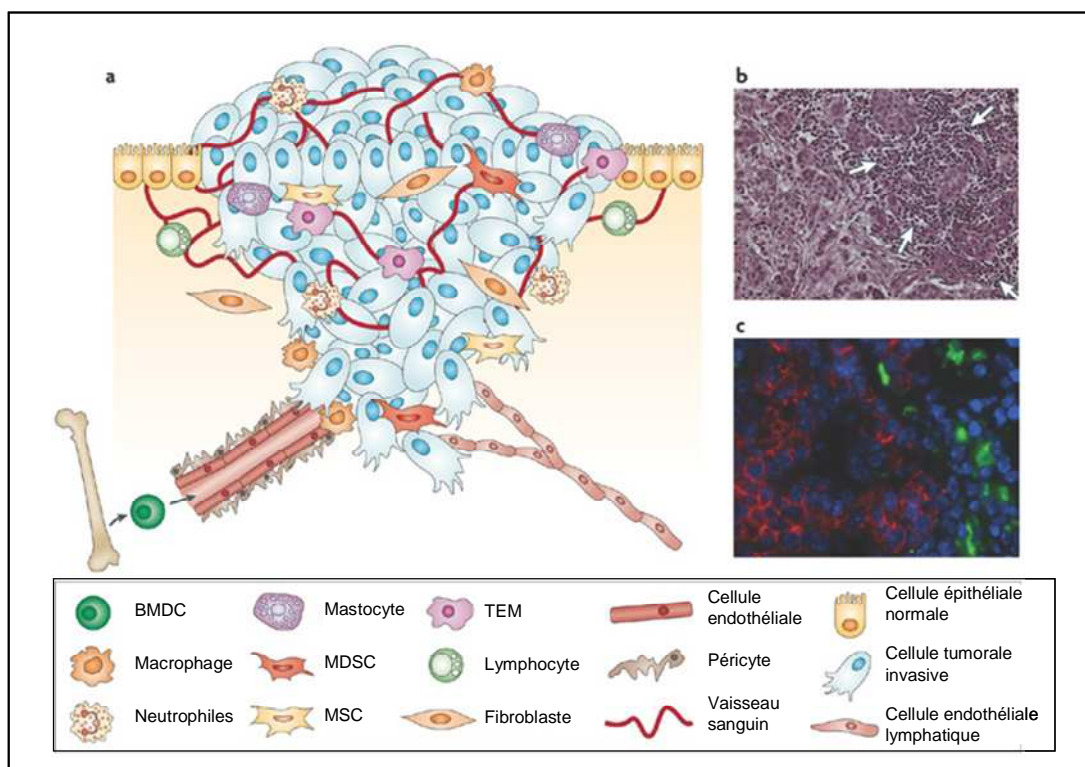


Figure 2 : Microenvironnement d'une tumeur primaire.

a. Les cellules cancéreuses évoluent dans un microenvironnement tumoral composé de cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques, de fibroblastes activés et de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC, *Bone Marrow-Derived Cells*) : macrophages, cellules myéloïdes suppressives (MDSC, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*), monocytes exprimant Tie2 (TEM) et cellules souches mésenchymateuses (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*). **b.** Importante infiltration leucocytaire (flèches) au niveau de la marge invasive d'une tumeur humaine de cancer du sein (coloration hématoxyline-éosine). **c.** Présence de macrophages exprimant la cathepsine B (vert) associée à la perte de la E-cadhérine (rouge) des cellules voisines au niveau de la marge invasive d'une tumeur de cancer pancréatique, les noyaux sont visualisés par un marquage DAPI (bleu). D'après [Joyce et Pollard, 2009]

Les cellules endothéliales composent les vaisseaux nécessaires à l'alimentation de la tumeur et leur activation permet le déclenchement de l'angiogenèse afin de former des néo-vaisseaux tumoraux. Les vaisseaux endothéliaux et lymphatiques permettent également la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme.

Les fibroblastes retrouvés au sein des tumeurs (CAF, *Cancer-Associated Fibroblasts*) sont des fibroblastes activés. Ils ont un taux de prolifération élevé et leurs fonctions sont multiples. Ils sont impliqués dans le dépôt de la matrice extracellulaire et son renouvellement via la production de protéines de la matrice extracellulaire (collagènes, fibronectine), mais également de protéases qui dégradent cette matrice, comme les MMP -2, -3 et -9. De plus, leur sécrétion de facteur de croissance transformant TGF β (*Transforming Growth Factor beta*) et de SDF1 stimule la prolifération et l'invasion des cellules tumorales. Ils sont également impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire avec la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire interleukine 1 (IL-1) ou de la protéine chimio-attractante des monocytes MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) [Kalluri et Zeisberg, 2006]. Ils produisent également du VEGF (VEGF-A, *Vascular Endothelial Growth Factor A*), acteur majeur de l'angiogenèse [Fukumura *et al.*, 1998].

Certaines cellules immunitaires stimulent la progression tumorale, d'une part, par leur action anti-inflammatoire, qui inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale. D'autre part, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) participent à la progression tumorale et à la dissémination métastatique en produisant des protéases, comme les MMP -7 et -9, mais également des facteurs de croissance, tels que le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), le HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), l'EGF, le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et le TGF β [Joyce et Pollard, 2009]. Les TAM stimulent également l'angiogenèse, notamment en produisant du VEGF [Barbera-Guillem *et al.*, 2002].

Les cellules non néoplasiques sont également importantes pour le développement métastatique. Tout d'abord, lorsque les cellules tumorales pénètrent dans de petits vaisseaux sanguins, leur association avec des éléments figurés du sang comme les plaquettes les protège de la destruction par les forces du cisaillement du flux sanguin. Leur capacité à extravaser au niveau d'un site secondaire est ainsi augmentée [Im *et al.*, 2004].

Cette extravasation a lieu dans des sites d'invasion préférentiels. D'une part, les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans ce tropisme cellulaire. D'autre part, des cellules non-néoplasiques participent à la mise en place d'un microenvironnement favorable à l'implantation et au développement des métastases aux niveaux de ces sites secondaires. C'est le concept de niche pré-métastatique qui a été formulé en 2005. Dans un modèle expérimental de tumorigenèse, des cellules non-néoplasiques, les progéniteurs hématopoïétiques VEGFR1⁺ (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*), sont recrutés au niveau des sites fréquents des futures métastases avant l'arrivée des cellules tumorales. Ce recrutement est dû à l'interaction de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4, *Very Late Activation 4*) produite par les progéniteurs VEGFR1⁺ avec son ligand, la fibronectine dont la production par les fibroblastes a été stimulée par des facteurs de croissance tumoraux. Il a été observé que chez les patients atteints d'un cancer de sein, du poumon ou gastrique, le nombre de ces progéniteurs est plus important dans les sites communs de métastases [Kaplan *et al.*, 2005]. Des

cellules myéloïdes Mac1⁺ (CD11b) sont également recrutées au niveau de la niche pré-métastatique [Hiratsuka *et al.*, 2006] et la lysyl oxydase LOX participe à ce recrutement. Cette enzyme sécrétée par les cellules tumorales hypoxiques s'accumule au niveau des sites pré-métastatiques. Cette amine oxydase permet la modification de la matrice extracellulaire, ce qui favorise l'infiltration des cellules myéloïdes Mac1⁺ [Erlor *et al.*, 2009]. Les cellules tumorales s'implantent au niveau de ces niches et forment des micro-métastases. Leur développement en macro-métastases nécessite le recrutement des progéniteurs endothéliaux qui vont induire la formation des vaisseaux intra-métastatiques par angiogénèse [Gao *et al.*, 2008].

La transformation des cellules normales en cellules tumorales est donc un processus multi-étapes pendant lequel elles vont acquérir les différentes caractéristiques qui vont leur permettre d'envahir l'organe d'origine puis des organes secondaires. Le microenvironnement tumoral est une composante indispensable à la tumorigénèse.

B. L'endothélium et le processus angiogénique

Parmi les cellules du stroma tumoral, les cellules endothéliales contribuent au développement tumoral par le processus d'angiogénèse. Les vaisseaux sanguins permettent, en fait, l'apport en nutriments et l'oxygénation de la tumeur. Dans cette partie, j'aborde brièvement la structure des vaisseaux sanguins et les différentes fonctions de l'endothélium. Je présente ensuite l'angiogénèse physiologique et des différentes étapes qui la composent. Puis, après avoir cité les différents modes de perfusion des tumeurs, je décris l'angiogénèse tumorale.

1. Structure des vaisseaux sanguins

L'endothélium tapisse l'ensemble du réseau vasculaire et il est composé d'une monocouche de cellules endothéliales à la face interne des vaisseaux, directement au contact du sang.

Les vaisseaux sanguins non matures sont composés d'une monocouche de cellules endothéliales (**Figure 3a.**), tandis que les cellules endothéliales des vaisseaux matures sont entourées par des cellules murales (ou péri-vasculaires). Ce sont des péricytes pour les capillaires (**Figure 3b.**) et des cellules musculaires lisses pour les artérioles, veinules, artères et veines (**Figure 3c., d.**). Les cellules endothéliales et les cellules murales reposent sur une membrane basale composée de protéines de la matrice extracellulaire (collagène IV, laminine...). Les plus gros vaisseaux, artères ou veines, sont composés de trois couches cellulaires superposées : l'intima qui correspond aux cellules endothéliales, la média composée de cellules musculaires lisses et enfin l'adventice constituée de matrice extracellulaire et de fibroblastes. Les artères possèdent de nombreuses fibres élastiques qui permettent, avec les cellules musculaires lisses, la régulation du flux sanguin (**Figure 3d.**) [Jain, 2003].

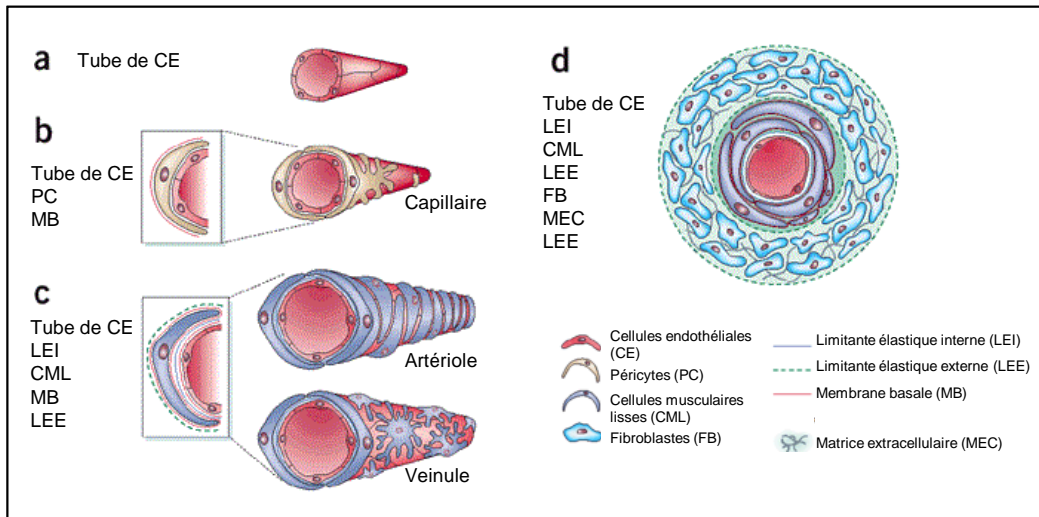


Figure 3 : Structure des différents types de vaisseaux.

a. Vaisseau néoformé pas encore mature. **b.** Capillaire. **c.** Artériole et veinule. **d.** Vaisseau large. D'après [Jain, 2003].

2. Fonctions de l'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire possède de nombreuses fonctions. Il permet l'apport de l'oxygène et des éléments nutritifs aux organes et l'élimination des déchets. Il régule le tonus vasculaire et le flux sanguin. Il participe également à l'hémostase, qui est le processus physiologique permettant l'arrêt des saignements [Michiels, 2003]. Ces fonctions, bien qu'elles soient importantes pour le bon fonctionnement de l'organisme et bien étudiées, ne seront pas développées ici.

L'endothélium est aussi un acteur clé de l'inflammation. Lors d'une réaction inflammatoire, les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhérence qui permettent aux cellules immunitaires d'adhérer sur l'endothélium et migrer dans les tissus enflammés [Ley *et al.*, 2007]. Le processus peut être dérégulé dans les cancers, ce qui participe au phénomène d'échappement de la tumeur au système immunitaire [Castermans et Griffioen, 2007].

L'endothélium participe également à la formation des vaisseaux par angiogenèse. Ce processus consiste en la mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants.

3. Angiogenèse physiologique

L'angiogenèse physiologique intervient essentiellement au cours du développement de l'embryon, de ses annexes et de l'enfant. Chez l'adulte, elle est ponctuellement réactivée dans des situations de reproduction ou de réparation tissulaire (lésions du tissu, inflammation, occlusion d'un vaisseau).

a) Développement vasculaire de l'embryon

Très tôt au cours du développement embryonnaire, le réseau vasculaire se met en place par deux processus : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse correspond à la formation de vaisseaux sanguins à partir de progéniteurs des cellules endothéliales (les angioblastes) et permet la formation du réseau vasculaire primitif. Puis, l'angiogenèse permet la formation de néo-vaisseaux à

partir de ce plexus capillaire primaire, aboutissant à la formation d'un réseau vasculaire plus complexe et hiérarchisé. La lymphangiogenèse permet la mise en place des vaisseaux lymphatiques, également constitués de cellules endothéliales (**Figure 4**).

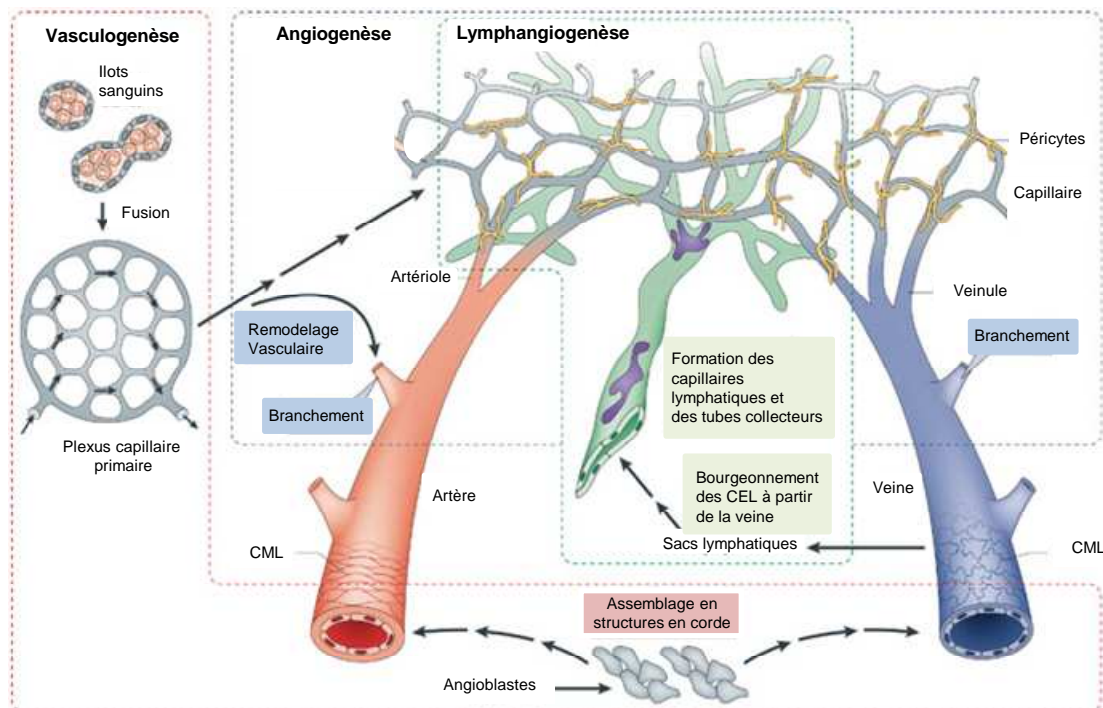


Figure 4 : Hiérarchisation du réseau vasculaire et lymphatique chez l'embryon.

Pendant la phase de la vasculogenèse, les îlots sanguins composés d'angioblastes fusionnent pour former un plexus capillaire primaire dans l'embryon et dans le sac vitellin. L'assemblage des angioblastes en structures en forme de corde permet la formation de l'aorte dorsale et la veine cardinale. Le processus d'angiogenèse intervient pour remodeler les plexi en un réseau plus complexe, hiérarchisé en vaisseaux artériels, veineux et de type capillaire. Les cellules murales sont associées aux vaisseaux sanguins : cellules musculaires lisses vasculaires pour les veines et artères, et péricytes pour les capillaires. Les premières cellules endothéliales lymphatiques dérivent des cellules endothéliales embryonnaires veineuses et migrent pour former les sacs lymphatiques, puis les capillaires lymphatiques et les canaux collecteurs. CML : cellules musculaires lisses, CEL : cellules endothéliales lymphatiques. Adapté d'après [Adams et Alitalo, 2007].

b) Etapes de l'angiogenèse par bourgeonnement

Je décris, dans cette partie, les différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement. Cependant, l'angiogenèse peut également se faire par intussusception, c'est-à-dire par élargissement et subdivision d'un vaisseau en deux, ou encore par septation, processus au cours duquel les cellules endothéliales poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés.

L'angiogenèse par bourgeonnement nécessite l'activation des cellules endothéliales par un stimulus angiogénique, la dégradation de la membrane basale, la migration et la prolifération des cellules sous forme d'un bourgeon capillaire en direction du stimulus et enfin sa maturation (**Figure 5**).

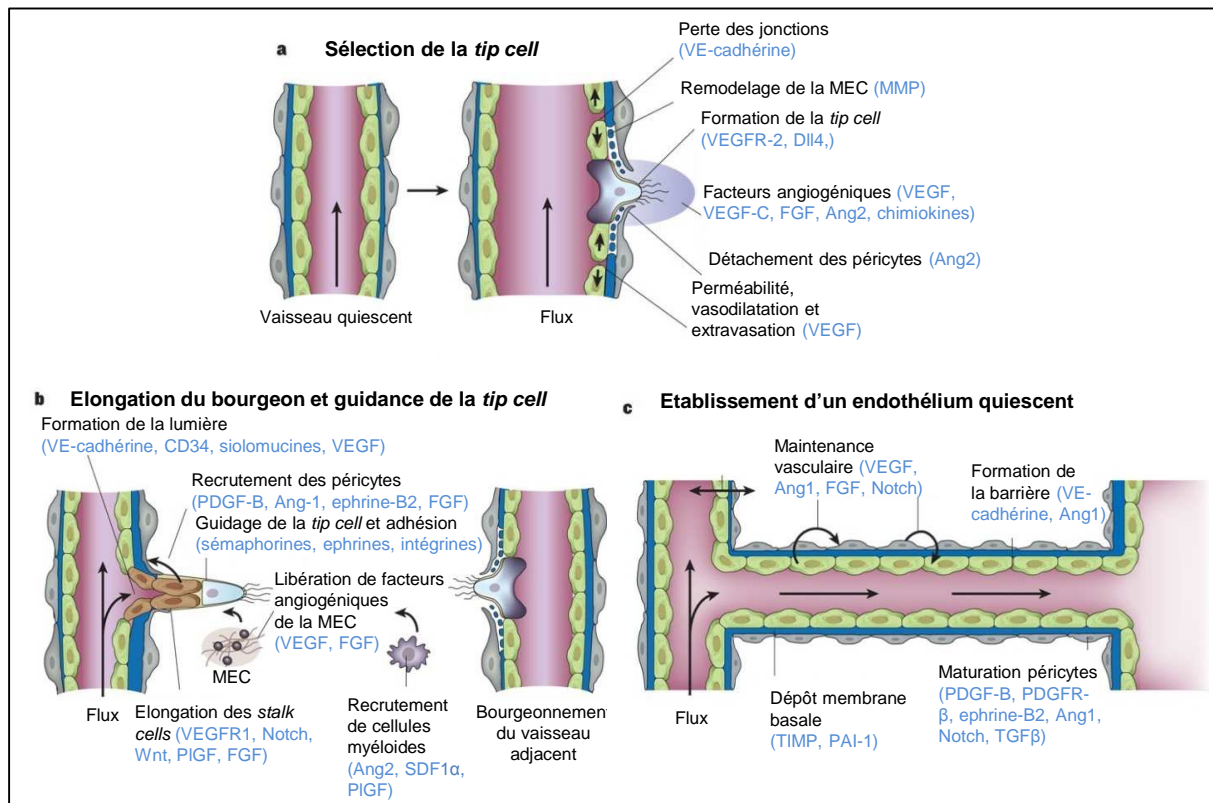


Figure 5 : Différentes étapes de l'angiogenèse et molécules intervenant dans ce processus.

a. Au début du processus d'angiogenèse, une cellule de type *tip cell* est sélectionnée, située à la tête du bourgeon. **b.** L'élongation du bourgeon en direction du gradient de VEGF permet la formation d'un néo-vaisseau. **c.** La dernière étape consiste en l'établissement d'un endothélium quiescent. Les acteurs clés de chaque étape sont cités entre parenthèses. Pour la signification des abréviations, se référer aux pages 23 à 26. D'après [Carmeliet et Jain, 2011].

L'angiogenèse permet l'alimentation des organes en nutriments et en oxygène. En cas d'oxygénation insuffisante, les cellules entrent dans un état d'hypoxie et produisent le facteur HIF1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1 α*) qui stimule la production de VEGF notamment [Shweiki *et al.*, 1992]. La fixation du VEGF sur les récepteurs endothéliaux VEGFR-1 (Flt1) et VEGFR-2 (Flk-1/KDR) active les cellules endothéliales et le déclenchement de l'angiogenèse.

Lorsque l'endothélium est quiescent, il est stabilisé par l'action de l'angiopoïétine-1 (Ang1) sur le récepteur endothélial Tie-2. Mais pendant l'angiogenèse, l'angiopoïétine-2 (Ang2) exerce une activité antagoniste sur ce récepteur. Le vaisseau préexistant est déstabilisé par le détachement des cellules murales des cellules endothéliales. De plus, la dégradation de la matrice extracellulaire par des protéases, telles que l'activateur du plasminogène uPA (*urokinase Plasminogen Activator*), les MMP et les héparinases, permet de créer l'espace nécessaire à la migration des cellules endothéliales. Leur activité protéolytique libère également des facteurs pro-angiogéniques séquestrés dans cette matrice extracellulaire (**Figure 5a., b.**) [Carmeliet, 2003].

De manière concomitante, les cellules endothéliales se spécialisent en deux populations. La cellule située à la tête du bourgeon est nommée la *tip cell*. Elle ne prolifère pas et possède de longs filopodes impliqués dans la migration de ces cellules en direction du gradient de VEGF. Les cellules

sous-jacentes à la *tip cell* sont les *stalk cells* qui prolifèrent rapidement et permettent l'élongation du bourgeon (**Figure 5a., 6a.**) [Gerhardt *et al.*, 2003].

Cette spécialisation endothéliale est sous le contrôle de la voie Notch. La liaison des récepteurs Notch (1 à 4) avec leurs ligands transmembranaires Delta-like (Dll1, 3 et 4) et Jagged (Jag-1 et -2) déclenche le clivage du récepteur par une protéase ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) et par la sécrétase γ . Le domaine intracellulaire généré, appelé le NICD (*Notch IntraCellular Domain*), est transloqué dans le noyau et permet l'expression des gènes cibles de Notch.

La *tip cell* exprime fortement Dll4, alors que la voie Notch est fortement activée dans les *stalk cells*. En effet, la stimulation par le VEGF au niveau de la *tip cell* induit l'expression de Dll4, qui va activer la voie Notch des cellules adjacentes. Cette activation réprime l'expression de VEGFR-2 et du récepteur au VEGF-C (VEGFR-3, Flt4) par ces cellules et inhibe ainsi la formation d'autres *tip cells*. Ces cellules deviennent alors des *stalk cells* (**Figure 6b.**) [Phng et Gerhardt, 2009]. L'inactivation de la voie Dll4-Notch1 ou l'interaction de Notch1 avec Jag1 augmente le nombre de *tip cells* et augmente l'angiogenèse [Hellström *et al.*, 2007; Benedito *et al.*, 2009].

La *tip cell* guide les vaisseaux en direction du gradient de VEGF et la prolifération des *stalk cells* permet l'élongation du bourgeon et la formation d'un tube de cellules endothéliales. La lumière vasculaire est formée au niveau des *stalk cells*.

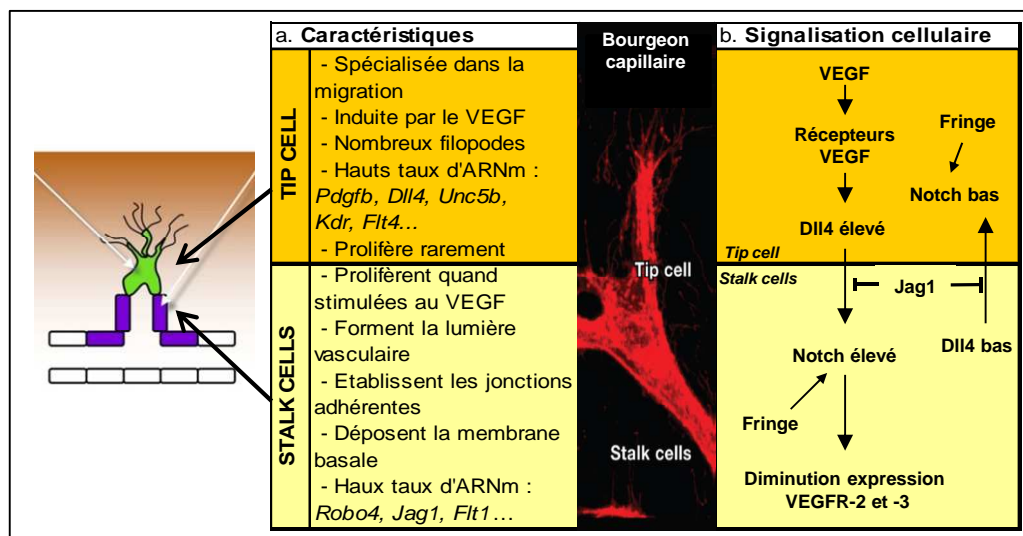


Figure 6 : Spécialisation endothéliale en *tip* et *stalk cells* lors du bourgeonnement vasculaire.

a. L'angiogenèse par bourgeonnement nécessite la spécialisation des cellules endothéliales en *tip* et *stalk cells*, qui possèdent des caractéristiques phénotypiques et moléculaires différentes. **b.** Cette spécification est régulée par la voie Notch. D'après [Phng et Gerhardt, 2009] et [Suchting et Eichmann, 2009].

La dernière étape est la stabilisation du vaisseau immature, qui permet l'entrée du vaisseau dans un état de quiescence (**Figure 5c.**). Plusieurs molécules vont induire la production de matrice extracellulaire, le recrutement de cellules murales et la mise en place des jonctions intercellulaires. La perfusion du néo-vaisseau est également nécessaire à sa maturation car en absence de flux sanguin, le vaisseau régresse.

Les cellules murales participent à la stabilisation du vaisseau en régulant la prolifération des cellules endothéliales. Le PDGFB, produit par les *tip cells*, induit leur recrutement par interaction avec

le récepteur PDGFR β présent au niveau des cellules périvasculaires [Gerhardt *et al.*, 2003]. Le TGF β produit par les cellules endothéliales induit le recrutement de cellules mésenchymateuses et la différenciation en cellules murales [Hirschi *et al.*, 1998]. De plus, le PDGFB et TGF β stimulent également la production de matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses [Amento *et al.*, 1991]. Ang-1 exprimée par les cellules murales participe également à la stabilisation du vaisseau en activant le récepteur endothélial Tie2.

La mise en place des jonctions intercellulaires nécessite, entre autres, l'intervention du sphingolipide S1P (*Sphingosine-1-Phosphate*), sécrété par les plaquettes et les cellules hématopoïétiques. En effet, l'activation du récepteur endothélial EDG1 (*Endothelial Differentiation Gene 1*) par S1P induit la formation de jonctions composées de N-cadhérine entre les cellules endothéliales et cellules murales [Paik *et al.*, 2004]. L'activation des récepteurs EDG1 et 3 permet la localisation de la VE-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes entre cellules endothéliales [Lee *et al.*, 1999].

L'angiogenèse est donc un processus physiologique qui permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cependant, elle peut être dérégulée dans certaines pathologies. Par exemple, elle est insuffisante au cours de la cicatrisation chez les personnes diabétiques ou dans certains cas d'infertilité, mais elle est anormale ou excessive dans l'inflammation chronique, ou encore dans les cancers [Carmeliet, 2003].

4. Vascularisation tumorale

En dessous de 1 à 2 mm, une tumeur est avasculaire. Les nutriments et les déchets circulent par diffusion passive, la tumeur est en phase de dormance, dans la mesure où sa croissance est limitée par cette diffusion. Cependant, afin de croître au-delà de ce volume, la formation de vaisseaux sanguins est indispensable. Dans les années 1970, J. Folkman a formulé l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la formation des vaisseaux déclencherait l'arrêt de la croissance tumorale [Folkman, 1971]. Depuis, de nombreux travaux ont montré que les vaisseaux sanguins sont nécessaires à la croissance tumorale, mais également qu'ils sont une voie de dissémination métastatique avec les vaisseaux lymphatiques.

a) Modes de perfusion des tumeurs

L'angiogenèse tumorale par bourgeonnement permet la formation des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur (**Figure 7a.**). Cependant, il existe également d'autres processus permettant l'alimentation de la tumeur par les vaisseaux qui ne seront pas développés ici :

- **la vasculogénèse** : les progéniteurs de cellules endothéliales dérivés de la moelle osseuse sont recrutés et incorporés au niveau des vaisseaux tumoraux (**Figure 7b.**) [Duda *et al.*, 2006],
- **l'angiogenèse par intussusception** : un vaisseau déjà formé est élargi et subdivisé en deux vaisseaux [Döme *et al.*, 2007] (**Figure 7c.**),

- **la cooption vasculaire** : les cellules tumorales se développent le long de vaisseaux sanguins préexistants [Holash *et al.*, 1999] (**Figure 7d.**),
- **l'imitation vasculaire** (*vascular mimicry*): les cellules tumorales, ayant certaines des caractéristiques de cellules endothéliales, tapissent les vaisseaux tumoraux [Hendrix *et al.*, 2003] (**Figure 7e.**),
- **la différenciation des cellules souches cancéreuses en cellules endothéliales** [Ricci-Vitiani *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010] (**Figure 7f.**). Le phénomène de *vascular mimicry* est sûrement associé à ce mode de formation des vaisseaux tumoraux.

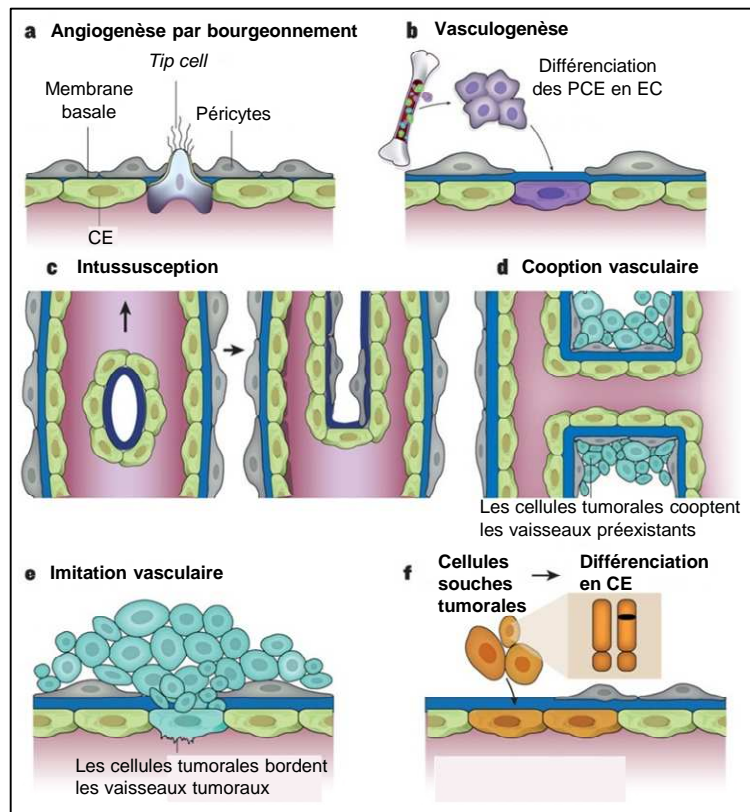


Figure 7 : Différents modes de formation des vaisseaux sanguins tumoraux.

CE : cellules endothéliales ; PCE : progéniteurs de cellules endothéliales. D'après [Carmeliet et Jain, 2011].

b) Angiogenèse tumorale

Le déclenchement de l'angiogenèse tumorale nécessite un *switch* angiogénique [Hanahan et Folkman, 1996], c'est-à-dire une rupture de l'équilibre entre les facteurs anti- et pro- angiogéniques en faveur des molécules pro-angiogéniques (**Figure 8.**). La régulation de l'expression des facteurs angiogéniques peut être due à des stimuli de plusieurs natures, dont l'hypoxie, l'activation d'oncogènes ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur.

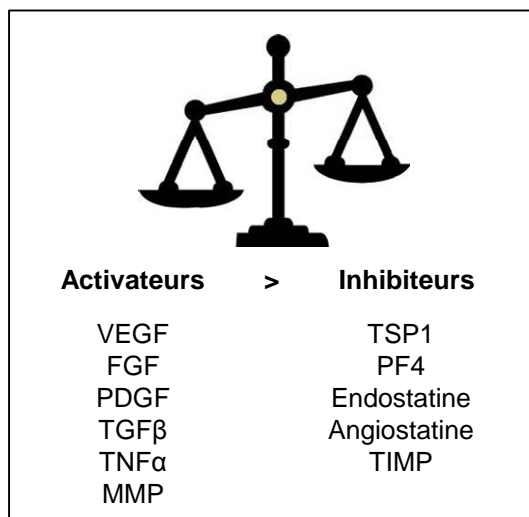


Figure 8 : Exemple de molécules pro- et anti-angiogéniques impliquées dans le *switch* angiogénique.

Tout comme les cellules normales, les cellules tumorales en conditions hypoxiques produisent le facteur HIF1α qui régule positivement l'expression du VEGF. L'augmentation des taux de HIF1α peut également être due à l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *p53* qui est responsable de la dégradation de ce facteur [Ravi *et al.*, 2000]. Les oncogènes participent également au *switch* angiogénique. Par exemple, les récepteurs oncogéniques EGFR et HER2 (*Human Epidermal Growth factor Receptor 2*) stimulent la production de VEGF [Petit *et al.*, 1997] et l'oncogène *H-ras* activé augmente également son expression mais diminue aussi celle de l'inhibiteur d'angiogenèse TSP-1 (thrombospondine 1) [Rak *et al.*, 2000]. Certaines cellules stromales produisent également du VEGF, c'est le cas des fibroblastes et des macrophages infiltrés dans les tumeurs [Fukumura *et al.*, 1998; Barbera-Guillem *et al.*, 2002].

Après le *switch* angiogénique, suivent les étapes de déstabilisation des vaisseaux préexistants, de bourgeonnement et d'élongation du tube de cellules endothéliales, ainsi que la maturation du néo-vaisseau. Cependant ces étapes sont altérées en cas d'angiogenèse tumorale et aboutissent à des vaisseaux sanguins anormaux.

Contrairement à l'architecture bien-organisée, régulière et fonctionnelle de la vascularisation normale, les vaisseaux tumoraux sont courts, tortueux, dilatés, hétérogènes et essentiellement de type capillaire [Fukumura et Jain, 2007] (**Figure 9**).

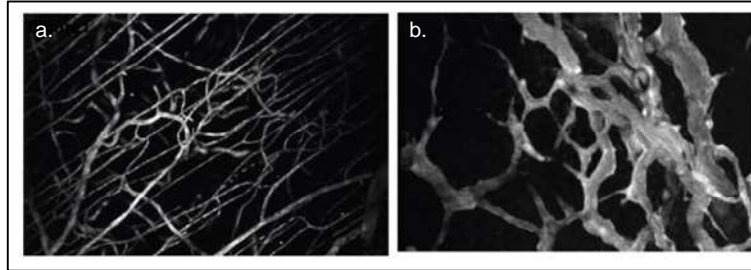


Figure 9 : Morphologie du réseau vasculaire observée par microscopie multiphotonique à balayage laser.

Les tissus normaux ont une vascularisation régulière et bien organisée (a.) alors que la vascularisation des tumeurs est anormale et chaotique (b.). Extrait de [Fukumura et Jain, 2007].

L'organisation des cellules endothéliales en monocouche est défectueuse. Par endroits, les cellules sont superposées ou les jonctions inter-endothéliales sont lâches, permettant ainsi la formation d'ouvertures qui rendent les vaisseaux tumoraux perméables au plasma [Hashizume *et al.*, 2000]. La stabilisation des vaisseaux sanguins est également défailante. Les cellules endothéliales sont peu recouvertes de cellules murales [Tong *et al.*, 2004], ou alors recouvertes mais les cellules murales sont anormales [Morikawa *et al.*, 2002]. La membrane basale des vaisseaux tumoraux est composée, tout comme celle des vaisseaux normaux, de collagène IV, laminine et de nidogène entre autres, cependant son épaisseur est irrégulière. De plus, elle est composée de plusieurs couches et n'est pas toujours associée aux cellules endothéliales et aux cellules murales [Baluk *et al.*, 2003].

Cette structure vasculaire anormale est à l'origine de la circulation sanguine irrégulière et chaotique observée au sein des tumeurs. Dans certains vaisseaux, le sens du flux sanguin peut changer et des régions sont peu ou pas vascularisées [Fukumura et Jain, 2007].

La capacité à induire l'angiogenèse est donc l'une des caractéristiques d'un nouvel organe en formation. Le processus, bien qu'anormal dans les tumeurs, est nécessaire au développement tumoral. Tout comme les cellules endothéliales, les cellules immunitaires composent le microenvironnement tumoral et jouent un rôle important dans l'évolution de la tumeur.

II. Réponse immunitaire anti-tumorale

Le rôle du système immunitaire dans la croissance tumorale est double. Il permet de lutter contre la tumorigenèse, cependant il peut également participer à la progression tumorale. Je commencerai par décrire brièvement les deux types d'immunités existantes. Puis j'expliquerai le concept de *cancer immunoediting*. Pour finir, j'insisterai sur le rôle de l'endothélium dans l'adhérence des leucocytes, étant donné qu'une partie de mes travaux concerne l'infiltration leucocytaire.

A. Quelques notions d'immunologie

Les immunités innée et acquise permettent à l'organisme de lutter contre les agents pathogènes, tels que les bactéries ou les virus. Le système immunitaire module également la croissance tumorale.

La réponse de l'immunité innée, ou naturelle, est immédiate et peu spécifique. La première ligne de défense est la présence de barrières naturelles, les barrières cutanéomuqueuses qui empêchent l'entrée des pathogènes dans l'organisme. Le deuxième processus physiologique de défense est la réaction inflammatoire aiguë, caractérisée par une augmentation locale du flux sanguin, une augmentation de la perméabilité capillaire et une migration des leucocytes dans les tissus. Les cellules de l'immunité innée sont les lymphocytes NK (*Natural Killer*), les monocytes/macrophages, les polynucléaires (granulocytes), les mastocytes et les plaquettes. Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages détruisent l'agent pathogène par phagocytose, tandis que les cellules NK détruisent les cellules cibles via leur activité cytolytique [Genetet, 2002].

Les cellules de l'immunité innée reconnaissent des motifs d'agents pathogènes, les PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), via des récepteurs de l'immunité innée (*pattern-recognition receptors*), composés en majorité des récepteurs de la famille Toll (TLR, *Toll-Like Receptor*) [Chang, 2010]. L'une des autres voies de reconnaissance implique les récepteurs NKG2D, essentiellement exprimés par les cellules NK, qui reconnaissent des ligands surexprimés par les cellules en conditions pathologiques (stress, infection ou transformation) [Raulet, 2003].

Dans la plupart des cas, l'agent pathogène est éliminé par l'immunité innée, cependant, dans le cas contraire, l'immunité innée permet la mise en place d'une réponse immunitaire acquise efficace.

La réponse de l'immunité acquise, ou adaptative, est plus lente mais plus spécifique. Elle fait intervenir les lymphocytes B (LB), producteurs d'anticorps, et les lymphocytes T $\alpha\beta$ (LT), aussi appelés lymphocytes T effecteurs. Parmi les LT $\alpha\beta$, les lymphocytes cytotoxiques (Tc), qui expriment l'antigène CD8 (Classe de Différenciation 8), sont capables de détruire spécifiquement les cellules en libérant des molécules toxiques. Les LT auxiliaires ou *helpers* (Th), quant à eux, expriment le marqueur CD4 et sont impliqués dans la coopération entre cellules. Il existe deux populations de LTh différenciées par leur sécrétion de cytokines. Les LTh de type 1 (Th1) produisent des cytokines telles

que l'IL2, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor alpha*) et l'interféron gamma (IFN γ , interféron de type II) et favorisent l'immunité à médiation cellulaire caractérisée par une réponse cytotoxique. Les LTh de type 2 (Th2) produisent préférentiellement des cytokines telles que les IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et favorisent l'immunité à médiation humorale, c'est-à-dire la production d'anticorps.

La reconnaissance de l'antigène diffère selon les lymphocytes. Les LB possèdent une immunoglobuline membranaire, le récepteur BCR (*B Cell Receptor*), qui leur permet de reconnaître les antigènes sous leur forme native. C'est également le cas des anticorps. Pour ce qui est des LT, la structure de reconnaissance de l'antigène est le récepteur TCR (*T Cell Receptor*). Les LT reconnaissent uniquement les antigènes sous forme de fragments peptidiques associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, dénommé HLA chez l'Homme pour *Human Leucocyte Antigen*). Les molécules du CMH de classe I (CMH-I), localisées à la surface de la quasi-majorité des cellules nucléées, présentent des peptides d'antigènes endogènes provenant de la dégradation de protéines intracellulaires. Elles sont reconnues par les LT CD8. Pour ce qui est des LT CD4, ils reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les protéines du CMH de classe II (CMH-II). Ces protéines présentent des antigènes exogènes, extracellulaires, que la cellule a endocytés, et sont retrouvées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), telles que les macrophages ou les cellules dendritiques. Les CPA font le lien entre l'immunité innée et acquise. Un lymphocyte B ou T reconnaît spécifiquement un seul antigène via son récepteur de surface, cependant la multitude de récepteurs BCR et TCR différents, obtenue par réarrangement génique, permet la reconnaissance d'une grande diversité d'antigènes. Suite à cette reconnaissance, le lymphocyte ainsi activé prolifère. Cette phase est appelée l'expansion clonale car les cellules-filles possèdent la même spécificité que la cellule initialement activée. Il s'en suit une différenciation en cellules effectrices et mémoires. Les lymphocytes T et B mémoires permettent une réaction plus rapide, plus intense et plus efficace en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène [Genetet, 2002].

Il existe un autre type de LT $\alpha\beta$, les LT régulateurs (Treg) caractérisés par l'expression des marqueurs CD4, CD25 et du facteur de transcription Foxp3. Ils maintiennent une tolérance immunitaire en supprimant les réponses des LT effecteurs. Ils jouent ainsi un rôle important pour la lutte contre les maladies auto-immunes [Kim *et al.*, 2007].

Les cellules T $\gamma\delta$ ainsi que les NKT (*Natural Killer T*) sont des LT à la frontière entre l'immunité innée et adaptative. Ils représentent une minorité des LT et possèdent une forte activité cytotoxique [Dranoff, 2004].

B. Le concept de *cancer immunoediting*

1. Evolution du concept d'immunosurveillance

La présence de leucocytes à l'intérieur de tumeurs a été rapportée par Rudolf Virchow au 19^{ème} siècle et au début du 20^{ème} siècle, Paul Ehrlich a émis l'hypothèse d'un contrôle de la tumeur par l'immunité. Puis, le concept d'immunosurveillance a été formulé par Burnet et Thomas à la fin des années 1950. Ils ont déclaré que le système immunitaire, par l'intermédiaire des lymphocytes, reconnaît des antigènes spécifiques des cellules transformées et déclenche la réponse immunitaire, qui permet l'élimination de la tumeur [Dunn *et al.*, 2002]. Par la suite, le concept a été remis en question. En effet, les expériences sur des souris immunodéprimées, de type *nude*, n'ont pas montrées une augmentation de l'incidence des tumeurs spontanées ou induites par un carcinogène chez ces animaux par rapport aux souris immunocompétentes [Stutman, 1974]. Cependant, les souris immunodéficientes utilisées dans ces études ne possédaient pas de LT mais les autres cellules immunitaires, dont celles de l'immunité innée, étaient présentes.

L'apparition des modèles de souris génétiquement modifiées et l'utilisation d'anticorps bloquants ont suscités un regain d'intérêt pour le concept d'immunosurveillance à partir des années 1990. Plusieurs études ont montré l'importance de l'IFN γ et de l'immunité innée et acquise dans la lutte contre le développement de tumeurs spontanées ou chimio-induites [Dighe *et al.*, 1994; Kaplan *et al.*, 1998; Shankaran *et al.*, 2001]. De plus, Shankaran *et al.* ont montré en 2001 que le système immunitaire modifie qualitativement la tumeur, aboutissant à une immunogénicité tumorale réduite. Cette étude a introduit le concept de *cancer immunoediting* [Shankaran *et al.*, 2001], qui se définit comme un processus continu pendant la tumorigenèse, au cours duquel le système immunitaire protège l'organisme contre le développement de tumeurs (immunosurveillance) mais peut également promouvoir la croissance tumorale [Dunn *et al.*, 2002].

2. Les trois phases de l'*immunoediting*

Le concept de *cancer immunoediting* est composé de trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement, qui seront décrits dans cette partie. Les principales cellules et molécules intervenant dans ce processus sont résumées en **Figure 10**.

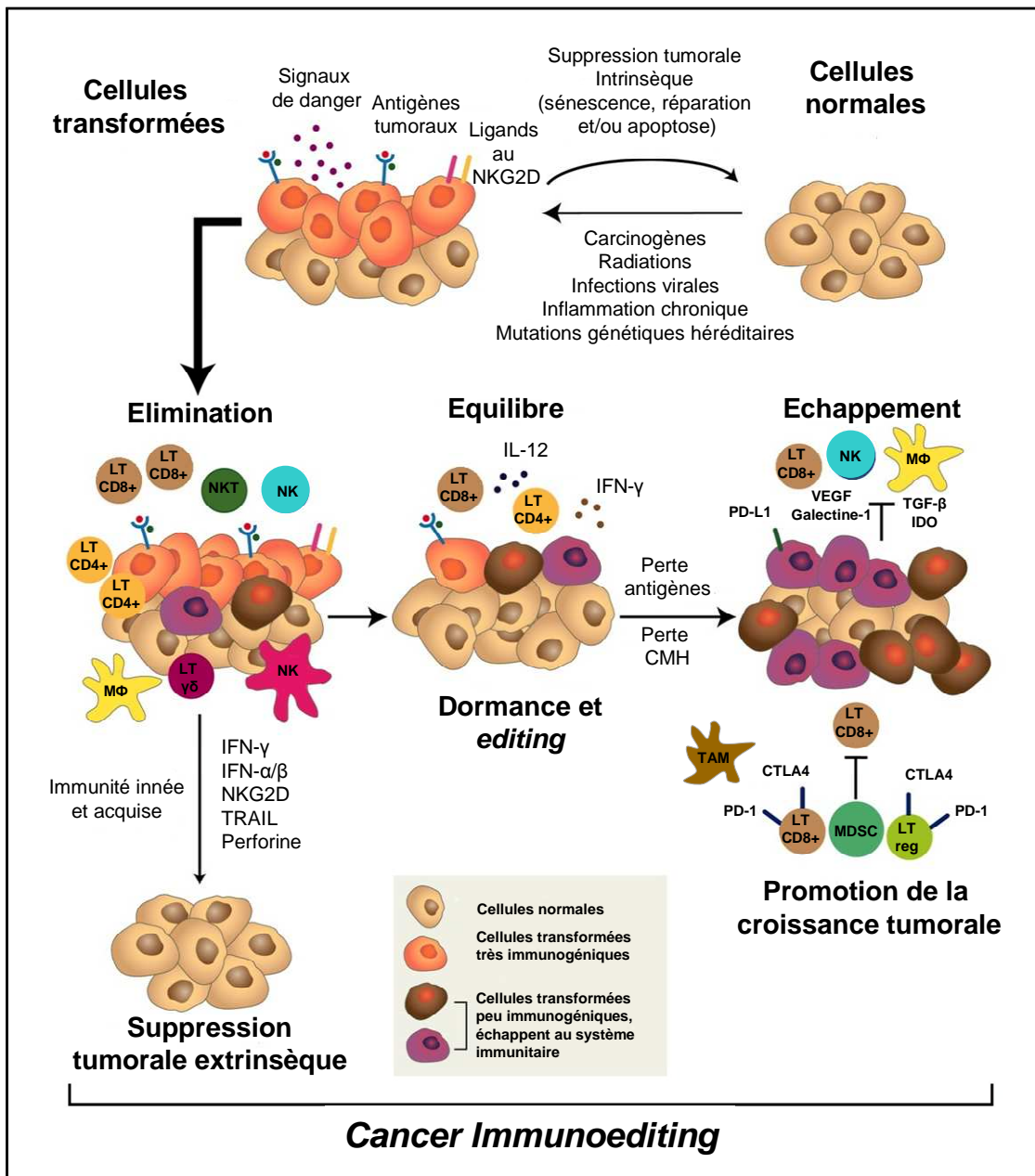


Figure 10 : Concept de *cancer immunoediting*.

Le concept de cancer immunoediting est composé de 3 phases séquentielles. Pendant la phase d'élimination, les immunités innée et acquise reconnaissent et détruisent les cellules transformées. Si l'élimination n'est pas complète, la tumeur entre dans la phase d'équilibre, pendant laquelle l'immunité acquise empêche la croissance tumorale. Cependant, la pression du système immunitaire sur des cellules tumorales génétiquement instables peut aboutir à l'émergence de cellules tumorales peu immunogéniques, insensibles aux effets cytotoxiques des cellules immunitaires et qui induisent l'établissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. La croissance tumorale n'est alors plus contrôlée par le système immunitaire, c'est la phase d'échappement. Pour la signification des abréviations, se référer aux pages 23 à 26. D'après [Schreiber *et al.*, 2011].

a) Élimination

L'immunosurveillance décrite au cours du 20^{ème} siècle correspond, en fait, à la première phase de l'hypothèse d'*immunoediting*, la phase d'élimination. Pendant cette période, les cellules de l'immunité innée et acquise vont détecter et tuer les cellules tumorales immunogéniques, empêchant ainsi le développement tumoral. Il n'y a alors pas de signe clinique apparent et cette phase aboutit, soit à l'éradication de la tumeur, soit au passage à la phase d'équilibre.

(1) Cellules immunitaires et cytokines impliquées

La phase d'élimination a pour caractéristique de faire intervenir à la fois le système immunitaire inné et acquis [Smyth *et al.*, 2001; Girardi *et al.*, 2001]. L'interaction des différentes cellules immunitaires, via la sécrétion de cytokines, permet au système immunitaire d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses, l'angiogénèse tumorale et de déclencher la mort par apoptose des cellules transformées (**Figure 11**).

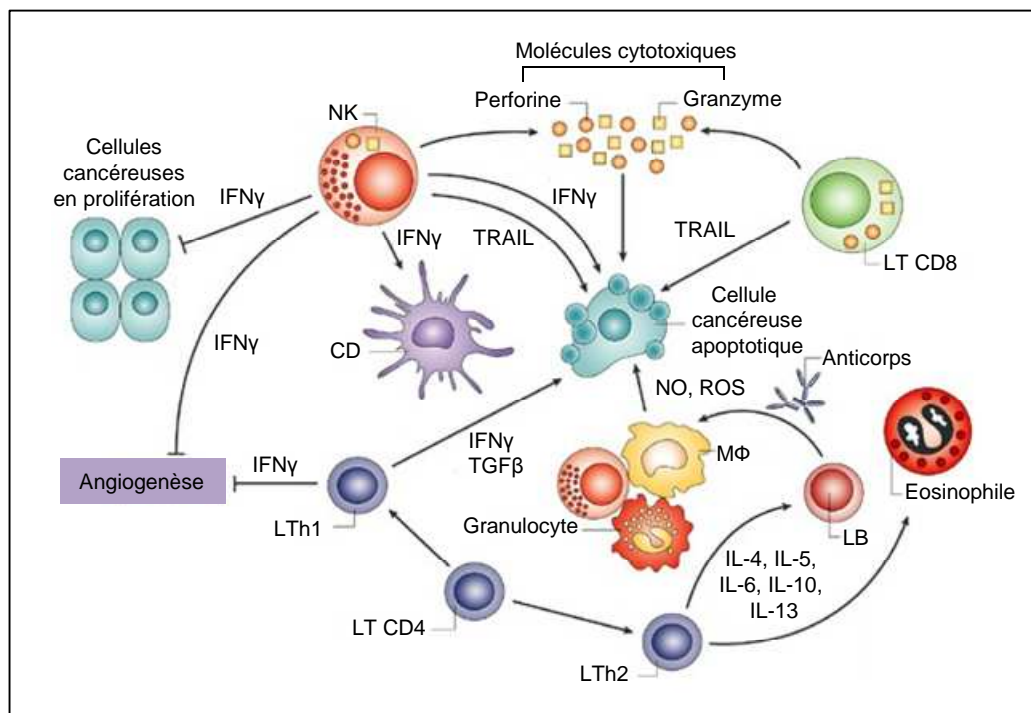


Figure 11 : Destruction des cellules tumorales par une réaction coordonnée du système immunitaire inné et acquis.

L'intervention conjointe des cellules de l'immunité innée (NK, macrophages, granulocytes, éosinophiles, cellules dendritiques) et de l'immunité acquise (LT CD4, LTh1, LTh2, LT CD8) permet de lutter contre le développement tumoral. Parmi les différentes cytokines sécrétées, l'IFN γ joue un rôle anti-tumoral important. Pour la signification des abréviations, se référer aux pages 23 à 26. D'après [Dranoff, 2004].

L'une des molécules importantes dans la phase d'élimination est l'IFN γ [Shankaran *et al.*, 2001]. Cette cytokine pro-inflammatoire, produite par les cellules NK, NKT et par les LT, a, d'une part, des effets non-immunologiques sur les cellules tumorales en inhibant leur prolifération [Bromberg *et al.*, 1996] et l'angiogénèse par l'intermédiaire de l'IP-10 (*IFN γ inducible Protein*) [Sgadari *et al.*, 1996]. D'autre part, ses effets immunologiques sont multiples. Il permet une meilleure reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T en augmentant l'expression des molécules de CMH [Love *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1998; Shankaran *et al.*, 2001]. Il favorise l'action des LTc en stimulant directement leur activation et leur différenciation et en induisant également la différenciation des LTh1 [Fallarino et Gajewski, 1999]. Il inhibe également les LTreg [Nishikawa *et al.*, 2005] et promeut l'apoptose en augmentant, par exemple, la sensibilité des cellules tumorales à la cytotoxicité médiée par le ligand Fas [Xu *et al.*, 1998].

L'IL-12 est une autre cytokine qui promeut l'élimination tumorale, en partie par l'induction de l'expression d'IFN γ [Nastala *et al.*, 1994; Smyth *et al.*, 2001]. Les interférons de type I, IFN α et β , sont également impliqués dans l'immunosurveillance [Dunn *et al.*, 2005].

L'élimination de la tumeur dépend également de la capacité du système immunitaire à détruire les cellules tumorales. En effet, des études de tumorigenèse ont montré l'importance de la perforine et de la protéine pro-apoptotique TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) dans cette phase [Smyth *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2002].

(2) Reconnaissance des cellules tumorales

Afin que les cellules immunitaires puissent détruire les cellules tumorales, il est nécessaire qu'elles les distinguent des cellules normales. Cette reconnaissance peut se faire via des antigènes tumoraux. Chez l'Homme, cinq types ont été identifiés : des antigènes de différenciation (comme les antigènes de différenciation mélanocytaire), des antigènes mutationnels (comme des formes anormales de p53), des antigènes surexprimés ou amplifiés (comme HER-2, *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*), des antigènes viraux (comme les protéines du papillomavirus) et des antigènes du cancer du testicule (CT) [Dunn *et al.*, 2004].

Les cellules tumorales produisent également des signaux de danger reconnus par les récepteurs de la famille Toll. Les TLR sont localisés à la surface des cellules de l'immunité innée, cependant leur expression a été plus récemment décrite chez certains lymphocytes B et T et chez d'autres cellules non immunitaires. Ils participent à la régulation de l'immunité innée et adaptative. Ces récepteurs, qui reconnaissent les motifs de pathogènes PAMPs, sont également capables de reconnaître des signaux de danger endogènes exprimés par les tissus blessés, comme les tumeurs. Ces signaux, appelés les DAMP (*Danger Associated Molecular Patterns*), sont libérés par les tissus endommagés (fragments d'acide hyaluronique et d'héparane sulfate) ou par les cellules nécrotiques (protéines de choc thermiques, protéines nucléaires) [Sims *et al.*, 2010; Chang, 2010].

Les ligands du récepteur NKG2D jouent également un rôle important dans la reconnaissance des cellules tumorales. Ce récepteur est essentiellement exprimé par les cellules NK, mais il est retrouvé chez certains lymphocytes T, comme les LT CD8 activés ou les NKT. Peu présents à la surface des cellules normales, les ligands de NKG2D (MICA/B, ULBP chez l'Homme et Rae1, H60 chez la souris) sont exprimés de manière fréquente et importante par les cellules tumorales. Les souris déficientes en NKG2D développent plus de tumeurs spontanées dans un modèle transgénique d'adénocarcinome de prostate et dans un modèle de lymphome, montrant l'importance de ce récepteur dans l'immunosurveillance [Guerra *et al.*, 2008].

(3) Situation chez l'Homme

Plusieurs observations cliniques suggèrent l'existence de la phase d'élimination chez l'Homme. D'une part, la présence de lymphocytes T intratumoraux est associée à une augmentation de la survie des patients atteints de carcinomes ovariens [Zhang *et al.*, 2003] et de cancers colorectaux. L'absence de LT infiltrés dans les tumeurs colorectales est associée avec le développement de métastases [Pagès *et al.*, 2005], ces données suggèrent le rôle anti-tumoral des

LT. D'autre part, les patients sous traitement immunosuppresseur ont plus de risques de développer un cancer. De plus, les régressions spontanées de mélanomes s'accompagnent d'une expansion clonale des LT. Un autre exemple est le syndrome paranéoplasique auto-immun : la réaction auto-immune contre une protéine exprimée de façon normale par les neurones, reconnue comme un antigène tumoral, provoque des désordres neurologiques paranéoplasiques. Ces symptômes neurologiques apparaissent généralement avant la découverte de la présence d'une tumeur [Vesely *et al.*, 2011].

b) Equilibre

En absence d'une éradication complète, la tumeur entre dans un état de dormance, sous contrôle spécifique du système immunitaire : c'est la phase d'équilibre, pendant laquelle la présence de la tumeur reste asymptomatique.

(1) Principales caractéristiques

Une balance dynamique se met en place entre les cellules tumorales et le système immunitaire, ce qui permet de bloquer l'expansion tumorale. Contrairement à la phase d'élimination, seule l'immunité acquise intervient dans la phase d'équilibre [Koebel *et al.*, 2007].

La phase d'équilibre peut aboutir à l'élimination de la tumeur par le système immunitaire mais il peut également y avoir maintien de manière permanente de cet état d'équilibre. Cependant, la pression exercée par le système immunitaire sur les cellules tumorales permet également l'émergence de nouvelles populations tumorales qui ont accumulées des modifications génétiques, menant à une diminution de leur immunogénicité et donc à un échappement de la tumeur au système immunitaire [Shankaran *et al.*, 2001; Koebel *et al.*, 2007].

(2) Situation chez l'Homme

L'existence de la phase d'équilibre a été mise en évidence chez l'Homme, notamment dans des cas de transmission de tumeur par greffe d'organes. Il a été rapporté, par exemple, un cas de transmission de mélanome via une transplantation rénale. Deux reins, apparemment sains, du même donneur ont été transplantés à deux receveurs différents. Les receveurs ont développé des mélanomes métastatiques un à deux ans après la greffe et l'un des patients en est décédé. Il s'est avéré par la suite que le donneur avait subi une résection d'un mélanome malin 16 ans avant sa mort, puis n'avait développé aucun signe clinique de présence de tumeur [MacKie *et al.*, 2003]. Ces cas suggèrent que la transplantation d'une tumeur, à l'état de dormance, chez un receveur naïf et immunodéprimé permet une progression rapide de la tumeur, qui avait été jusqu'à lors maintenue à l'état d'équilibre par le système immunitaire du donneur. L'existence de la phase d'équilibre permet également d'expliquer la longue période de latence séparant l'état de rémission et la rechute.

c) Echappement

Lorsque le système immunitaire n'arrive plus à contenir la progression tumorale, la tumeur entre en phase d'échappement, se traduisant chez l'Homme par l'apparition de signes cliniques. Les

mécanismes d'échappement à l'immunité tumorale sont de plusieurs natures : diminution de la reconnaissance immunitaire, résistance des cellules tumorales aux effets cytotoxiques et mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur.

(1) Diminution de la reconnaissance immunitaire

Chaque étape menant à la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunitaires peut être altérée. Il peut y avoir une perte des antigènes tumoraux avec l'émergence de populations tumorales qui sont moins ou plus du tout détectées par les lymphocytes [Kurnick *et al.*, 2001]. Il peut également y avoir une diminution ou une perte des protéines de CMH de classe I qui présentent les antigènes aux lymphocytes T CD8. En effet, la perte de l'expression des protéines CMH-I est courant dans les cancers colorectaux humains [Cabrera *et al.*, 1998] et le taux faible de CMH-I est corrélé avec un mauvais pronostic [Watson *et al.*, 2006]. Il est à noter que pour certains cancers comme celui du sein, la perte d'expression du CMH-I est associée à un facteur de bon pronostic [Madjd *et al.*, 2005]. Les protéines impliquées dans l'apprêtement et la présentation de l'antigène (TAP1, LMP2, LMP7, β 2-microglobuline) sont également souvent déficientes dans les tumeurs humaines [Chen *et al.*, 1996; Singal *et al.*, 1996]. Cela est dû, soit à l'accumulation de mutations génétiques, soit à une répression transcriptionnelle de ces protéines [Chen *et al.*, 1996; Cabrera *et al.*, 2003]. Cette répression peut être causée par un fonctionnement anormal de la voie de l'IFN γ , qui ne permet plus l'inductibilité des gènes de ces protéines par l'IFN γ [Dovhey *et al.*, 2000].

La perte de reconnaissance peut également toucher le système immunitaire inné. L'expression de NKG2D est diminuée par les facteurs de croissance produits par les cellules cancéreuses, comme TGF β [Lee *et al.*, 2004]. Le TGF β est une cytokine anti-inflammatoire, exprimée par les cellules cancéreuses et certaines cellules immunitaires, qui possèdent des fonctions majoritairement pro-tumorales. Cependant, il est capable d'avoir un rôle suppresseur de tumeur dans les stades prémalins, en inhibant par exemple la croissance cellulaire [Flavell *et al.*, 2010]. De plus, l'IFN γ , malgré ses nombreux effets tumoraux, régule négativement l'expression de H60, ligand de NKG2D dans les tumeurs [Bui *et al.*, 2006]. Les cellules tumorales produisent également des ligands solubles aux NKG2D par clivage protéolytique, qui vont, par interaction avec les récepteurs NKG2D, induire une diminution de la présence de ses récepteurs à la membrane et de l'activation de cellules T [Groh *et al.*, 2002].

(2) Augmentation de la résistance aux effets cytotoxiques de l'immunité

Les cellules immunitaires peuvent également échapper à la lyse cellulaire induite par le système immunitaire. Les cellules tumorales expriment des molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 et le taux élevé de cette protéine est associé à une faible réponse clinique dans les leucémies myéloïdes aiguës [Campos *et al.*, 1993]. Les cellules tumorales expriment également des formes mutées de récepteurs de mort, comme le récepteur de TRAIL et les mutations de *TRAIL-R1* et *TRAIL-R2* sont plus fréquentes dans les cancers du sein métastatiques par rapport aux tumeurs non-métastatiques [Shin *et al.*, 2001].

(3) Mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur

Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires permettent la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur. Les cellules tumorales sécrètent des molécules immunosuppressives et recrutent des cellules immunitaires pro-tumorales.

➤ Production de molécules immunosuppressives

Les cellules tumorales sécrètent des molécules qui participent à la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur. Les tumeurs produisent souvent de fortes quantités de VEGF qui joue un rôle important dans l'angiogenèse tumorale. Cependant, ce facteur régule également la réponse immunitaire, en inhibant la maturation des cellules dendritiques [Gabrilovich *et al.*, 1996], l'activation des LT [Ohm *et al.*, 2003] et en diminuant l'adhérence, donc l'infiltration, des leucocytes au niveau de l'endothélium [Melder *et al.*, 1996].

Les cellules tumorales et certaines cellules immunitaires intra-tumorales produisent des cytokines aux propriétés immunosuppressives : le TGF β et l'IL-10, qui sont des molécules qui stimulent la production l'une de l'autre. Le TGF β inhibe la prolifération et le fonctionnement des cellules immunitaires anti-tumorales, telles que les cellules dendritiques [Weber *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2006], les LTc [Thomas et Massagué, 2005] et les NK [Lee *et al.*, 2004]. Il favorise la réponse de type Th2 [Maeda et Shiraishi, 1996] et augmente le nombre des LTreg [Wrzesinski *et al.*, 2007]. L'IL-10 supprime la fonction des cellules dendritiques et oriente la réponse des lymphocytes T vers une réponse Th2. Néanmoins, certaines études montrent que l'IL-10 peut également être impliquée dans la destruction des cellules tumorales, via des effets sur les cellules immunitaires ou via des mécanismes non immunologiques (inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale) [Mocellin *et al.*, 2005].

Parmi les molécules immunosuppressives, l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) est une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane, exprimée par certaines cellules immunitaires, mais également de manière ectopique par les cellules tumorales. Cette enzyme inhibe la prolifération des lymphocytes T intratumoraux [Uyttenhove *et al.*, 2003], induit également l'apoptose des LT [Lee *et al.*, 2002] et participe à l'expansion des LTreg en induisant la conversion des LT CD4 en LTreg [Curti *et al.*, 2007].

La galectine 1 (Gal-1) est une protéine qui se fixe au β -galactoside et qui possède des fonctions régulatrices de la réponse immunitaire. Elle est exprimée par plusieurs types cellulaires dont les cellules tumorales et stromales tumorales [Camby *et al.*, 2006]. Expérimentalement, l'inhibition de l'expression de Gal-1 dans des cellules cancéreuses de mélanome favorise le rejet des cellules tumorales implantées chez la souris [Rubinstein *et al.*, 2004]. Cette protéine provoque l'apoptose des cellules T [Kovács-Sólyom *et al.*, 2010] et induit une réponse de type Th2 en stimulant la production de TGF β et d'IL-10 [Toscano *et al.*, 2006]. Elle inhibe également l'infiltration leucocytaire, en modulant l'expression des molécules d'adhérence et le taux de cytokines [Cooper *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2010].

Le microenvironnement tumoral contient également d'autres protéines produites par les cellules tumorales ou par certaines cellules immunitaires capables d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale, telles que IL-6, M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), NO, la prostaglandine E2 (PGE2) produite par la cyclo-oxygénase 2 (COX2) et les gangliosides [Zitvogel *et al.*, 2006].

➤ **Recrutement de cellules immunosuppressives**

Plusieurs populations de cellules immunitaires ayant des propriétés immunosuppressives sont recrutées au niveau de la tumeur, dont les lymphocytes T régulateurs, les cellules myéloïdes suppressives MDSC et les macrophages associés à la tumeur TAM.

Chez l'Homme, la présence de LTreg dans les carcinomes ovariens est associée à une survie réduite et l'augmentation de LTreg est accompagnée d'une diminution des LT effecteurs [Curiel *et al.*, 2004]. Les LTreg réduisent la réponse immunitaire en inhibant la fonction des LTc par production d'IL-10 et de TGF β . Cette inhibition peut également être due aux protéines CTLA4 (*Cytotoxic-Lymphocyte-Associated protein 4*) et PD-1 (*Programmed Death receptor 1*). CTLA4, exprimée par les LT activés dont les LTreg, induit l'arrêt du cycle cellulaire, diminue la production de cytokines et la réponse des cellules T [Greenwald *et al.*, 2001]. Les LTreg expriment également le récepteur PD-1. Son interaction avec son ligand PD-L1 (*Programmed Death Receptor Ligand 1*, aussi appelé B7-H1), exprimé de façon ectopique par les cellules tumorales, a pour conséquences une inhibition de la prolifération des LT et une diminution de la production de cytokines [Blank *et al.*, 2005]. L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales est associée à un phénotype agressif [Thompson *et al.*, 2004].

Le nombre de MDSC retrouvées dans le sang est augmenté chez les patients atteints de différents types de cancers [Almand *et al.*, 2001]. Les MDSC représentent un groupe hétérogène de cellules d'origine myéloïde, caractérisées chez la souris par la co-expression de l'antigène de différenciation de la lignée myélocytaire Gr1 et du marqueur CD11b. L'expansion et l'activation des MDSC sont stimulées par de nombreux facteurs, tels que le VEGF, l'IFN γ , le TGF β , l'IL-10 ou MMP9 [Gabrilovich et Nagaraj, 2009]. Les MDSC inhibent les fonctions des cellules T par de nombreuses manières. La L-arginine nécessaire à la prolifération des LT est diminuée par l'arginase-1 des MDSC qui catabolise cet acide aminé non essentiel. Les MDSC produisent également du NO via la NOSi (*Nitric Oxide Synthase inducible*) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui inhibent la fonction des LT. Les MDSC induisent également le développement des LTreg [Huang *et al.*, 2006].

La troisième population de cellules immunosuppressives est un type de macrophages associés aux tumeurs. L'accumulation de TAM dans les tumeurs est la plupart du temps associée à une survie réduite [Chen *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2008]. Il existe deux types de macrophages. Les macrophages de type M1 (aussi appelés « classiquement activés ») sécrètent des molécules pro-inflammatoires, lysent les cellules tumorales et sont caractéristiques d'une réponse de type Th1 : ils sont impliqués dans la réponse anti-tumorale. Tandis que les TAM sont majoritairement des macrophages de type M2 (« alternativement activés »), caractéristiques d'une réponse Th2. Ils

stimulent l'angiogenèse, la prolifération des cellules tumorales et la formation de métastases. Ils modulent également l'immunité anti-tumorale, produisant des molécules immunosuppressives, comme l'IL-10 et le TGF β [Qian et Pollard, 2010].

C. Rôle de l'endothélium dans la réponse immunitaire anti-tumorale

L'endothélium joue un rôle important dans la réponse immunitaire anti-tumorale car il permet l'extravasation des cellules immunitaires présentes dans la circulation sanguine dans le tissu tumoral. Tout d'abord, je vais décrire les différentes étapes de l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium et les principales molécules d'adhérence impliquées. Puis dans une seconde partie, je présenterai la régulation de l'adhérence leucocytaire par les cellules tumorales d'une part, et par les cellules endothéliales d'autre part.

La réaction inflammatoire permet l'accumulation des cellules immunitaires au niveau du tissu lésé. Elle est composée de trois phases : l'augmentation du flux sanguin, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'adhérence des leucocytes. Cette dernière étape nécessite l'activation de l'endothélium quiescent par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α . Cette stimulation induit l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. Ces dernières vont interagir avec celles présentes sur les cellules immunitaires, permettant ainsi l'adhérence leucocytaire, puis la transmigration endothéliale.

1. Interactions leucocytes-cellules endothéliales

Les différentes étapes de l'adhérence des leucocytes sur la paroi vasculaire pendant l'inflammation sont représentées en **Figure 12**.

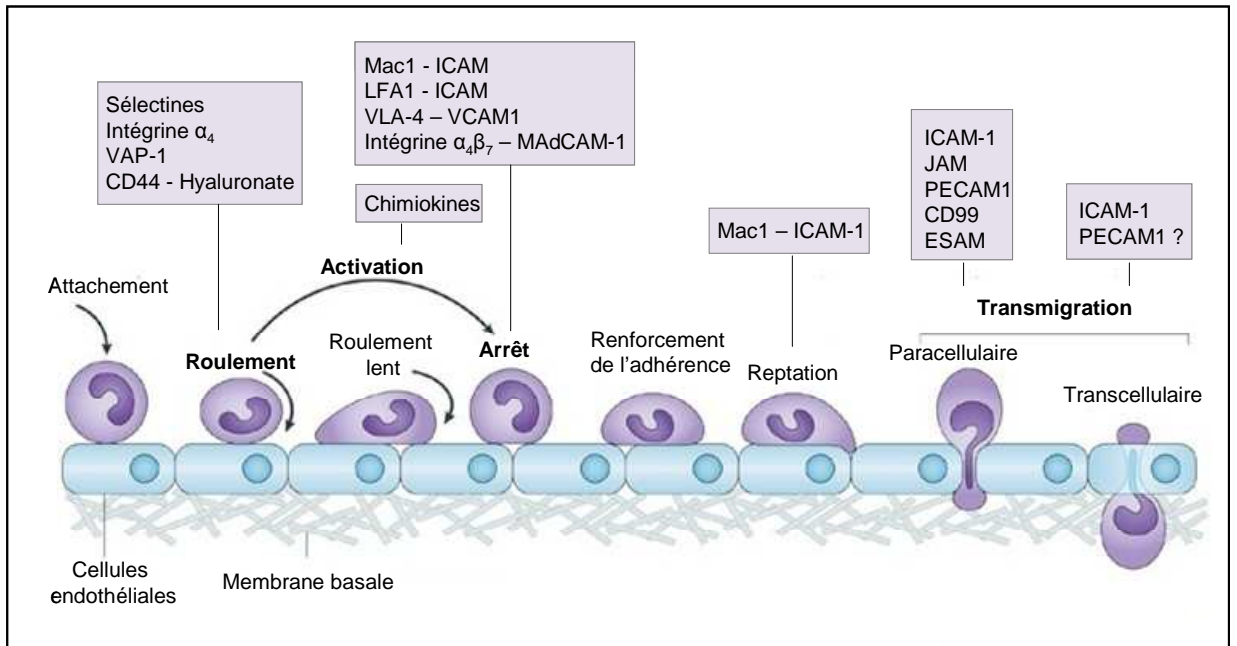


Figure 12 : Différentes étapes de l'adhérence des leucocytes et les principales molécules d'adhérence impliquées.

Pour la signification des abréviations, se référer aux pages 23 à 26. D'après [Ley *et al.*, 2007].

a) Roulement des leucocytes

L'étape préliminaire est le rapprochement des leucocytes de la surface de l'endothélium par le flux sanguin, ce phénomène passif est la margination. Puis le premier contact du leucocyte avec l'endothélium activé s'établit, cette étape est appelée l'attachement ou la capture. Elle est suivie du roulement (*rolling*) des leucocytes sur l'endothélium, qui nécessite des interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales [Langer et Chavakis, 2009] (**Tableau 1**).

Les principales protéines impliquées dans cette étape sont les sélectines, qui interagissent avec des ligands glycosylés. Il existe 3 types de sélectines : la L- (pour leucocyte, aussi appelée CD62L), la E- (pour endothéliale, CD62E) et la P- (pour plaquette, CD62P) sélectine. La L-sélectine est exprimée par la majorité des leucocytes [Gallatin *et al.*, 1983; Lewinsohn *et al.*, 1987], alors que la E-sélectine est exprimée par les cellules endothéliales activées [Bevilacqua *et al.*, 1989]. La P-sélectine, quant à elle, est exprimée par les plaquettes et les cellules endothéliales non activées et elle est stockée, respectivement, dans les granules α et les corps de Weibel Palade, qui sont des granules de stockage. Après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, la P-sélectine est redistribuée à la membrane plasmique [McEver *et al.*, 1989].

Les sélectines E et P interagissent majoritairement avec le ligand PSGL1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*) exprimé par les leucocytes [Sako *et al.*, 1993], elles se lient également à la L-sélectine [Picker *et al.*, 1991]. La L-sélectine a pour ligands des protéines endothéliales, dénommées adressines vasculaires, comme PNA_d (*Peripheral Node Adresin*) [Streeter *et al.*, 1988], CD34 [Baumheter *et al.*, 1993], GlyCAM (*Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule 1*) [Brustein *et al.*, 1992] et l'adressine de muqueuse MAdCAM-1 (*Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1*) [Berg *et al.*, 1993].

Molécule endothéliale	Ligand leucocytaire
E-sélectine (CD62E)	PSGL1 L-sélectine (CD62L)
P-sélectine P (CD62P)	PGSL1 L-sélectine
PNA _d	L-sélectine
CD34	L-sélectine
GlyCAM	L-sélectine
MAdCAM	L-sélectine Intégrine $\alpha_4\beta_7$
VCAM-1	VLA-4 (intégrine $\alpha_4\beta_1$)
VAP-1	?
Hyaluronate	CD44

Tableau 1 : Interactions entre les molécules d'adhérence endothéliales et leurs ligands leucocytaires intervenant dans le roulement des leucocytes.

Les interactions entre les molécules endothéliales et leurs ligands leucocytaires sont de faible affinité et transitoires. Les leucocytes se déplacent par rotation sur l'endothélium sous l'effet des forces de cisaillement dues au flux sanguin. Ces forces sont nécessaires à l'adhérence des leucocytes car les sélectines ont pour caractéristique de créer des liaisons accrocheuses (*catch bonds*), liaisons qui se renforcent lorsqu'elles sont soumises à des contraintes mécaniques [Marshall *et al.*, 2003].

Les intégrines sont également impliquées dans le roulement des leucocytes. L'intégrine $\alpha_4\beta_1$, également nommée VLA-4 (aussi appelée CD49d/CD29) interagit avec VCAM1 (*Vascular Cell-Adhesion Molecule 1*) [Alon *et al.*, 1995] et l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ avec MAdCAM-1 [Berlin *et al.*, 1993].

La protéine endothéliale VAP-1 (*Vascular Adhesion Protein 1*) intervient également dans le roulement des leucocytes [Salmi *et al.*, 2001], ainsi que l'acide hyaluronique (hyaluronate) qui interagit avec CD44 présent à la surface des leucocytes [Griffioen *et al.*, 1997].

b) Activation et adhérence ferme

L'arrêt des leucocytes nécessite le passage d'interactions de faible affinité à des fixations de forte affinité. Les molécules importantes pour cette étape sont les chimiokines, les intégrines et les membres de la superfamille des immunoglobulines ICAM (*InterCellular Adhesion Molecule*) et VCAM-1. Les molécules ICAM-1 et -2 présentes à la surface des cellules endothéliales interagissent avec les intégrines leucocytaires $\alpha_M\beta_2$ (aussi appelée Mac-1 ou CD11b/CD18) [Diamond *et al.*, 1990] et $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1, *Leucocyte Function associated Antigen-1* ou CD11a/CD18) [Marlin et Springer, 1987; Staunton *et al.*, 1989]. VCAM-1 se lie à VLA-4 et MAdCAM1 à l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ [Alon *et al.*, 1995; Berlin *et al.*, 1993] (**Tableau 2**).

Molécule endothéliale	Ligand leucocytaire
ICAM-1	Mac-1 (intégrine $\alpha M\beta 2$, CD11b/CD18) LFA-1 (intégrine $\alpha L\beta 2$, CD11a/CD18)
ICAM-2	Mac-1 LFA-1
VCAM-1	VLA-4
MAdCAM	Intégrine $\alpha 4\beta 7$

Tableau 2 : Interactions entre les molécules d'adhérence endothéliales et leurs ligands leucocytaires impliqués dans l'activation et l'adhérence ferme.

Les chimiokines sont nécessaires à l'activation des leucocytes. Ce sont de petites protéines (8-10 kDa) appartenant à la famille des cytokines, sécrétées par le tissu enflammé. Elles sont présentes à la surface des cellules endothéliales associées à des glycosaminoglycanes [Handel *et al.*, 2005]. La liaison avec leurs récepteurs leucocytaires couplés aux protéines G déclenche l'activation des intégrines à la surface des cellules immunitaires. Il s'agit d'une « signalisation de l'intérieur vers l'extérieur » (*inside-out signaling*) car ce sont des signaux intracellulaires qui changent les propriétés de liaisons des intégrines en augmentant leur affinité et leur avidité. Cette activation se traduit par une augmentation des forces de liaisons entre les leucocytes et l'endothélium. Cela est dû, d'une part, à un changement conformationnel des intégrines qui permet de passer d'un état de faible affinité à un état de forte affinité. La liaison de l'intégrine avec son ligand est également impliquée dans ce changement de conformation. D'autre part, l'activation par les chimiokines permet également une mobilité latérale des intégrines qui sont redistribuées à la surface des cellules et regroupées (*clustering*) ce qui permet d'augmenter la capacité des intégrines activées à interagir avec leurs ligands [Laudanna et Bolomini-Vittori, 2009]. L'augmentation du nombre de liaisons entre les cellules immunitaires et les cellules endothéliales et de leur force permet un arrêt du leucocyte sur l'endothélium.

c) Transmigration endothéliale

Une fois arrêtés, les leucocytes franchissent la paroi endothéliale pour entrer dans les tissus (diapédèse) en passant soit entre les cellules endothéliales (voie paracellulaire), soit au travers de la cellule endothéliale (voie transcellulaire). Ils franchissent ensuite la membrane basale et la couche de péricytes.

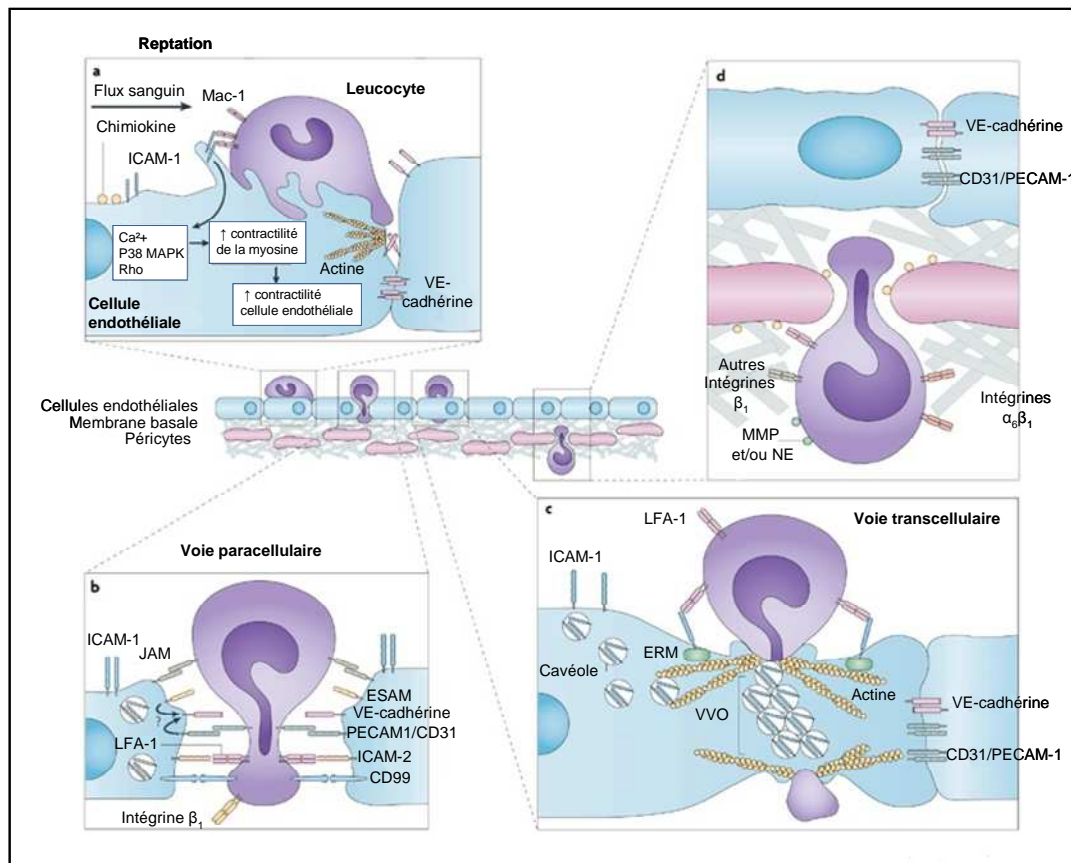


Figure 13 : Transmigration leucocytaire.

a. Reptation du leucocyte adhérent sur l'endothélium jusqu'à un site d'émigration optimal. **b., c., d.** Diapédèse par voie paracellulaire (**b.**) ou transcellulaire (**c.**) puis passage de la membrane basale et de la couche de péricytes (**d.**). Pour la signification des abréviations, se référer aux pages 23 à 26. D'après [Ley *et al.*, 2007].

La première étape est une étape de « reptation » (*crawling*), faisant intervenir essentiellement l'interaction entre ICAM-1 et Mac-1. Les leucocytes rampent sur l'endothélium jusqu'à un site d'émigration optimal, favorisant ainsi une migration paracellulaire (**Figure 13a.**) [Schenkel *et al.*, 2004; Phillipson *et al.*, 2006].

Le réarrangement du cytosquelette est indispensable à la migration des leucocytes. Comme les intégrines lors de leur activation par les chimiokines, ICAM-1 et VCAM-1 sont redistribuées à la surface des cellules endothéliales et organisées en groupements [Barreiro *et al.*, 2002; Carman et Springer, 2004]. Cela active des voies de signalisation intracellulaire des GTPases : activation de kinases (Rho, Rac-1, Src) et augmentation de la concentration endothéliale d'ions calcium intracellulaire. Ces événements induisent un réarrangement de l'actine, la contraction des fibres d'actine-myosine, et donc la contraction des cellules endothéliales [Etienne-Manneville *et al.*, 2000; van Wetering *et al.*, 2003]. Certaines équipes ont montré que les molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 interagissent avec les composants du cytosquelette pour former des structures d'ancrage (*docking structures* ou *transmigratory cups*) à la surface apicale des cellules endothéliales activées. Ces structures sont des projections de la membrane des cellules endothéliales, de type filopodes et microvillosités, riches en ICAM-1, en VCAM-1 et en actine. ICAM-1 et VCAM-1, regroupées en

clusters, interagissent avec des protéines qui interviennent dans la liaison des filaments d'actine à la membrane plasmique, telles que la moésine et ezrine (membres des protéines de la famille ERM pour Ezrine, Radixine, Moésine), l'actinine α ou les protéines d'adhérence focale (vinculine, taline, paxilline). Ces protéines de liaison à l'actine participent au réarrangement du cytosquelette d'actine pour créer la structure d'ancrage [Barreiro *et al.*, 2002]. Ces structures d'ancrage sont retrouvées aussi bien dans la migration paracellulaire que transcellulaire [Carman et Springer, 2004]. Cependant, l'existence de ces structures *in vivo* reste à démontrer.

➤ **Voie paracellulaire**

Les leucocytes traversent l'endothélium majoritairement par la voie paracellulaire, c'est-à-dire en passant entre les jonctions cellulaires (**Figure 13b.**). La VE-cadhérine, composant majeur des jonctions adhérentes des cellules endothéliales, est délocalisée de façon transitoire et réversible, permettant ainsi la formation d'un trou dans lequel le leucocyte peut s'engager [Shaw *et al.*, 2001]. Puis, les interactions des molécules jonctionnelles avec leurs ligands leucocytaires permettent au leucocyte de migrer entre les jonctions cellulaires. Les protéines des jonctions serrées JAM (*Junctional Adhesion Molecule*) -A, -B et -C interagissent respectivement avec les intégrines LFA-1, VLA-4 et Mac-1. JAM-A et JAM-C forment également des homodimères avec les protéines présentes à la surface des leucocytes, tout comme CD31/PECAM-1 (*Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) et CD99, qui sont à la fois exprimées par les cellules endothéliales et les leucocytes [Ley *et al.*, 2007]. La protéine ESAM (*Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule*), localisée au niveau des jonctions endothéliales, est également impliquée dans la transmigration, ou tout au moins, dans celle des neutrophiles [Wegmann *et al.*, 2006] (**Tableau 3**).

Molécule jonctionnelle endothéliale	Ligand leucocytaire
ICAM-2	Mac-1 LFA-1
JAM-A	LFA-1 JAM-A
JAM-B	VLA-1
JAM-C	Mac-1 JAM-C
CD31/PECAM-1	CD31/PECAM-1
CD99	CD99
ESAM	?
VE-cadhérine	Pas d'interaction avec le leucocyte

Tableau 3 : Interactions des molécules jonctionnelles endothéliales avec leurs ligands leucocytaires intervenant dans la diapédèse paracellulaire.

Récemment, un nouvel organite a été décrit comme étant impliqué dans la migration paracellulaire : le LBRC pour *Lateral Border Recycling Compartment*. C'est un réticulum de structures

ressemblant à des vésicules interconnectées présentes au bord des cellules endothéliales et reliées à la membrane plasmique. Il permet un recyclage continu de la membrane plasmique et la molécule CD31/PECAM-1 est retrouvée dans ces structures (**Figure 14**) [Mamdouh *et al.*, 2003]. Le rôle de ce recyclage n'est pas encore connu, néanmoins il est nécessaire à la transmigration endothéliale et fait intervenir les kinésines, qui sont des moteurs moléculaires et les microtubules de la cellule endothéliale [Mamdouh *et al.*, 2008].

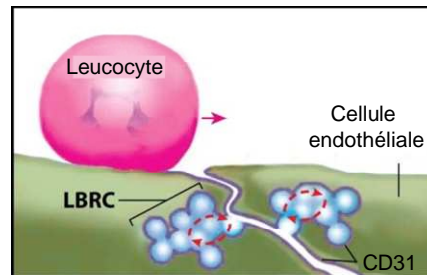


Figure 14 : Représentation schématique des LBRC.
D'après [Muller, 2011].

➤ Voie transcellulaire

De manière plus rare, il a été montré que les leucocytes peuvent migrer à travers les cellules endothéliales (**Figure 13c.**). Tout comme la migration paracellulaire, la migration transcellulaire implique la formation de structures d'ancrage riches en ICAM-1 et en VCAM-1 [Carman et Springer, 2004]. Cependant un autre processus, spécifique de la voie transcellulaire, a été observé *in vitro*. L'adhérence de lymphocytes à la surface de cellules endothéliales induit le recrutement de la protéine ICAM-1 dans des régions riches en actine-F et en cavéoline-1. ICAM-1 est alors internalisée et transloquée du pôle apical de la membrane plasmique vers le pôle basal de la cellule endothéliale. Ce transport s'effectue via des cavéoles (*caveolae*). Ce sont des vésicules d'endocytose impliquées dans le transport de petites molécules ou de virus, formées à partir de microdomaines membranaires riches en cholestérol et en glycolipides et dont la cavéoline est la protéine majeure. Ces structures permettent la formation d'un pore transcellulaire dans lequel le leucocyte peut s'engager. Les cavéosomes, observés dans les cellules endothéliales et issus de la fusion de plusieurs cavéoles transportant ICAM-1, ressemblent à des organites vésiculo-vacuolaires (VVO, *Vesiculo-Vacuolar Organelle*) [Millán *et al.*, 2006].

Les VVO sont constitués de regroupement en grappe de vésicules et de vacuoles interconnectées et permettent l'extravasation de macromolécules des vaisseaux sanguins, et en particulier des vaisseaux tumoraux [Dvorak *et al.*, 1996]. Ils sont fréquemment observés dans les cellules endothéliales lors de la transmigration de neutrophiles [Dvorak et Feng, 2001]. La formation d'un pore transendothélial lors de la transmigration des neutrophiles observée *in vivo* pourrait être due à des structures similaires aux VVO [Feng *et al.*, 1998]. Tout comme les cavéoles, les VVO sont composés de cavéoline et ont pour fonction le transport de molécules. Ils permettent également la formation d'un canal transcellulaire permettant la diapédèse du leucocyte. Il est possible que les VVO soient issus de la fusion de cavéoles, cependant le lien entre les VVO et les cavéoles n'est pas encore démontré [Dvorak et Feng, 2001].

L'implication des LBRC dans la migration transcellulaire a également été décrite. Les molécules CD31/PECAM-1, CD99 et JAM-A ont été retrouvées dans ces organites, ce qui n'est pas le cas de la VE-cadhérine [Mamdouh *et al.*, 2009]. Les auteurs suggèrent que la migration para- et trans-cellulaire font intervenir des mécanismes similaires et si c'est le cas, la distinction entre les deux types de diapédèse n'a pas lieu d'être. Cependant l'existence des LBRC n'a pour le moment pas été décrite par d'autres équipes de recherche.

➤ **Passage de la membrane basale et des péricytes**

Suite à la transmigration endothéliale, le leucocyte doit passer à travers la membrane basale et la couche de péricytes (**Figure 13d.**). Ce passage se ferait préférentiellement dans des zones où l'expression des composants de la membrane basale (collagène IV, laminine 10, nidogène-2) est réduite par rapport à l'expression moyenne retrouvée tout au long du vaisseau. Ces zones sont toujours associées à un trou entre deux péricytes et sont en général localisées à côté des jonctions cellulaires endothéliales. Il y a également un remodelage de la membrane basale par des protéases, telles que l'élastase neutrophile NE (*Neutrophil Elastase*) qui dégrade les constituants de la membrane basale [Wang *et al.*, 2006].

2. Régulation de l'adhérence des leucocytes

La modulation de l'adhérence des cellules immunitaires par les cellules tumorales et endothéliales participe au phénomène d'échappement de la tumeur au système immunitaire.

a) Expression des molécules d'adhérence dans les vaisseaux tumoraux

Les interactions entre l'endothélium et les leucocytes sont inhibées dans les vaisseaux tumoraux. L'un des mécanismes impliqués est la diminution du nombre des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales.

Par exemple, l'expression des ICAM -1 et -2 est diminuée dans les cellules endothéliales issues de carcinomes rénaux humains par rapport à celles issues de tissus normaux [Griffioen *et al.*, 1996], c'est également le cas de la molécule CD34 [Hellwig *et al.*, 1997]. Dans un modèle de tumorigenèse chez la souris, l'inhibition des interactions des leucocytes avec l'endothélium est associée à une diminution de l'expression des molécules d'adhérence endothéliales telles qu'ICAM-1. Il est à noter que l'expression des molécules d'adhérence à la surface des leucocytes ne semble pas varier [Dirkx *et al.*, 2003].

Les types de populations immunitaires recrutées au sein de la tumeur dépendent des chimiokines et des molécules d'adhérence présentes à la surface des vaisseaux sanguins. La régulation de ces molécules peut donc induire une diminution de la migration des cellules immunitaires anti-tumorales, une augmentation des cellules immunitaires pro-tumorales ou encore une augmentation des cellules immunitaires qui ont un effet anti-tumoral moins efficace. Par exemple, dans des adénocarcinomes gastriques, la diminution de l'expression de MAdCAM-1 et l'augmentation de celle de PNA_d cause une modification des lymphocytes T recrutés. Le ratio LT CD4 et CD8 ne

change pas mais il y a plus de LT CD4 naïfs dans la tumeur, il y a donc recrutement de lymphocytes T moins efficaces [Enarsson *et al.*, 2006].

b) Régulation de l'adhérence par les facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les cellules tumorales

Les facteurs angiogéniques modulent l'expression des molécules d'adhérence. Le traitement de cellules endothéliales *in vitro* avec du VEGF ou du FGFb pendant 24 heures augmente l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine à la surface cellulaire [Melder *et al.*, 1996]. Cependant, à partir de 48 heures de traitement, l'expression basale de ces molécules d'adhérence et celle induite par une stimulation au TNF- α sont diminuées [Griffioen *et al.*, 1996; Melder *et al.*, 1996]. *In vivo*, le traitement avec du FGFb induit une diminution de l'adhérence des cellules NK aux vaisseaux tumoraux [Melder *et al.*, 1996].

Plus récemment, un autre mécanisme à l'origine de la diminution de l'adhérence des leucocytes induite par le VEGF a été décrit. Dans cette étude, il n'y a pas de réduction de l'expression de molécules d'adhérence mais un problème de distribution d'ICAM-1, et de façon moins importante de VCAM-1, à la surface cellulaire. Après stimulation au TNF- α , ces molécules se déplacent et s'organisent en groupements, or après traitement des cellules endothéliales au VEGF, ces groupements sont de taille moins importante. Le VEGF induit la production de NO, qui empêche la réorganisation d'ICAM-1 et qui inhibe l'infiltration leucocytaire. La cavéoline-1, protéine composant les cavéoles, agit comme un compétiteur de la NO synthase endothéliale. Sa surexpression dans des cellules endothéliales permet de rétablir le regroupement des molécules ICAM-1 et donc d'augmenter l'adhérence des cellules immunitaires. Or l'expression de la cavéoline-1 est diminuée dans certains cas pathologiques, comme dans les vaisseaux tumoraux. La production de NO n'est donc plus inhibée [Bouzin *et al.*, 2007].

Ces résultats suggèrent que la stimulation chronique de l'endothélium par les facteurs angiogéniques VEGF et FGFb présents dans le microenvironnement tumoral inhibe l'adhérence des leucocytes.

c) Régulateurs endothéliaux de l'adhérence leucocytaire

Les cellules endothéliales interviennent également dans la régulation de l'inflammation. Elles synthétisent des médiateurs chimiques qui modulent l'adhérence des cellules immunitaires. Certaines protéines impliquées dans le processus d'angiogenèse participent également à cette régulation.

(1) Médiateurs de l'inflammation d'origine endothéliale

Il existe de nombreux médiateurs de l'inflammation, dont certains sont produits par les cellules endothéliales. Par exemple, lorsqu'elles sont activées, elles produisent des cytokines telles que l'IL-1 et l'IL-6 [Libby *et al.*, 1986; Sironi *et al.*, 1989].

Les cellules endothéliales produisent également d'autres médiateurs, stimulateurs ou inhibiteurs de l'inflammation. Ils régulent les trois phases de la réaction inflammatoire : l'augmentation du flux sanguin, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'adhérence des leucocytes.

Les médiateurs vasoconstricteurs, le facteur PAF (*Platelet-Activating Factor*) et l'endothéline 1, augmentent le flux sanguin en diminuant le diamètre des vaisseaux sanguins. Ils participent ainsi à la mise en place de la réponse immunitaire. Au contraire, des molécules telles que le NO et la prostacycline PGI₂ ont un effet vasodilatateur. La deuxième étape de la réaction inflammatoire est l'augmentation de la perméabilité vasculaire, qui est régulé entre autres par le NO et la prostacycline PGI₂. De plus, certains, comme le NO et PAF, modulent l'expression ou l'activation des molécules d'adhérence et leurs effets seront détaillés ci-dessous.

➤ **Activateurs : exemple du facteur d'activation plaquettaire**

L'un des médiateurs chimiques qui stimule l'adhérence des cellules immunitaires est le facteur d'activation plaquettaire PAF. Ce glycérophospholipide est synthétisé par les cellules endothéliales activées par un stimulus comme l'histamine ou la thrombine. Localisé à la surface des cellules endothéliales, l'interaction du PAF avec son récepteur présent chez des granulocytes active les intégrines β2 leucocytaires et stimule l'adhérence sur l'endothélium [Zimmerman *et al.*, 1990; Lorant *et al.*, 1991].

➤ **Inhibiteurs : exemple du monoxyde d'azote**

Le NO est un vasodilatateur produit par une enzyme dépendante du calcium, la NO synthétase (NOS). NO est synthétisé constitutivement par la NOS endothéliale (NOS_e) et par la NOS neurale (NOS_n). Il est également produit dans des conditions pathologiques par la NOS inducible (NOS_i), comme par les macrophages intratumoraux de type M2 par exemple [Munder *et al.*, 1998]. Les NOS sont, avec l'arginase, responsables du catabolisme de l'arginine.

Les inhibiteurs de NOS augmentent l'adhérence des leucocytes *in vivo* [Kubes *et al.*, 1991]. Le mécanisme d'action du NO n'est pas encore connu, cependant plusieurs études ont montré son implication dans la régulation de l'expression des molécules d'adhérence. Chez des souris NOS_e^{-/-}, la P-sélectine est augmentée au niveau des vaisseaux mésentériques par rapport aux souris contrôle [Lefer *et al.*, 1999]. Le blocage de l'activité de NOS *in vivo* diminue les taux d'ARN messager et de protéines de la L-sélectine. La protéine CD31/PECAM-1 est également diminuée au niveau leucocytaire et endothélial sans modifier son taux d'ARN messager [Hebeda *et al.*, 2008]. Dernièrement, l'inhibition de la réorganisation d'ICAM-1 à la surface de la cellule endothéliale par le NO a été décrite [Bouzin *et al.*, 2007].

(2) Régulation par des protéines endothéliales angiogéniques

De nombreuses protéines exprimées par les cellules endothéliales sont impliquées dans l'adhérence des leucocytes, comme les intégrines, les molécules d'adhérence ou encore les chimiokines. Cependant, à ma connaissance, seulement deux inhibiteurs endothéliaux endogènes ont été décrits dans la littérature : Del-1 et Gal-1. Ces deux protéines régulent également l'angiogenèse. Nogo-B, quant à elle, est également impliquée dans la modulation de l'angiogenèse et augmente l'infiltration leucocytaire.

➤ **Stimulation de l'adhérence des leucocytes par Nogo-B**

Nogo-B, également appelée Rtn-4B, est une protéine qui appartient à la famille des réticulons (Rtn). Elle est fortement exprimée par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires [Acevedo *et al.*, 2004]. Son expression par des lignées tumorales humaines a également été rapportée [Li *et al.*, 2001; Oertle *et al.*, 2003]. Dans les cellules endothéliales et périvasculaires, Nogo-B est localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Elle est également retrouvée, mais de façon minoritaire, au niveau de la membrane plasmique dans des régions riches en cavéoline et/ou dans des radeaux lipidiques (*lipid rafts*). Son domaine N-terminal, exposé à la surface cellulaire, stimule la migration des cellules endothéliales, alors qu'il inhibe la migration des cellules musculaires lisses induite par le PDGF-BB *in vitro*. Nogo-B est fortement exprimée dans les vaisseaux sanguins *in vivo* et joue un rôle important dans l'angiogenèse [Acevedo *et al.*, 2004]. Son expression est augmentée en cas d'ischémie. Nogo-B est impliquée dans le remodelage vasculaire qui suit une blessure au niveau de l'artère fémorale ou une ischémie du membre inférieur chez la souris [Acevedo *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2009]. De plus, Nogo-B et son récepteur NgBR sont également nécessaires à la formation des vaisseaux intersomitiques sur le poisson zèbre (*Danio rerio*) [Zhao *et al.*, 2010].

Le premier lien entre Nogo-B et l'inflammation a récemment été décrit dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris. La réponse angiogénique est réduite chez les souris *Nogo*^{-/-} et elle est associée à la diminution du recrutement de monocytes/macrophages après blessure, recrutement qui est nécessaire à l'artériogenèse secondaire. Nogo-B est fortement exprimée par les monocytes/macrophages et la diminution de leur recrutement s'explique par l'altération de leurs fonctions. En effet, les monocytes/macrophages dérivés de la moelle osseuse des souris *Nogo*^{-/-} ont une activation de la protéine Rac réduite, ce qui diminue la réorganisation de l'actine F et donc la migration. De plus, ces monocytes expriment moins de chimiokines et cytokines que les monocytes issus de souris sauvages [Yu *et al.*, 2009].

Une autre étude a montré que le nombre de neutrophiles infiltrés dans un modèle d'inflammation aiguë est diminué chez les souris transgéniques *NogoA/B*^{-/-} par rapport aux souris sauvages. De plus, dans un modèle d'inflammation subchronique, l'œdème développé est moins important et il est associé à une diminution des monocytes/macrophages infiltrés. Les neutrophiles expriment Nogo-B, cependant, contrairement à l'étude précédente, les auteurs ont montré que le rôle de Nogo-B dans l'inflammation est porté par la protéine exprimée par les cellules vasculaires. Nogo-B est impliquée dans l'étape de transmigration endothéliale *in vitro* en régulant la signalisation déclenchée par ICAM-1. En effet, il y a une diminution de la phosphorylation de la VE-cadhérine induite par ICAM-1 dans les cellules pour lesquelles Nogo-B a été inhibé par interférence de l'ARN, et donc une inhibition de la diapédèse [Di Lorenzo *et al.*, 2011].

➤ **Inhibition de l'adhérence des leucocytes par la galectine 1**

Comme précédemment décrit, Gal-1 est une protéine exprimée par les cellules tumorales mais également par les cellules endothéliales. Elle inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment en inhibant l'infiltration leucocytaire.

Gal-1 est fortement exprimée par les cellules endothéliales non quiescentes. En effet, l'expression de la Gal-1 est augmentée chez l'Homme dans les cellules endothéliales des ganglions lymphatiques activés par rapport aux autres ganglions [Baum *et al.*, 1995]. De plus, lorsque les cellules endothéliales sont incubées *in vitro* avec du milieu conditionné de cellules tumorales, l'expression de Gal-1 à la surface des cellules endothéliales, ainsi que son dépôt dans la matrice extracellulaire, sont augmentés [He et Baum, 2006]. Chez l'Homme, la protéine Gal-1 est retrouvée à des taux élevés au niveau des cellules endothéliales de sarcomes d'Ewing et de carcinomes du colon et du sein par rapport aux tissus normaux [Thijssen *et al.*, 2006]. Gal-1 est également observée au niveau de la matrice extracellulaire des cellules endothéliales de carcinomes à cellules squameuses orales [Hsieh *et al.*, 2008].

Gal-1 stimule la prolifération, la migration et l'adhérence des cellules endothéliales en culture [Hsieh *et al.*, 2008]. Elle module également la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires [Moiseeva *et al.*, 2000]. L'implication de cette protéine dans l'angiogenèse physiologique et tumorale a été démontrée *in vivo*. Dans le modèle de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet, le traitement avec un anticorps ciblant Gal-1 réduit la densité microvasculaire. De plus, les poissons zèbres, pour lesquels l'expression de *Gal-1* a été inhibée, présentent des hémorragies et des vaisseaux défectueux. Chez les souris *Gal^{-/-}*, la croissance tumorale est fortement inhibée avec une diminution importante du nombre des vaisseaux sanguins tumoraux [Thijssen *et al.*, 2006]. La protéine, lorsqu'elle est sécrétée par les cellules tumorales, active les cellules endothéliales, stimule leur prolifération, leur migration et donc augmente l'angiogenèse tumorale [Thijssen *et al.*, 2010].

L'inhibition de *Gal-1* par interférence de l'ARN dans les cellules endothéliales augmente les interactions entre les neutrophiles et les cellules endothéliales lors de tests d'adhérence en flux. L'effet inhibiteur de Gal-1 a été retrouvé *in vivo* dans des modèles d'inflammation aiguë. L'infiltration des leucocytes est augmentée chez les souris *Gal^{-/-}* traitées à l'IL-1 β par rapport aux souris sauvages [Cooper *et al.*, 2008]. De plus, le recrutement des granulocytes est moins important chez les souris traitées avec de la Gal-1 recombinante et il est associé à une diminution de la libération des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 β [Gil *et al.*, 2010]. L'expression endothéliale de Gal-1, induite par les cellules cancéreuses de prostate, inhibe la migration transendothéliale des lymphocytes T [He et Baum, 2006].

➤ **Inhibition de l'adhérence des leucocytes par Del-1**

Del-1 (*Developmentally regulated endothelial cell locus 1* ou EDIL3) est une protéine associée à la matrice extracellulaire exprimée par les cellules endothéliales. Elle est exprimée spécifiquement par les cellules endothéliales au cours du développement embryonnaire précoce et n'est plus détectée chez l'adulte [Hidai *et al.*, 1998], à l'exception des cellules endothéliales du cerveau et des poumons [Choi *et al.*, 2008]. Cette protéine stimule l'adhérence et la migration des cellules endothéliales *in vitro* [Penta *et al.*, 1999] [Hidai *et al.*, 1998]. Elle stimule également l'angiogenèse dans des tests *in vitro* et *in vivo* [Hidai *et al.*, 1998; Penta *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2004]. Del-1 est réexprimée en cas d'ischémie et induit la formation de nouveaux vaisseaux via son interaction avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ [Zhong *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2004].

Un rôle de Del-1 dans l'adhérence des leucocytes a récemment été décrit. Les auteurs ont montré que Del-1 est un ligand de l'intégrine leucocytaire LFA-1. Contrairement à ce qui était attendu, l'adhérence des leucocytes sur des cellules endothéliales *Del1^{-/-}* est plus élevée que sur les cellules contrôle *in vitro* et *in vivo*. Le mécanisme d'action de Del-1 est le suivant : cette molécule empêche l'interaction de LFA-1 à la surface des leucocytes avec ses ligands endothéliaux, comme ICAM-1, ce qui inhibe l'adhérence des leucocytes. Lors de l'inflammation, l'expression de Del-1 est inhibée par la cytokine pro-inflammatoire TNF α [Choi *et al.*, 2008].

Des études ont montré l'implication de Del-1 dans la tumorigenèse. La surexpression de Del-1 dans les lignées cancéreuses de carcinome du poumon murin (LLC1) et d'ostéosarcome humain (143B) augmente la croissance tumorale. Cet effet pro-tumoral est associé à une augmentation de la densité vasculaire [Aoka *et al.*, 2002]. A l'inverse, l'inhibition de Del-1 inhibe la croissance de cellules tumorales de cancer du colon *in vivo* [Zou *et al.*, 2008]. L'expression de Del-1 a été détectée dans plusieurs types de tumeurs humaines [Aoka *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2010] et une expression élevée est associée avec une faible survie dans les hépatocarcinomes [Sun *et al.*, 2010]. Jusqu'à présent, l'effet pro-tumoral de Del-1 a été associé à son effet pro-angiogénique, cependant son implication potentielle dans l'échappement tumoral par inhibition du recrutement des cellules immunitaires n'a jusqu'à ce jour pas encore été explorée.

Le système immunitaire est donc à la fois impliqué dans la lutte contre la tumorigenèse et dans la promotion tumorale. Les cellules tumorales développent des mécanismes leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire anti-tumorale. L'inhibition de l'infiltration des cellules immunitaires dans le tissu tumoral est l'un d'entre eux. L'adhérence des cellules immunitaires sur l'endothélium peut être régulée par les cellules tumorales, mais également par les cellules endothéliales. A ce jour, seules deux protéines endothéliales ont été décrites pour inhiber l'adhérence leucocytaire. Elles participent également au processus d'angiogenèse, suggérant l'existence potentielle d'autres protéines impliquées à la fois dans l'angiogenèse et dans l'inhibition de l'infiltration leucocytaire.

III. La VE-statine/EGLF7

A. Description de la VE-statine

L'étude de la séquence de l'ADNc *vezf1* (équivalent murin du facteur de transcription DB1) a permis la découverte de la VE-statine (*Vascular Endothelial-statin*) au sein de l'équipe en 2003 [Soncin *et al.*, 2003]. La VE-statine a été ensuite décrite par deux autres laboratoires en 2004, sous le nom de EGFL7 (*EGF-Like domain 7*) [Fitch *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2004].

1. Le gène *VE-statine*

Le gène de la VE-statine est localisé respectivement sur les chromosomes 9 et 2 chez l'Homme et la souris. C'est un gène conservé, retrouvé dans de nombreuses espèces [Soncin *et al.*, 2003]. Sur le chromosome murin, il est situé en aval du gène *Notch1* (116 kpb), gène qui code pour une protéine jouant un rôle important dans l'angiogenèse [Le Bras *et al.*, 2010].

Le gène *VE-statine* est composé de 11 exons, dont les exons 1a et 1b qui permettent la transcription des ARNm *VE-statine-a* et *VE-statine-b*, ce dernier étant majoritairement exprimé dans les cellules endothéliales. Néanmoins, ces deux ARNs codent pour la même protéine, le codon d'initiation de la traduction étant situé au niveau de l'exon 3 (**Figure 15**) [Soncin *et al.*, 2003].

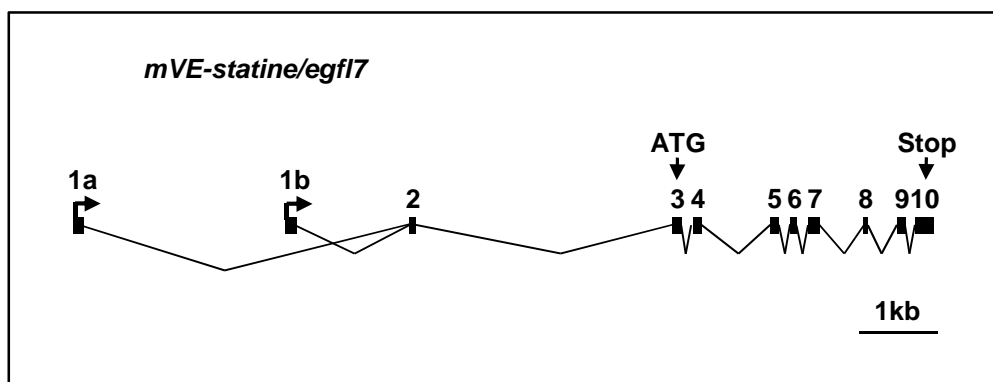


Figure 15 : Représentation schématique du gène murin *VE-statine/egfl7*.

Le gène est composé de 11 exons (rectangles noirs). Les sites d'initiation de la transcription sont situés au niveau des exons alternatifs 1a et 1b qui codent respectivement pour les ARNm *VE-statine 1a* et *1b*. Le triplet ATG se situe au niveau de l'exon 3 et le codon Stop au niveau de l'exon 10.

2. Expression de la VE-statine par les cellules endothéliales

La VE-statine est exprimée par des lignées de cellules endothéliales humaines (HUVEC), murines (EOMA, H5V, 1G11), bovines (BAEC) et ne l'est pas ou à des niveaux très faibles par des lignées non endothéliales (3T3, L929, Jurkat, HeLa, HEK293) [Soncin *et al.*, 2003; Fitch *et al.*, 2004]. Dans les cellules endothéliales, cette expression est directement contrôlée par les facteurs de transcription Erg et GATA-2 et indirectement par Fli-1, ces différents facteurs étant naturellement fortement exprimés par ces cellules [Le Bras *et al.*, 2010].

In vivo, le profil d'expression du gène *VE-statine* est conservé entre les espèces [Parker *et al.*, 2004]. Des études par hybridation *in situ* ont montré une expression de la VE-statine par les progéniteurs endothéliaux précoces. En effet, l'ARNm *VE-statine* est détecté à E7,5 au niveau des îlots sanguins primitifs. L'expression reste restreinte aux cellules endothéliales tout au long du développement embryonnaire. Cette expression est aussi observée lors du développement vasculaire du rein néo-natal chez la souris [Soncin *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2004]. L'expression de la VE-statine est ensuite réprimée dans les cellules endothéliales quiescentes chez l'adulte, mais reste détectable dans les vaisseaux sanguins des poumons, du cœur et du rein. La VE-statine est réexprimée par les cellules endothéliales de tissus en situation de remodelage vasculaire (gestation, blessure artérielle, plaques d'athérosclérose, tumeurs humaines) [Soncin *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2004; Campagnolo *et al.*, 2005].

Il a également été rapporté une expression de la VE-statine dans les cellules germinales primordiales et dans les gonades [Campagnolo *et al.*, 2008], et plus récemment, dans un sous-type de neurones [Schmidt *et al.*, 2009].

3. Structure de la protéine

La VE-statine est une protéine d'environ 30 kDa, composée respectivement de 275 et de 273 acides aminés pour la protéine murine et humaine [Soncin *et al.*, 2003].

C'est une protéine conservée au cours de l'évolution. En effet, la séquence humaine présente 77% d'homologie avec celle de la souris et du rat et 47% avec celle du xénope (**Figure 16**).

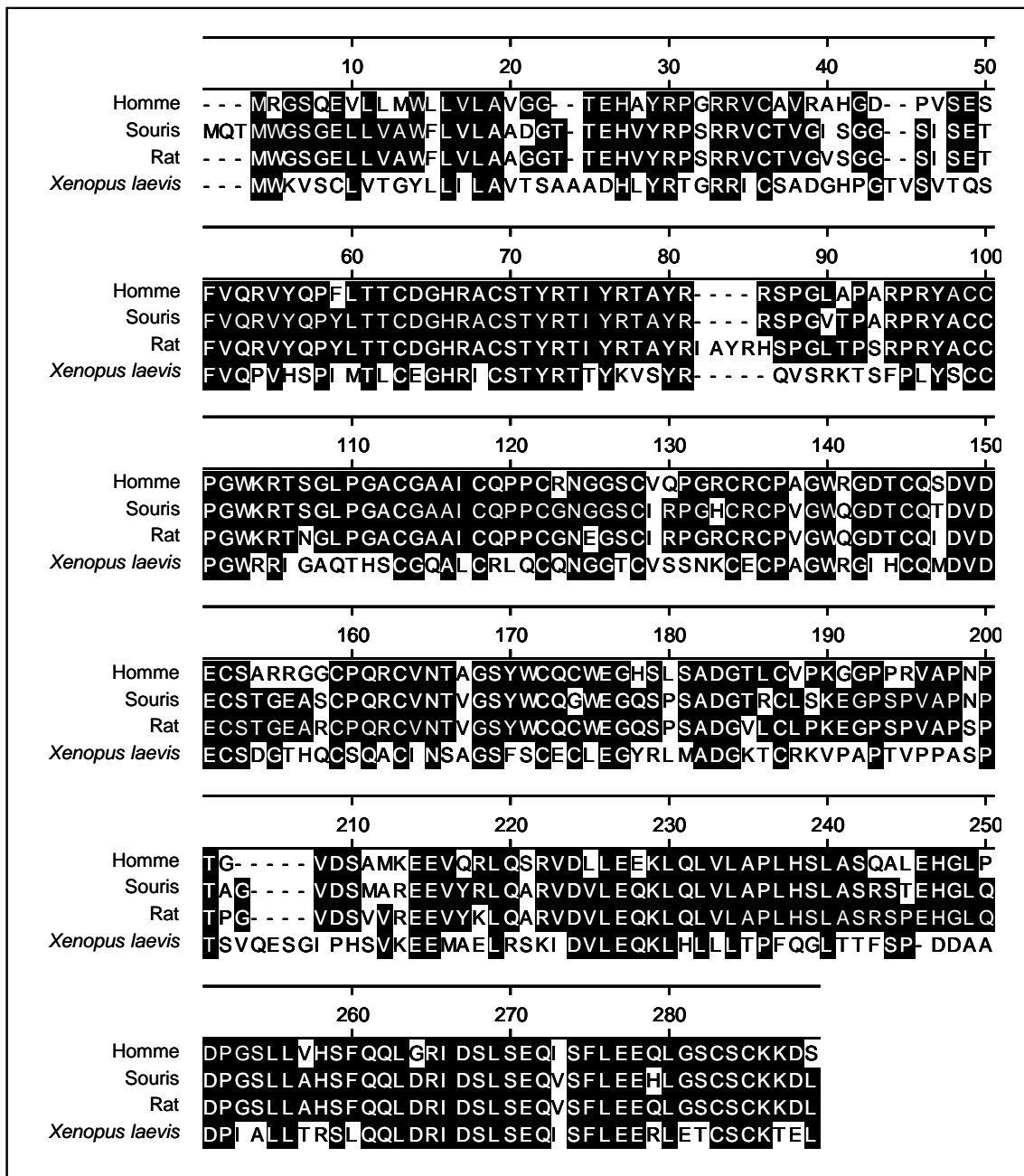


Figure 16 : Alignement des séquences protéiques de la VE-statine de l'Homme, la souris, le rat et le xénope.

Effectué avec le logiciel DNASTAR.

Les bases de données de domaines protéiques présentent plusieurs domaines dans la séquence primaire de la protéine : un peptide signal clivable en N-terminal, retrouvé dans la majorité des protéines sécrétées ; un domaine EMI (EMILIN) ; deux domaines EGF, dont le second pourrait fixer le Ca^{2+} ; ainsi qu'une région C-terminale très conservée riche en leucine et en valine (Figure 17) [Soncin *et al.*, 2003; Fitch *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2004]. Les domaines EMI et EGF sont des domaines retrouvés dans les protéines sécrétées et les protéines de la matrice extracellulaire [Colombatti *et al.*, 2000; Campbell et Bork, 1993]. Le premier domaine EGF possède une région similaire au domaine DSL (Delta/Serrate/Lag-2) retrouvé dans les ligands aux récepteurs Notch [Fitch *et al.*, 2004; Fleming, 1998].

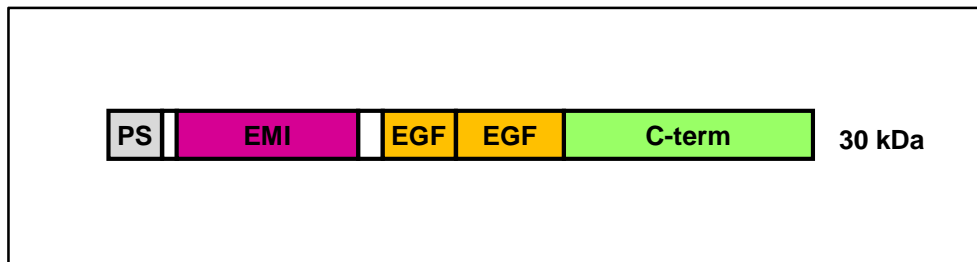


Figure 17 : Représentation schématique de la protéine VE-statine.

La VE-statine est composée d'un peptide signal (PS), d'un domaine EMI, de deux domaines EGF et d'un domaine C-terminal conservé (C-term).

Quand la VE-statine, étiquetée avec la *Green Fluorescent Protein* (GFP) ou avec l'épitope du virus de la grippe HA (*influenza hemagglutinin*), est surexprimée dans des cellules en culture *in vitro*, elle se localise au niveau du réticulum endoplasmique. Elle se retrouve aussi dans le surnageant cellulaire, confirmant que cette protéine est sécrétée. [Soncin *et al.*, 2003; Fitch *et al.*, 2004]. La VE-statine produite par les cellules endothéliales s'associe à la matrice extracellulaire [Lelièvre *et al.*, 2008]. De plus, la taille apparente de la VE-statine sécrétée est plus élevée que celle prédite, suggérant des modifications post-traductionnelles [Soncin *et al.*, 2003; Fitch *et al.*, 2004].

Il existe un gène analogue à *VE-statine/Egfl7* : le gène *Egfl8*, cependant celui-ci n'est pas conservé dans toutes les espèces. Ce gène code pour une protéine qui a peu d'homologie avec la VE-statine, environ 35 % chez l'Homme et la souris. Cependant, la prédiction de ses domaines montre une organisation similaire à la VE-statine [Parker *et al.*, 2004; Fitch *et al.*, 2004].

B. Fonctions de la VE-statine dans l'endothélium

1. Rôle dans la vasculogenèse et dans l'angiogenèse

a) Effet de la VE-statine sur la migration cellulaire *in vitro*

Le traitement de cellules musculaires lisses humaines (AoSMC) avec du milieu conditionné contenant la VE-statine réduit la migration de ces cellules induite par le PDGF-BB dans des tests de blessure et de chambre de migration, sans moduler leur prolifération [Soncin *et al.*, 2003]. La VE-statine n'a, par contre, pas d'effet sur la migration des cellules endothéliales HUVEC [Soncin *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2004]. Ces résultats suggèrent un rôle de la VE-statine dans l'angiogenèse et plus particulièrement dans la maturation des vaisseaux, qui nécessite la migration des cellules musculaires lisses.

Une autre étude montre, au contraire, une stimulation de la migration de cellules endothéliales murines (C167) et de fibroblastes embryonnaires murins (MEF) lors d'un traitement des cellules avec du milieu conditionné dans un test en chambre de migration. Cependant aucun effet sur la mobilité des cellules musculaires lisses de rat (RVSMC) n'est observé [Campagnolo *et al.*, 2005]. Ces résultats divergents pourraient s'expliquer par l'utilisation de lignées cellulaires provenant d'espèces différentes.

b) Etudes *in vivo* du rôle de la VE-statine dans la formation des vaisseaux

➤ Etude par invalidation de gène

La première étude par invalidation du gène a montré un retard du développement vasculaire des embryons *VE-statine*^{-/-}, des œdèmes sévères ainsi qu'une mortalité embryonnaire notable [Schmidt *et al.*, 2007]. Cependant, ce phénotype a été, par la suite, attribué à l'inactivation concomitante du locus contenant miR-126. En effet, l'intron 7 du gène *VE-statine* contient la séquence d'un micro-ARN, miR-126 [Wang *et al.*, 2008]. Les micro-ARNs sont de petits ARNs non codant de 20 à 25 nucléotides qui se fixent sur l'ARN de leur gène cible, induisant ainsi sa dégradation ou l'inhibition de sa traduction [Bartel, 2004]. Les études suggèrent que les gènes des miR introniques sont co-transcrits avec le gène hôte. Ils sont ensuite clivés par une exonucléase puis subissent les étapes nécessaires à leur maturation [Rodriguez *et al.*, 2004]. Les souris *miR-126*^{-/-} présentent le même phénotype que celui obtenu dans l'étude précitée, tandis que les souris dont le gène *VE-statine* est invalidé spécifiquement (sans toucher l'expression de miR-126) présentent un phénotype macroscopiquement normal, mais qui reste peu détaillé [Kuhnert *et al.*, 2008].

➤ Implication dans la vasculogénèse

Une approche probablement plus spécifique par interférence de l'ARN chez le poisson zèbre a permis de montrer un rôle de la VE-statine dans la tubulogénèse. L'injection d'oligonucléotides morpholinos anti-sens ciblant la *VE-statine* a pour conséquence le développement de problèmes vasculaires chez 40 % des embryons. Ceux-ci n'ont pas de circulation sanguine ou ils ont une boucle de circulation incomplète. Beaucoup d'embryons présentent des œdèmes du péricarde ou des hémorragies. Les artères et les veines primaires sont positionnées à la bonne place, indiquant qu'il n'y a pas de problème de prolifération des cellules endothéliales, ni de migration. Cependant les lumières vasculaires sont désorganisées ou absentes dans beaucoup de vaisseaux, reflétant un problème de tubulogénèse (**Figure 18**). Il s'avère que les angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales, organisés en forme de cordes, ne se séparent pas et conservent des jonctions intercellulaires serrées, empêchant ainsi la formation de la lumière du tube endothélial. Ce phénotype peut être attribué à la VE-statine car la co-injection d'oligonucléotides anti-sens et d'ARNm *VE-statine* permet de retrouver un phénotype normal [Parker *et al.*, 2004].

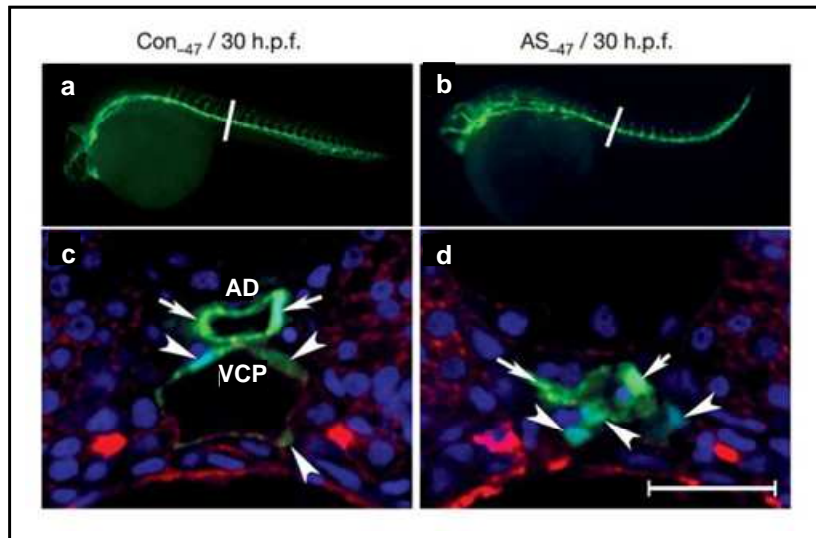


Figure 18 : Nombre de cellules endothéliales inchangé mais absence de lumière des vaisseaux primaires chez les poissons injectés avec des morpholinos anti-sens ciblant la *VE-statine*.

Poissons transgéniques *flk1:GFP* (vert) à 30 heures post-fertilisation (h.p.f.) injectés avec les oligonucléotides contrôle (**a.**, **c.**) et antisens ciblant la *VE-statine* (**b.**, **d.**). **a.** et **b.** : vue latérale ; **c.** et **d.** : sections effectuées au niveau de la ligne blanche indiquée en **a.** et **b.** et marquées à la phalloïdine (rouge, actine F) et au DAPI (bleu, noyaux). Les flèches désignent les cellules endothéliales artérielles et les têtes de flèches, les cellules endothéliales veineuses. AD : aorte dorsale ; VCP : veine cardinale postérieure. Barre d'échelle : 0,47 mm (**a.**, **b.**) et 0,03 mm (**c.**, **d.**). Extrait de [Parker *et al.*, 2004]

L'observation en microscopie électronique de l'ultrastructure de vaisseaux, dont la lumière est réduite ou oblitérée, montre des jonctions entre cellules endothéliales placées à de mauvaises positions. L'absence de *VE-statine* entraîne donc des complications au niveau de la mise en place des jonctions cellulaires, traduisant probablement un problème dans la polarité des cellules endothéliales [De Mazière *et al.*, 2008].

Ces études montrent donc une implication de la *VE-statine* dans la régulation de la vascularisation. Pour ce qui est de son rôle dans l'angiogenèse, ce modèle ne permet pas de l'étudier. En effet, les vaisseaux intersegmentaires issus de l'angiogenèse régressent chez les embryons *KD*, ce qui est la conséquence probable de l'absence de flux sanguin [Parker *et al.*, 2004].

L'implication de la *VE-statine* dans l'organisation des cellules endothéliales lors de la vascularisation a été confirmée par une autre étude d'interférence de l'ARN dans un modèle *in vitro* de corps embryoides [Durrans et Stuhlmann, 2010]. Les corps embryoides sont des structures tridimensionnelles produites par l'agrégation de cellules souches embryonnaires et leur différenciation peut être comparée à la cinétique de développement précoce de l'embryon [Desbaillets *et al.*, 2000]. En présence d'ARN ciblant la *VE-statine*, les corps embryoides ont des problèmes de formation précoce de l'endothélium [Durrans et Stuhlmann, 2010].

➤ Implication dans l'angiogenèse

La présence d'un domaine DSL dans la séquence protéique de la *VE-statine* suggère une interaction possible avec les récepteurs Notch. Par un système de double hybride et des expériences

de co-immunoprécipitation, il a été montré que la VE-statine recombinante peut se fixer aux quatre sous-types de récepteurs Notch [Schmidt *et al.*, 2009].

La voie Notch intervient dans l'angiogenèse mais également dans la différenciation neuronale [Yoon et Gaiano, 2005]. Les neurones sont une source de VE-statine dans le cortex. *In vitro*, la fixation de la VE-statine à Notch a un effet antagoniste sur la signalisation Notch induite par Jagged-1 et induit la différenciation de cellules souches neurales en neurones et en oligodendrocytes, plutôt qu'en astrocytes [Schmidt *et al.*, 2009]. Cette étude montre que la VE-statine peut réguler la voie Notch et suggère un rôle probable dans l'angiogenèse.

L'interaction de la VE-statine avec le récepteur Notch a, par la suite, été décrite dans une étude du rôle de la VE-statine dans la formation des vaisseaux. Un modèle de surexpression de la VE-statine sous le contrôle du promoteur Tie-2 a été développé, permettant une surexpression spécifique dans l'endothélium et les cellules de la lignée hématopoïétique précoce. Les embryons transgéniques (*Tie2-VE-statine*) présentent des problèmes de vascularisation ainsi que des problèmes hémorragiques et cardiaques aboutissant à une létalité partielle. De plus, un problème de stratification des cellules vasculaires est observé au niveau de l'aorte dorsale. En effet, chez les embryons sauvages, les cellules musculaires lisses (SMA⁺) sont positionnées à côté de la couche de cellules endothéliales (CD31⁺), contrairement aux embryons transgéniques. Dans ces derniers, les cellules ne sont plus organisées en couches, les cellules SMA⁺ sont observées entre les cellules CD31⁺. Ce phénotype n'est observé qu'au niveau des points de branchements, qui sont des sites de croissance vasculaire et de remodelage. L'analyse du développement post-natal du réseau vasculaire de la rétine montre une réponse hyper-angiogénique chez les souris transgéniques, avec une augmentation des branchements des artères, des veines anormales (tortueuses, structures « *knot-like* ») et une augmentation du nombre de filopodes [Nichol *et al.*, 2010].

In vitro, la surexpression de la VE-statine dans les HUVEC induit la formation d'un réseau capillaire uniforme, sans bourgeonnement dominant tandis que l'inhibition de la VE-statine inhibe la prolifération cellulaire, le bourgeonnement capillaire et la migration [Nichol *et al.*, 2010], comme retrouvé en cas d'activation de la voie Notch [Williams *et al.*, 2006]. De plus, les phénotypes hyper-angiogéniques observés dans la rétine et *in vitro* ressemblent à ceux retrouvés en cas d'inhibition de la voie Dll4-Notch [Ridgway *et al.*, 2006; Suchting *et al.*, 2007].

Une interaction entre la VE-statine et Notch-4 a été décrite. Dans des tests *in vitro* de transactivation avec un rapporteur luciférase comportant des éléments de réponse à Notch, la surexpression de la VE-statine induit une diminution de moitié de l'activité luciférase, tandis que l'inhibition de la VE-statine augmente l'activité du rapporteur. De plus, *in vivo*, l'expression de *Hes1* et *Notch4*, gènes cibles de Notch, est diminuée dans les rétines transgéniques *Tie2-VE-statine*. L'interaction de la VE-statine avec Notch a donc un effet antagoniste sur la voie Notch. De façon étonnante, l'analyse de l'expression des gènes cibles de Notch chez l'embryon transgénique montre une augmentation de *Hey1* et *Hey2*, indiquant une possible action agoniste de la VE-statine pendant l'embryogenèse [Nichol *et al.*, 2010].

La VE-statine joue donc un rôle dans le développement vasculaire, en partie via la modulation de la voie Notch.

2. Inhibition de l'élastogénèse

Notre équipe a développé un modèle de surexpression ectopique de la VE-statine par des kératinocytes *in vivo* [Lelièvre *et al.*, 2008], stratégie déjà utilisée pour étudier le potentiel angiogénique de facteurs tels que l'angiopoïétine-1 [Suri *et al.*, 1998].

Les souris transgéniques ont une peau plus souple et, à P5, la pointe de la queue des souriceaux devient nécrotique. L'analyse histologique révèle un diamètre réduit des artères caudales par rapport aux souris contrôle. Ces vaisseaux sont également caractérisés par des cellules endothéliales protubérantes, un nombre de couches de cellules musculaires lisses important et des cellules endothéliales et musculaires lisses en prolifération. La limitante élastique interne est plus fine et discontinue chez les souris transgéniques, indiquant un problème d'organisation des fibres élastiques. La protéine produite par les kératinocytes circule dans l'organisme par l'intermédiaire du sang et s'accumule au niveau des parois vasculaires à distance de la peau, comme au niveau de l'aorte par exemple. Elle y est co-localisée avec les fibres élastiques et cette co-localisation existe également chez les embryons et les souris contrôle, au niveau des vaisseaux surexprimant naturellement la VE-statine [Lelièvre *et al.*, 2008].

Les fibres élastiques sont des composants de la matrice extracellulaire et leur formation se déroule en plusieurs étapes. Le précurseur soluble, la tropoélastine, est sécrété par de nombreux types cellulaires, tels que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses ou les fibroblastes. La tropoélastine s'agrège spontanément avec les tropoélastines adjacentes. Les enzymes de la famille des lysyl oxydases LOX (LOX, LOXL1 à L4) effectuent des pontages (*crosslink*) entre les tropoélastines, formant ainsi des polymères d'élastine insoluble [Kielty *et al.*, 2002; Lucero et Kagan, 2006].

Des tests *in vitro* ont permis de montrer que la VE-statine interfère avec l'assemblage final des fibres élastiques. Elle n'a cependant pas d'effet sur les fibres élastiques déjà déposées. Le traitement des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) avec la protéine VE-statine recombinante inhibe l'activité enzymatique des LOX. Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de valider une interaction directe de la VE-statine avec les LOX, via leur domaine catalytique. De plus, la VE-statine endogène sécrétée par les HUVEC est localisée avec Lox-L2 dans la matrice extracellulaire. Une approche par interférence de l'ARN a permis de montrer que la VE-statine inhibe le dépôt des fibres élastiques en réprimant l'activité LOX des HUVEC. En effet, lorsque l'expression de la VE-statine endogène est inhibée dans les HUVEC, l'activité LOX augmente, et par conséquent, il y a un dépôt massif de fibres élastiques par ces cellules. La VE-statine réprime également la transcription de la tropoélastine, via l'inhibition de l'activité de LOXL2 [Lelièvre *et al.*, 2008].

La VE-statine est donc un inhibiteur endogène aux cellules endothéliales de l'élastogénèse vasculaire.

3. Inhibition de l'expression d'ICAM-1

Des études récentes ont montré que l'hypoxie stimulerait la production de VE-statine dans des cellules endothéliales d'artère coronaire humaine (HCAEC) [Badiwala *et al.*, 2010]. A l'inverse, l'hyperoxie réduirait l'expression de la VE-statine *in vitro*, dans les cellules endothéliales HUVEC, et *in vivo* dans des poumons de rats nouveau-nés [Xu *et al.*, 2008]. Dans un modèle *in vitro* d'hypoxie suivie d'une réoxygénation, mimant un événement d'ischémie/reperfusion, l'expression de la molécule d'adhérence ICAM-1 est augmentée. Cette augmentation semble inhibée en présence de VE-statine recombinante. Une diminution de l'expression basale d'ICAM-1 a également été observée en présence de VE-statine recombinante. Les auteurs suggèrent que cet effet passe par la voie du facteur nucléaire NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*). En effet, la translocation dans le noyau de NF- κ B, qui a lieu après hypoxie et réoxygénation, est inhibée en présence de VE-statine et le taux de son inhibiteur cytoplasmique I κ B- α partiellement restauré, aboutissant à une inhibition de l'activation de NF- κ B [Badiwala *et al.*, 2010].

NF- κ B et ICAM-1 étant impliqués dans l'inflammation [Pasparakis, 2009; Ley *et al.*, 2007], ces données suggèrent un rôle de la VE-statine dans le processus inflammatoire.

C. VE-statine et cancer

1. Expression de la VE-statine dans les tumeurs humaines

Parker *et al.* ont publié la première observation d'une réexpression de la VE-statine dans des tumeurs humaines de poumons et du rein [Parker *et al.*, 2004]. Cependant, il n'a pas été précisé si les cellules productrices de VE-statine étaient d'origine endothéliale ou tumorale. Par la suite, plusieurs études plus approfondies ont montré une expression ectopique de la VE-statine par les cellules tumorales dans différents types tumoraux.

Dans le cancer colorectal, des niveaux d'ARN messager de la VE-statine ont été évalués par RT-PCR quantitative. Les taux élevés de *VE-statine* correspondent à des tumeurs avec un grade pathologique élevé. L'expression du gène est également corrélée avec la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques. Cependant, les taux de *VE-statine* ne sont corrélés ni avec l'invasion vasculaire, ni avec la survie sans progression ou la survie globale [Díaz *et al.*, 2008]. La technique utilisée ne permet pas de savoir par quel type cellulaire la VE-statine est produite.

Une analyse par immunohistochimie d'hépatocarcinome humain montre une surexpression de la VE-statine par les cellules tumorales dans 90% des tumeurs testées. Il n'est cependant pas précisé si la protéine est réexprimée par les cellules endothéliales. La surexpression de la VE-statine est significativement plus élevée dans les tumeurs avec des nodules multiples, sans capsule et avec des invasions vasculaires, qui sont des marqueurs métastatiques. Ce niveau est également corrélé avec le mauvais pronostic [Wu *et al.*, 2009].

Dans le gliome, des taux élevés d'ARN messager et de protéine VE-statine corréleront avec le haut grade tumoral. De plus, il existe une association entre la surexpression, la prolifération cellulaire et la densité microvasculaire. Le marquage par immunohistochimie permet de détecter la VE-statine

dans le cytoplasme des cellules tumorales, mais également des cellules endothéliales [Huang *et al.*, 2010].

Ces études montrent une surexpression de la VE-statine par les cellules cancéreuses humaines corrélée avec le grade tumoral et/ou les marqueurs métastatiques et/ou le mauvais pronostic, selon le type tumoral. Ces données suggèrent que la VE-statine est une protéine pro-tumorale et pro-métastatique.

2. VE-statine et métastases

L'analyse de l'expression de la VE-statine dans des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes (HepG₂, MHCC97-L et HCCLM3) montre des niveaux protéiques corrélés avec le potentiel métastatique de ces lignées. En d'autres termes, plus la lignée exprime de la VE-statine, plus elle est métastatique. L'inhibition de l'expression de la VE-statine par interférence de l'ARN diminue la migration des cellules HCCLM3 (HCCLM3-ARNsi⁺) sans affecter la prolifération cellulaire *in vitro* [Wu *et al.*, 2009]. Les auteurs se sont intéressés à la protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*), qui est une tyrosine kinase cytoplasmique impliquée dans la migration interagissant avec les récepteurs aux intégrines ou aux facteurs de croissance, tel que le récepteur à l'EGF (EGFR) [Cox *et al.*, 2006]. La phosphorylation de FAK, nécessaire à son activation, est diminuée lorsque l'expression de la VE-statine est inhibée dans les HCCLM3. La stimulation des HCCLM3-ARNsi⁺ avec de la protéine VE-statine recombinante permet d'augmenter la phosphorylation de FAK et la migration cellulaire. Ces effets sont annulés par un inhibiteur du récepteur à l'EGF, suggérant un effet via celui-ci [Wu *et al.*, 2009]. Cependant ce serait par une action indirecte vu que ce dernier n'interagit pas directement avec la VE-statine [Schmidt *et al.*, 2009].

Afin de confirmer ces résultats, les auteurs ont utilisé un modèle métastatique murin d'hépatocarcinome. Les tumeurs primaires du foie sont plus petites dans le groupe HCCLM3-ARNsi⁺ par rapport aux souris du groupe contrôle, suggérant une promotion de la croissance tumorale par la VE-statine. La densité microvasculaire est également plus faible dans les tumeurs HCCLM3-ARNsi⁺. De plus, ces souris présentent moins de métastases intrahépatiques et pulmonaires. En accord avec les résultats *in vitro*, l'inhibition de la VE-statine diminue la phosphorylation de FAK [Wu *et al.*, 2009].

Cette première étude expérimentale confirme l'implication de la VE-statine dans la formation des métastases, possiblement en partie via la voie EGFR-FAK. La protéine FAK est impliquée dans le processus métastatique. En effet, l'expression inductible d'un dominant négatif de FAK réduit la croissance de la tumeur primaire et les métastases pulmonaires dans un modèle de rat syngénique [van Nimwegen *et al.*, 2005]. De plus, FAK est surexprimée dans de nombreux cancers et cette expression est corrélée avec des phénotypes invasifs [Owens *et al.*, 1995; Cance *et al.*, 2000].

La VE-statine est donc une protéine majoritairement produite par les cellules endothéliales. Elle exerce de nombreuses fonctions sur l'endothélium. En effet, elle est impliquée dans les processus de vasculogénèse et d'angiogénèse, même si son rôle exact reste à approfondir. C'est également un régulateur naturel de l'élastogénèse vasculaire. De plus, elle a été récemment décrite comme un

inhibiteur de l'expression d'ICAM-1 par les cellules endothéliales, suggérant un rôle potentiel de la VE-statine dans l'inflammation.

La VE-statine est exprimée de manière ectopique par les cellules cancéreuses dans les tumeurs colorectales, dans les gliomes et les hépatocarcinomes humains. Son expression est corrélée avec un haut grade des tumeurs, un fort taux métastatique et un mauvais pronostic. A l'heure actuelle, une seule étude expérimentale du rôle de la VE-statine dans la formation des métastases a été publiée et a montré un rôle pro-métastatique de cette protéine.

Le but de ce projet de thèse a été d'étudier le rôle de la VE-statine dans la croissance et l'angiogenèse tumorales.

RESULTATS



Mon travail de thèse a consisté en l'étude du rôle de la VE-statine dans la tumorigenèse et dans l'angiogenèse en utilisant des cellules tumorales surexprimant cette protéine. Dans une première partie, je décris les approches *in vitro* et *in vivo* réalisées avec un système inductible de surexpression, ainsi que les problèmes de reproductibilité rencontrés qui nous ont décidés à changer d'approche. Puis, je présente les résultats *in vitro* et *in vivo* issus de la surexpression de la VE-statine par un système d'infection virale. Enfin, dans la troisième partie, je parle du rôle de la VE-statine dans l'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs.

Au début de ce travail, aucune étude sur le rôle de la VE-statine dans la tumorigenèse n'avait été publiée. L'implication de la VE-statine dans la vasculogenèse [Parker *et al.*, 2004] et dans la migration des cellules musculaires lisses, mécanisme important de la maturation vasculaire, avait été décrite [Soncin *et al.*, 2003]. Cependant, son rôle éventuel dans la formation des vaisseaux tumoraux restait inexploré. Quelques travaux avaient, néanmoins, mis en évidence une expression augmentée du gène *VE-statine* dans plusieurs tumeurs humaines par rapport aux tissus normaux. En effet, Parker *et al.* avaient rapporté une expression du gène dans les tumeurs du poumon et du rein [Parker *et al.*, 2004]. De plus, notre équipe avait analysé l'expression du gène *VE-statine* dans des tissus normaux et tumoraux par hybridation *in situ* sur des lames de *tissus-arrays*. Cette étude avait mis en évidence une augmentation de son expression dans les carcinomes humains à cellules squameuses de l'utérus et du poumon (résultats non publiés). Une étude ultérieure de tumeurs du poumon à différents stades TNM (*Tumor, lymph Nodes, Metastasis*) avait montré une expression du gène *VE-statine* spécifique au stade T2 (résultats non publiés). L'ensemble de ces données suggéraient donc un rôle possible de la VE-statine dans la tumorigenèse.

I. Surexpression de la VE-statine par un système inductible

La première stratégie de surexpression de la VE-statine a été basée sur l'utilisation d'un système inductible par la tétracycline. L'avantage de cette méthode est de pouvoir contrôler la production de la protéine dans le temps.

Suite aux résultats préliminaires de l'équipe sur l'expression de la VE-statine dans le cancer du poumon, nous avons choisi de surexprimer la VE-statine dans la lignée cancéreuse murine LLC1 (*Lung Lewis Carcinoma*) issue d'un adénocarcinome du poumon. Ce modèle de tumorigenèse présentait par ailleurs l'avantage d'être bien documenté dans la littérature.

D'autre part, le système immunitaire jouant un rôle important dans le développement tumoral et dans la dissémination métastatique [Joyce et Pollard, 2009; Schreiber *et al.*, 2011], nous avons décidé d'utiliser une lignée cancéreuse murine, qui permet d'établir des modèles de tumorigenèse chez des souris syngéniques immunocompétentes, contrairement aux cellules d'origine humaine.

A. Surexpression de la VE-statine par un système inductible et caractérisation des clones *in vitro*

L'expression basale de la VE-statine par les LLC1 a été au préalable évaluée par RT-PCR quantitative et comparée à celles des cellules fibroblastiques et endothéliales murines. En effet, à l'état physiologique, les cellules endothéliales expriment ce gène de manière importante, alors que les fibroblastes ne l'expriment que très peu [Soncin *et al.*, 2003]. Le taux d'expression du gène *VE-statine* des LLC1 est supérieur à celui retrouvé dans les lignées fibroblastiques L929 et 3T3, respectivement 150 fois et 46 fois plus élevé. Il est cependant inférieur à celui observé dans les quatre lignées de cellules endothéliales testées (1G11, EOMA, H5V, MS1) : respectivement 23 fois et 36 fois moins élevé que le niveau des EOMA et des MS1 par exemple (**Figure 19**). Le niveau d'expression du gène *VE-statine* par les LLC1 est donc inférieur à celui retrouvé dans les cellules qui l'expriment naturellement.

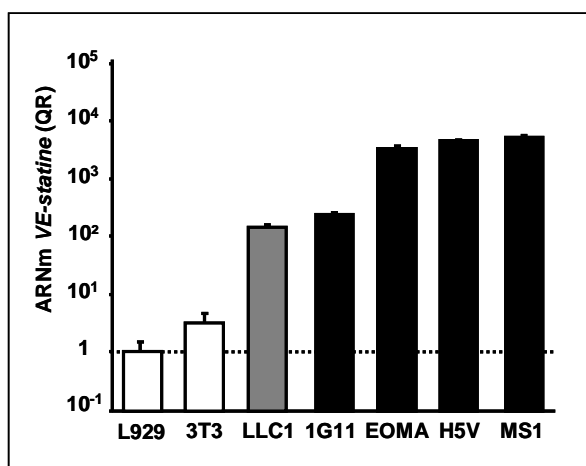


Figure 19 : Comparaison de l'expression du gène *VE-statine* par la lignée cancéreuse LLC1 avec celle des lignées fibroblastiques et endothéliales.

Evaluation par RT-PCR quantitative des taux d'expression du gène *VE-statine* dans les lignées murines fibroblastiques (L929, 3T3), endothéliales (1G11, EOMA, H5V, MS1) et de cancer du poumon LLC1.

Avant mon arrivée dans l'équipe, il avait été choisi de surexprimer la VE-statine de manière inductible en utilisant le plasmide pSTAR. Ce vecteur possède un promoteur de type « Tet-ON », permettant la surexpression de la protéine d'intérêt en présence de tétracycline et confère une résistance à la néomycine [Zeng *et al.*, 1998]. L'ADNc de la VE-statine murine de pleine longueur, avec une étiquette C-terminale codant la séquence de l'*influenza hemagglutinin* (HA), a été inséré dans les sites EcoRI/BamHI du vecteur pSTAR. L'étiquette HA a été ajoutée pour pouvoir vérifier la surexpression de la VE-statine par un Western blot anti-HA, étant donné qu'il n'existait pas d'anticorps commercial reconnaissant efficacement la VE-statine murine.

Au début de ce travail, nous avons transfecté les cellules LLC1 avec le pSTAR codant pour la VE-statine. La surexpression inductible et réversible de la VE-statine par les clones stables sélectionnés en présence de néomycine a été vérifiée par RT-PCR quantitative et par Western blot.

Parmi la centaine de clones obtenus, la majorité exprime la VE-statine de manière non inductible ou alors de manière trop faible pour être détectée par Western blot. Seuls les clones c1 et c62 remplissent les critères précités. En effet, l'incubation avec la doxycycline (dérivé de la tétracycline) induit une forte augmentation des taux d'ARNm dans les clones c1 et c62, ce qui n'est pas le cas, par exemple, pour les clones b9 et c44 choisis parmi les non inductibles. Les niveaux d'expression des clones c1 et c62 sont respectivement 33 et 15 fois plus élevés que ceux des LLC1. Néanmoins, leurs taux d'ARNm *VE-statine* en absence de doxycycline sont plus élevés que l'expression basale des LLC1 contrôle, non transfectées. Il y a donc une « fuite d'expression », c'est-à-dire une expression de base en absence de l'inducteur. Celle-ci est plus importante pour le clone c1 que pour le clone c62. La différence d'expression entre les cellules non induites et les cellules induites est plus élevée pour le clone c62 (5,7 fois pour le c62 et 2,6 fois pour le c1). Notons par ailleurs que la présence de doxycycline a peu d'effet sur l'expression de la VE-statine par les LLC1 non transfectées : le taux d'ARNm est augmenté de 1,2 fois dans les LLC1 + Dox par rapport au LLC1 – Dox, ce qui est plus faible que l'expression induite par la doxycycline pour les clones c1 et c62 (**Figure 20a.**). De façon attendue, les taux protéiques de VE-statine sont augmentés en présence de la doxycycline dans les clones c1 et c62 (**Figure 20b.**). Enfin, la surexpression de la VE-statine-HA est réversible car le retrait de la doxycycline induit une forte diminution des taux protéiques (**Figure 20b.**) et un retour à l'état basal au niveau ARNm (**Figure 20a.**). La réversibilité de la surexpression témoigne donc du bon état du promoteur inductible.

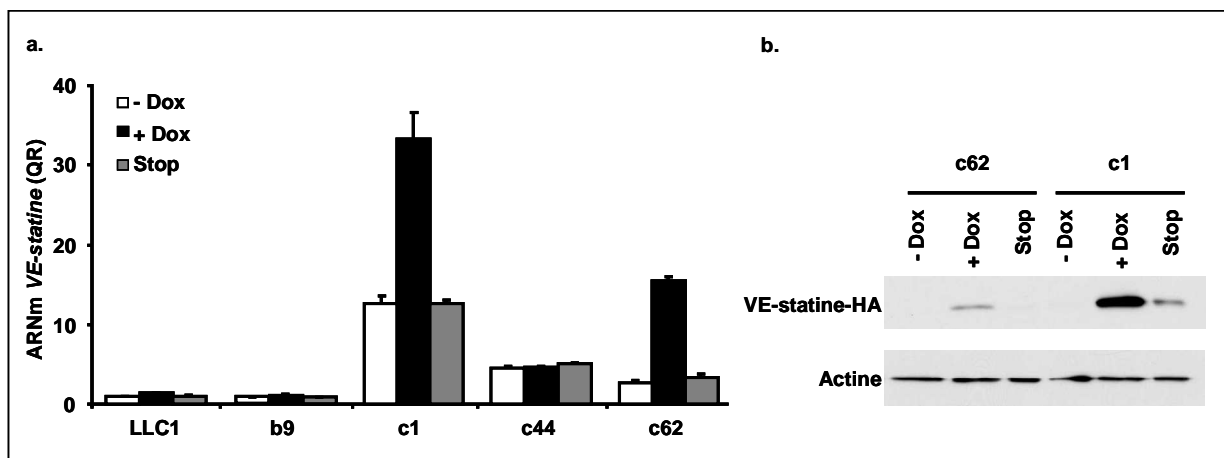


Figure 20 : Sélection des clones stables inductibles.

Les LLC1 et les clones b9, c1, c44 et c62 ont été incubés 2 jours en absence (- Dox), ou en présence de 2 µg/ml de doxycycline (+ Dox), ou en présence de doxycycline pendant 2 jours suivi par un jour sans traitement (Stop). L'expression de la VE-statine a été évaluée par RT-PCR quantitative (a.) et par un Western blot anti-HA (b., dépôt de 30 µg d'extrait protéique).

Afin de voir si la stimulation par la doxycycline modifie les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales, les deux clones sélectionnés, c1 et c62, ont tout d'abord été analysés *in vitro*, en termes de croissance cellulaire, de croissance en condition indépendante de l'ancrage et de migration.

L'incubation avec la doxycycline ne modifie pas la croissance cellulaire des clones c1 et c62, la présence de la doxycycline n'a pas d'effet sur les LLC1 non plus. La courbe de croissance du clone

c1 est superposable à celle des LLC1, alors que la croissance du clone c62 est ralentie (**Figure 21**). Le clone c62, dérivant des LLC1, a donc des caractéristiques modifiées par rapport à la lignée d'origine.

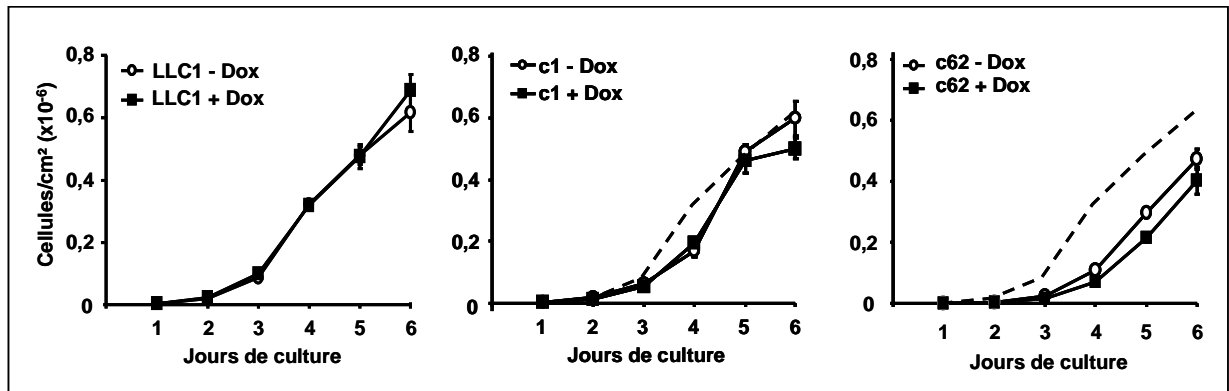


Figure 21 : La stimulation par la doxycycline n'affecte pas la prolifération cellulaire.

Les cellules LLC1, c1 et c62 ont été ensemencées à 2500 cellules/cm², cultivées en absence (- Dox) ou en présence (+ Dox) de 2 µg/ml de doxycycline et comptées quotidiennement. La courbe de croissance des LLC1 a été représentée en pointillés (- - -) sur les graphiques correspondant aux croissances des clones c1 et c62.

D'autre part, la stimulation par la doxycycline diminue la formation de colonies en conditions indépendantes de l'ancrage de 80 % pour le clone c62 et de 50 % pour le c1. La doxycycline n'affecte pas la formation de colonies des cellules LLC1 (**Figure 22a., b.**). De plus, la migration est très fortement diminuée pour le clone c1 (98 %) (**Figure 22c.**).

Ces données *in vitro* suggèrent donc un effet inhibiteur potentiel de la stimulation des clones c1 et c62 par la doxycycline sur la tumorigenèse et sur l'invasion *in vivo*.

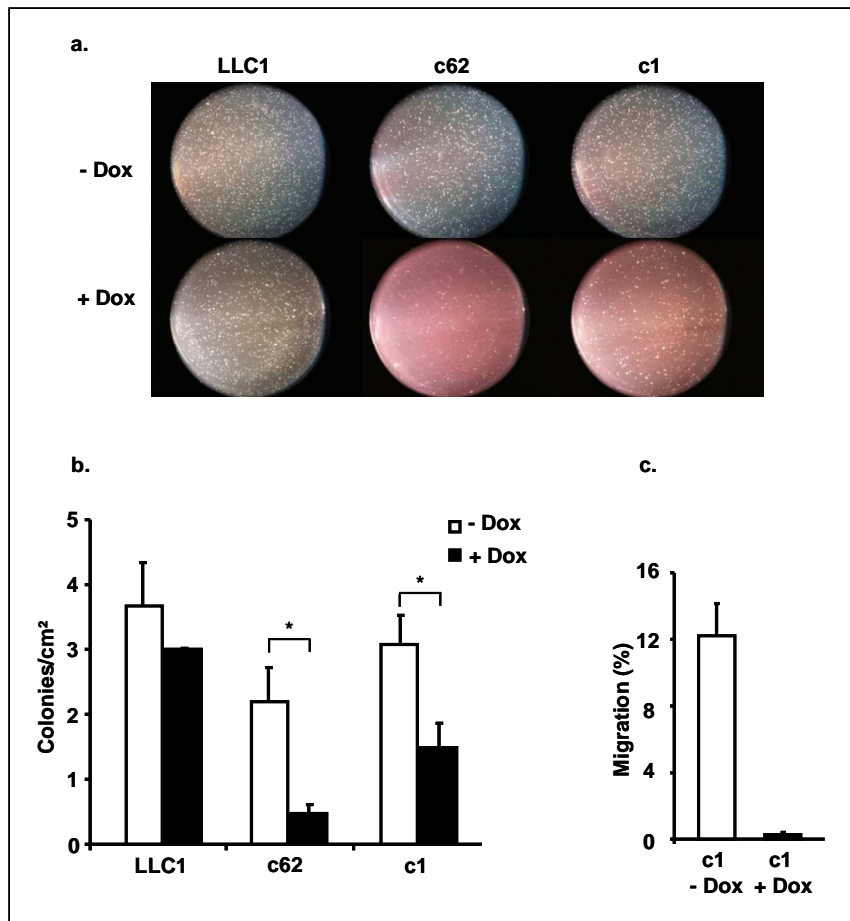


Figure 22 : L'induction de la surexpression par la doxycycline réduit fortement la formation de colonies en conditions indépendantes de l'ancrage et la migration.

a., b. Les LLC1, c1 et c62 ont étéensemencées à faible densité (500 cellules/cm²) dans 0,45 % d'agar et cultivées en absence (- Dox) ou en présence de 2 µg/ml de doxycycline (+ Dox), après 6 jours les puits ont été photographiés (**a.**) et le nombre moyen de colonies a été évalué (**b.**), * $p < 0,05$. **c.** Les cellules ont étéensemencées (5×10^4) sur des membranes poreuses et cultivées en absence (- Dox) ou en présence de 2 µg/ml de doxycycline (+ Dox) pendant 24 h, le pourcentage de cellules ayant migré a été évalué.

B. Effet de la stimulation par la doxycycline *in vivo*

1. L'induction par la doxycycline retarde la croissance tumorale

Dans un deuxième temps, l'effet de l'induction de la surexpression de la VE-statine par la doxycycline a été évalué *in vivo*. Pour cela, nous avons établi un modèle de tumorigenèse chez des souris syngéniques immunocompétentes (C57BL/6) en leur implantant les cellules LLC1 et c1 par voie sous-cutanée. L'induction par la doxycycline et des taux d'expression de la VE-statine élevés sont associés à un retard de croissance tumorale des cellules du clone c1. En effet, les LLC1 (expression faible) atteignent le volume tumoral de 400 mm³ en 13 jours ; le clone c1 non induit (- Dox, expression moyenne) en 20 jours et le clone c1 induit (+ Dox, expression forte) en 24 jours. La différence de croissance entre les tumeurs c1 non induites et induites est observé à partir de 18 jours (**Figure 23**).

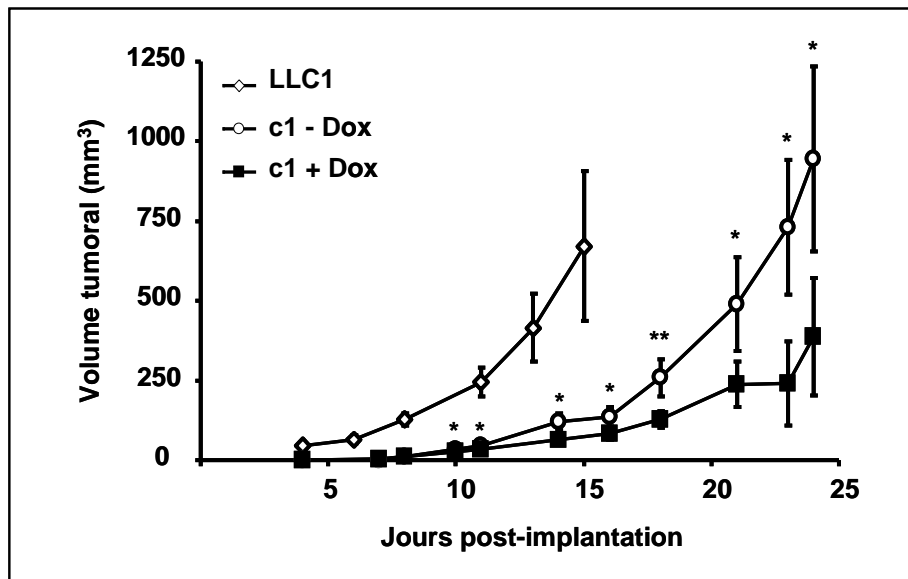


Figure 23 : L'induction de la surexpression de la VE-statine par la doxycycline ralentit la croissance tumorale chez les souris.

Les LLC1 et c1 ont été injectées ($1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$) par voie sous cutanée au niveau du flanc des souris C57BL/6. De l'eau normale (LLC1, c1 - Dox) ou contenant 0,5 mg/ml de doxycycline (c1 + Dox) a été distribuée aux souris. Les tumeurs ont été mesurées régulièrement. Les astérisques représentent les différences significatives entre les volumes de la condition c1 - Dox et c1 + Dox, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Afin de vérifier si la VE-statine est bien surexprimée dans notre modèle *in vivo*, nous avons prélevé les tumeurs à différents temps après implantation et analysé l'expression de la VE-statine par Western blot et par RT-PCR quantitative. Au début du développement tumoral (jours 10 et 14), aucune induction d'expression de la VE-statine chez les souris traitées à la doxycycline n'est détectée au niveau protéique. Cependant, à des temps plus avancés (jours 18, 21 et 24), une augmentation des taux protéiques est observée dans les tumeurs c1 + Dox par rapport aux tumeurs c1 - Dox (**Figure 24a.**), correspondant au moment où les croissances tumorales diffèrent (**Figure 23**). L'expression basale de la VE-statine-HA en absence de doxycycline confirme la fuite d'expression du système *in vivo* (**Figure 24a.**). De manière surprenante, l'évaluation des taux d'ARNm par RT-PCR quantitative ne permet pas de retrouver cette différence d'expression, mis à part à J21 (**Figure 24b.**).

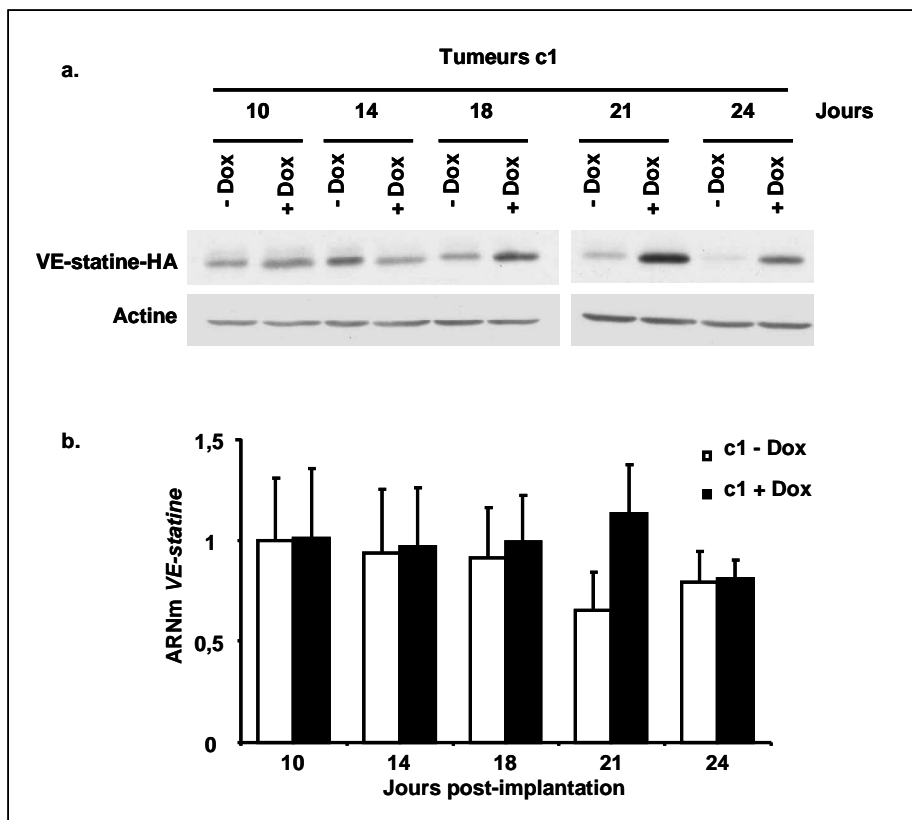


Figure 24 : Vérification de la surexpression de la VE-statine dans les tumeurs induites à la doxycycline. Les tumeurs c1 ont été prélevées à différents temps après injection des cellules tumorales chez la souris. Les taux protéiques de VE-statine ont été évalués par un Western blot anti-HA (a., dépôt de 25 µg d'extrait protéique) et les taux d'ARNm par RT-PCR quantitative (b.).

2. Analyse de l'angiogenèse tumorale

La VE-statine est une protéine exprimée spécifiquement par les cellules endothéliales en conditions physiologiques et elle est impliquée dans la formation des vaisseaux normaux [Soncin *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2004; Nichol *et al.*, 2010]. L'une des hypothèses pouvant expliquer la différence de croissance tumorale observé dans notre modèle murin est une modification de l'angiogenèse tumorale par la surexpression de la VE-statine. Celle-ci a donc été évaluée par un marquage de la protéine CD31/PECAM exprimée majoritairement par les cellules endothéliales. La microdensité vasculaire a été analysée dans les zones fortement vascularisées, appelées *hot-spots* angiogéniques. Les vaisseaux sanguins semblent plus nombreux et plus courts dans les tumeurs c1 + Dox (**Figure 25a.**). Cependant, l'évaluation du marquage CD31 (**Figure 25b.**) et de la taille des vaisseaux CD31⁺ (**Figure 25c.**) par un logiciel d'analyse d'image ne permet pas d'observer de différences significatives. Cela s'explique soit par une absence effective de différence, soit par un nombre d'échantillons trop faible par groupe qui ne permet pas de distinguer des variations statistiquement différentes.

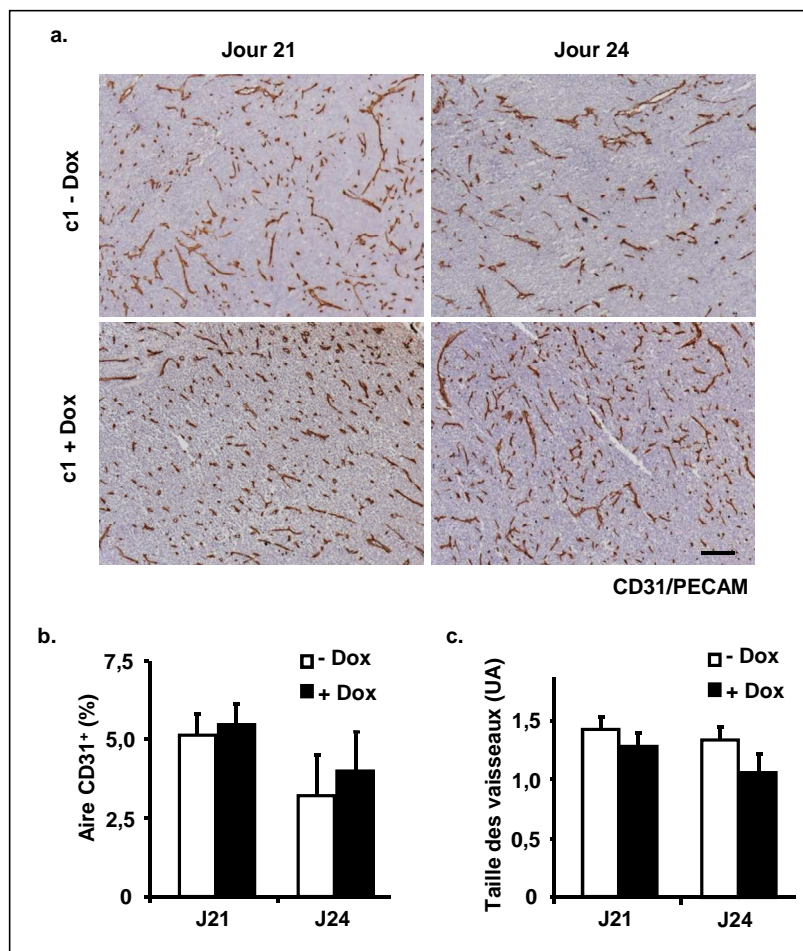


Figure 25 : Effet de la surexpression de la VE-statine sur l'angiogenèse tumorale.

Les vaisseaux des tumeurs c1 induites (+ Dox) et non induites (- Dox) ont été visualisés par un immunomarquage CD31/PECAM et les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline. **a.** Les *hot-spots* angiogéniques ont été photographiés, la barre représente 100 μ m. **b.**, **c.** L'aire du marquage CD31⁺ (**b.**) et la taille moyenne des vaisseaux (**c.**) ont été quantifiées avec un logiciel d'analyse d'images.

Aussi, afin d'obtenir des données sur des groupes plus importants, nous avons été amenés à répéter cette expérience de tumorigenèse *in vivo*, mais nous avons alors été confrontés à des problèmes de reproductibilité.

3. Problèmes de reproductibilité *in vivo*

La première étude de tumorigenèse du clone c1 chez la souris suggère un effet anti-tumoral de la VE-statine. Cependant, nous n'avons pas pu répéter ces résultats. En effet, dans une des expériences suivantes, le traitement à la doxycycline induit une faible surexpression de la protéine. Cela a pour conséquence une plus petite différence de croissance entre les tumeurs c1 - Dox et c1 + Dox que dans l'expérience précitée (**Figure 26a.**). Dans une autre étude, la présence de doxycycline n'induit pas de production de VE-statine et aucune différence de croissance tumorale n'est observée. Cette perte d'induction est également observée avec le clone c62 *in vivo* (**Figure 26b.**).

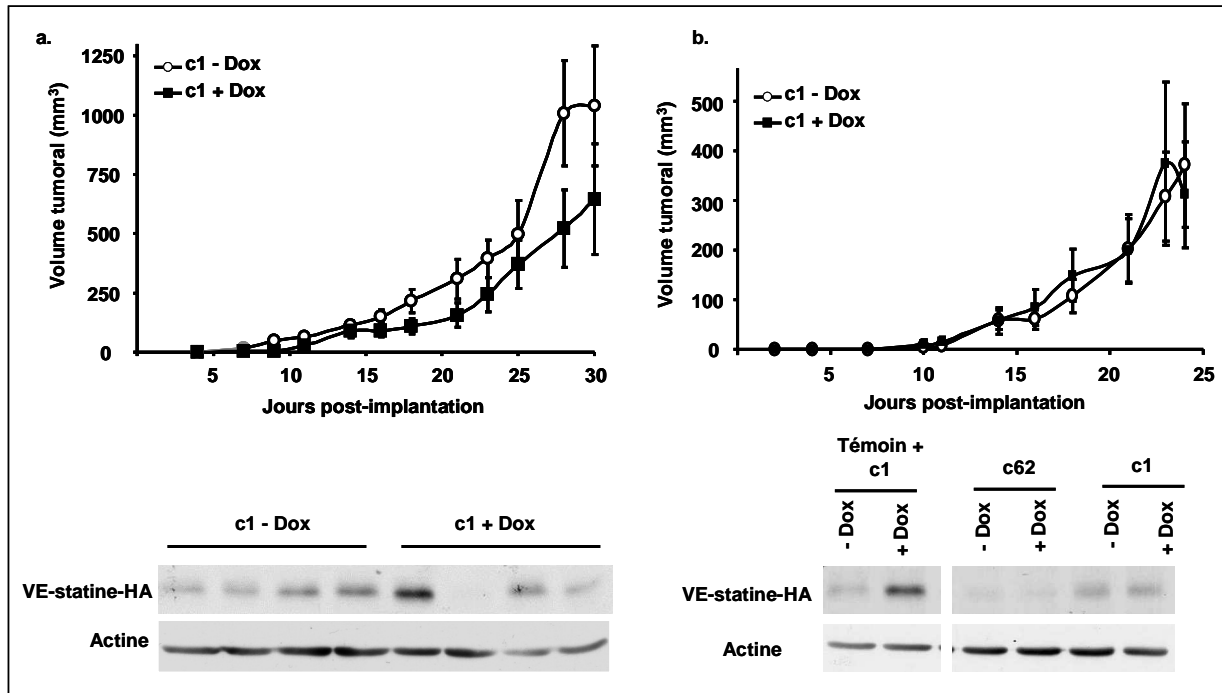


Figure 26 : Problèmes de reproductibilité *in vivo*.

a., b. Les cellules c1 et c62 ont été injectées ($1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$) par voie sous cutanée au niveau du flanc des souris C57BL/6. De l'eau normale (c1 - Dox) ou contenant 0,5 mg/ml de doxycycline (c1 + Dox) a été distribuée aux souris. Les tumeurs ont été mesurées régulièrement (**a., b. haut**). Les tumeurs ont été prélevées 30 jours (**a.**) ou 24 jours (**b.**) après l'injection et les taux protéiques de VE-statine ont été évalués par Western blot anti-HA (**a. bas**, dépôt de 50 μg d'extrait protéique, **b. bas**, dépôt de 30 μg d'extrait protéique). **b. bas** Des extraits protéiques issus de tumeurs c1 - Dox et c1 + Dox ayant une grande différence de croissance *in vivo* lors de l'expérience précédente ont servi de témoin positif d'induction.

Ces problèmes de reproductibilité nous empêchant d'avancer dans la compréhension du rôle de la VE-statine dans la tumorigenèse *in vivo*, nous avons alors été rapidement contraints de changer de stratégie de surexpression.

II. Etude de l'effet de la VE-statine surexprimée par infection virale sur la tumorigenèse

La seconde approche que nous avons développée a été la surexpression de la VE-statine par infection virale, permettant ainsi de travailler sur une population globalement infectée, et non pas sur une population clonale. Comme précédemment, nous avons surexprimé la protéine murine dans les cellules LLC1. Nous avons également utilisé la lignée cancéreuse murine 4T1, issue d'un carcinome mammaire, décrite dans la bibliographie comme étant fortement métastatique.

A. Surexpression de la VE-statine par un système d'infection virale

L'ADNc de la VE-statine murine de pleine longueur, avec une étiquette HA, a été inséré dans le plasmide pMSCV qui a permis la production de virus lorsqu'il a été transfecté dans des cellules encapsidatrices HEK-GP. Nous avons alors obtenu des populations contrôle, infectées par les virus

contrôle (4T1-Ctrl et LLC1-Ctrl) et des populations infectées par les virus codant la VE-statine (4T1-VE et LLC1-VE).

Les taux d'ARNm *VE-statine* des cellules 4T1-Ctrl et 4T1-VE ont été quantifiés par RT-PCR quantitative et comparés à l'expression retrouvée dans la lignée LLC1 et dans les cellules fibroblastiques et endothéliales murines. Cette analyse montre tout d'abord que le taux d'ARNm est 2 fois moins élevé dans les 4T1-Ctrl que celui des LLC1 non infectées. Cependant, tout comme pour les LLC1, cette expression basale se situe entre celles des lignées fibroblastiques et des lignées endothéliales. D'autre part, l'approche de surexpression de la VE-statine par infection virale permet d'obtenir un taux très important d'ARNm *VE-statine* dans les cellules 4T1-VE : 850 fois plus élevé que celui des cellules 4T1-Ctrl et 11 fois plus élevé que celui des cellules endothéliales qui l'expriment le plus, les MS1 (**Figure 27a.**). Par ailleurs, nous avons également vérifié la surexpression de la protéine par les 4T1-VE et les LLC1-VE par Western blot (**Figure 27b.**).

L'infection des cellules 4T1 et LLC1 par les virus codant la VE-statine permet donc bien la surexpression de notre protéine d'intérêt. Le taux d'ARNm *VE-statine* des cellules 4T1-VE se rapproche de celui exprimé physiologiquement par les cellules endothéliales. Le niveau de surexpression de la VE-statine obtenue par infection virale apparaît donc satisfaisant pour étudier l'effet de la VE-statine sur la tumorigénèse.

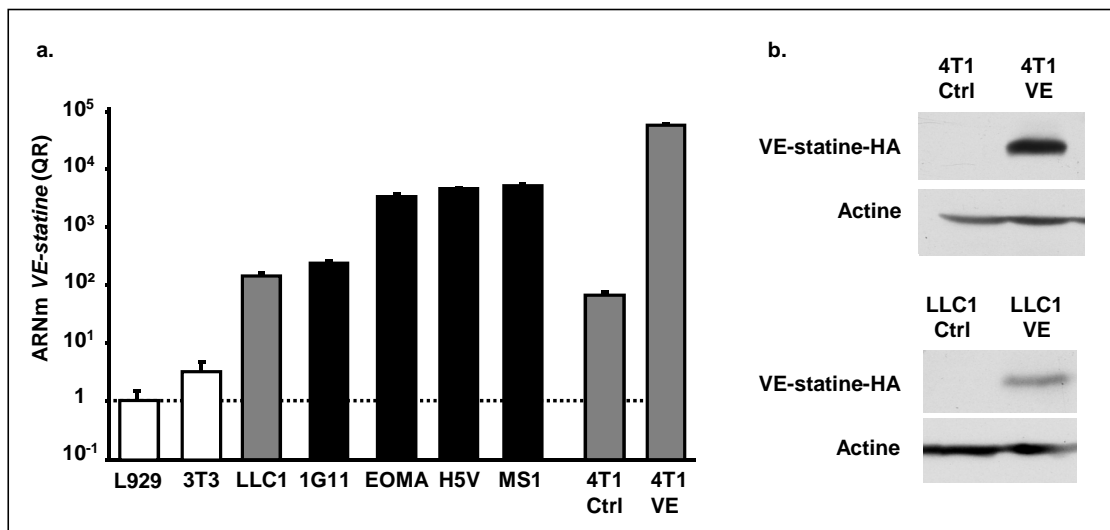


Figure 27 : Surexpression de la VE-statine par un système d'infection virale.

a. Les taux d'expression de *VE-statine* par la lignée 4T1 infectée avec des virus contrôle (4T1-Ctrl) ou des virus codant pour la VE-statine (4T1-VE) ont été quantifiés par RT-PCR quantitative et comparés aux taux retrouvés dans les lignées murines fibroblastiques (L929, 3T3), endothéliales (1G11, EOMA, H5V, MS1) et dans la lignée tumorale LLC1, tels que présentés en Figure 19. **b.** Les cellules 4T1 et LLC1 ont été infectées avec des virus contrôle (4T1-Ctrl, LLC1-Ctrl) ou des virus codant pour la VE-statine (4T1-VE, LLC1-VE) et la surexpression de la VE-statine a été vérifiée par Western blot anti-HA.

B. Caractérisation des lignées 4T1 et LLC1 infectées *in vitro*

L'effet de surexpression de la VE-statine a tout d'abord été étudié *in vitro*. Les propriétés de prolifération, de migration et de formation de colonies en conditions indépendantes de l'ancrage ne sont pas modifiées entre les cellules Ctrl et VE, dans les deux types cellulaires testés (Figure 28).

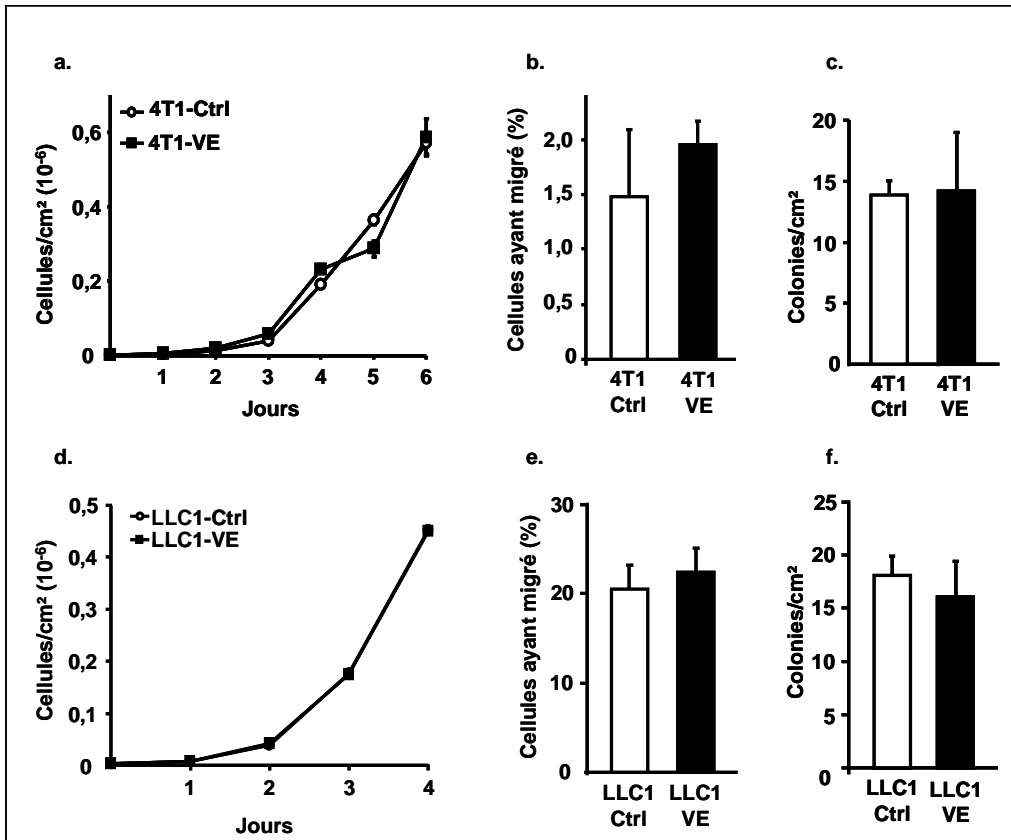


Figure 28 : La surexpression virale de VE-statine n'a pas d'effet sur la croissance sur plastique, la migration et la croissance en conditions indépendantes de l'ancrage *in vitro*.

a., d. Les cellules infectées 4T1 et LLC1 contrôle (-Ctrl) ou surexprimant la VE-statine (-VE) ont été ensemencées à 1250 cellules/cm² (a., 4T1) ou à 2500 cellules/cm² (d., LLC1) et comptées quotidiennement. b., e. Les cellules ont été ensemencées (5x10⁴) sur des membranes poreuses et cultivées pendant 24 h, le pourcentage de cellules ayant migrées a été évalué. c., f. Les cellules ont été ensemencées à faible densité (250 cellules/cm²) dans 0,45 % d'agar, après 10 jours de culture pour les LLC1 et 14 jours pour les 4T1, le nombre moyen de colonies par cm² a été compté.

D'après les résultats obtenus *in vitro*, les caractéristiques intrinsèques des cellules cancéreuses surexprimant la VE-statine ne sont pas modifiées, contrairement à ce qui a été observé avec les clones inductibles c1 et c62. Afin de multiplier les modèles pour s'affranchir d'un éventuel effet du type cellulaire ou du fond génétique, nous avons étudié ces cellules dans deux modèles de tumorigénèse *in vivo*, un modèle orthotopique et un hétérotopique, dans deux souches de souris différentes.

C. Effet de la surexpression de la VE-statine sur la tumorigénèse *in vivo*

1. Augmentation de la croissance tumorale

Nous avons tout d'abord établi un modèle de tumorigénèse orthotopique. La lignée cancéreuse mammaire 4T1 a été injectée au niveau de la glande mammaire des souris syngéniques et immunocompétentes Balb/c. La surexpression de la VE-statine accélère la croissance tumorale. Les tumeurs 4T1-VE atteignent le volume de $680 \pm 170 \text{ mm}^3$, 27 jours après l'implantation, un volume plus de 2 fois plus élevé que celui des tumeurs 4T1-Ctrl ($300 \pm 80 \text{ mm}^3$) (**Figure 29a.**). Le poids des tumeurs 4T1-VE ($1,6 \pm 0,2 \text{ g}$) est, par conséquent, doublé par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl ($0,8 \pm 0,2 \text{ g}$) à 27 jours post-implantation (**Figure 29b.**).

Afin de vérifier la surexpression de la VE-statine par les cellules 4T1-VE *in vivo*, le taux d'ARNm *VE-statine* a été analysé par RT-PCR quantitative. Il est augmenté de 175 ± 80 fois dans les tumeurs 4T1-VE par rapport aux 4T1-Ctrl (**Figure 29c.**). La surexpression de la VE-statine par les tumeurs 4T1-VE a également été confirmée par Western blot et par immunohistochimie (**Figure 29d., e.**).

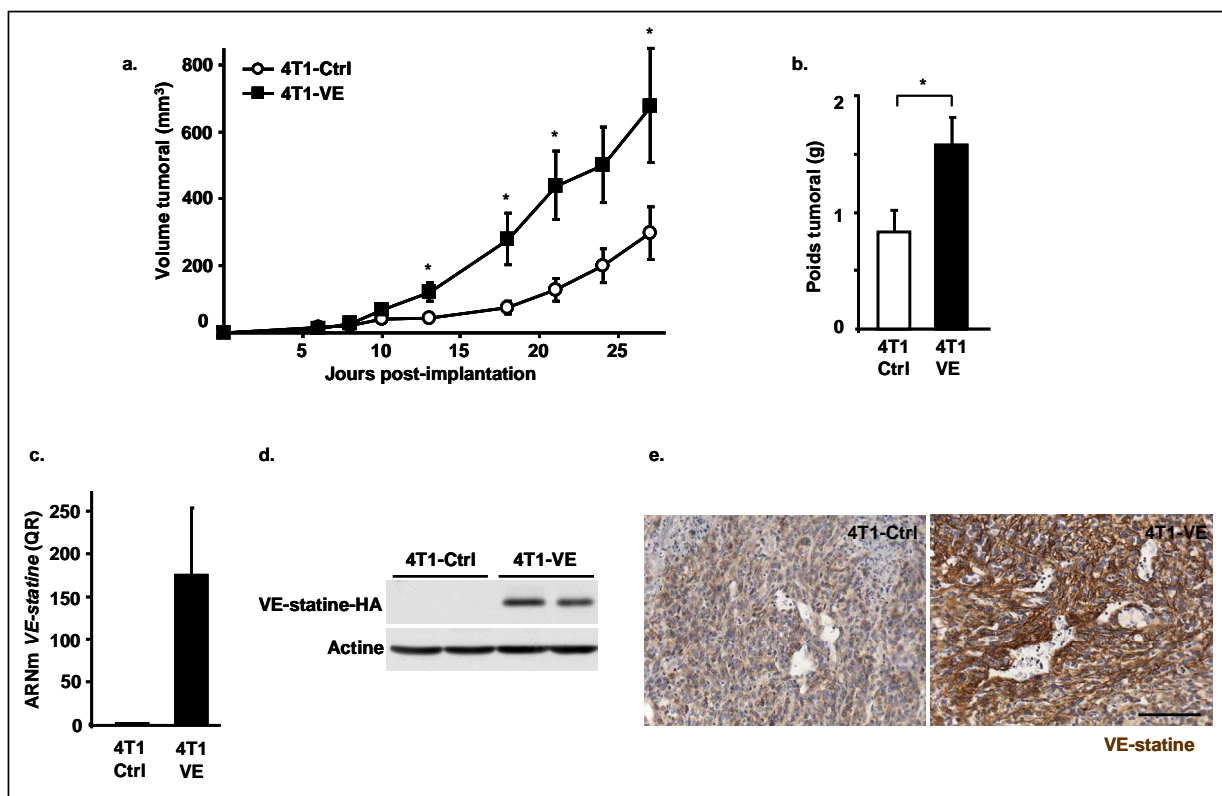


Figure 29 : La surexpression de la VE-statine par les 4T1 augmente la croissance tumorale.

Les 4T1-Ctrl et 4T1-VE ont été injectées ($5 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$, 7 animaux par groupe) dans la glande mammaire de souris Balb/c. **a.** Les tumeurs ont été mesurées régulièrement, * $p < 0,05$. **b.** Après sacrifice, les tumeurs ont été prélevées et pesées, * $p < 0,05$. La surexpression de la VE-statine dans les tumeurs a été vérifiée par RT-PCR quantitative (**c.**), par Western blot anti-HA (**d.**, dépôt de $75 \mu\text{g}$ d'extrait protéique) et par immunomarquage de la VE-statine murine contre-coloré à l'hématoxyline (**e.**), la barre représente $100 \mu\text{m}$. Ces données sont représentatives de 5 expériences effectuées dans des conditions similaires.

Cet effet pro-tumoral a été confirmé dans un modèle de tumorigenèse hétérotopique *in vivo*. Pour cela, les cellules tumorales pulmonaires LLC1-Ctrl et LLC1-VE ont été implantées par voie sous-cutanée chez des souris syngéniques et immunocompétentes C57BL/6. Après 25 jours de croissance, les tumeurs LLC1-VE atteignent le volume moyen de 2370 +/- 540 mm³ et un poids de 4,6 +/- 0,7 g tandis que le volume est de 1340 +/- 230 mm³ pour les tumeurs LLC1-Ctrl et le poids de 3,1 +/- 0,6 g (**Figure 30a., b.**). Une analyse par RT-PCR quantitative montre une augmentation de 130 +/- 35 fois de la quantité d'ARNm *VE-statine* dans les tumeurs LLC1-VE par rapport aux LLC1-Ctrl (**Figure 30c.**). Notons que cette augmentation est du même ordre de grandeur que celle retrouvée dans les cellules 4T1. La surexpression de la VE-statine est également confirmée par Western blot (**Figure 30d.**).

La surexpression de la VE-statine augmente donc aussi la croissance tumorale dans ce modèle de tumorigenèse, même si la différence de croissance est moins importante que celle des 4T1.

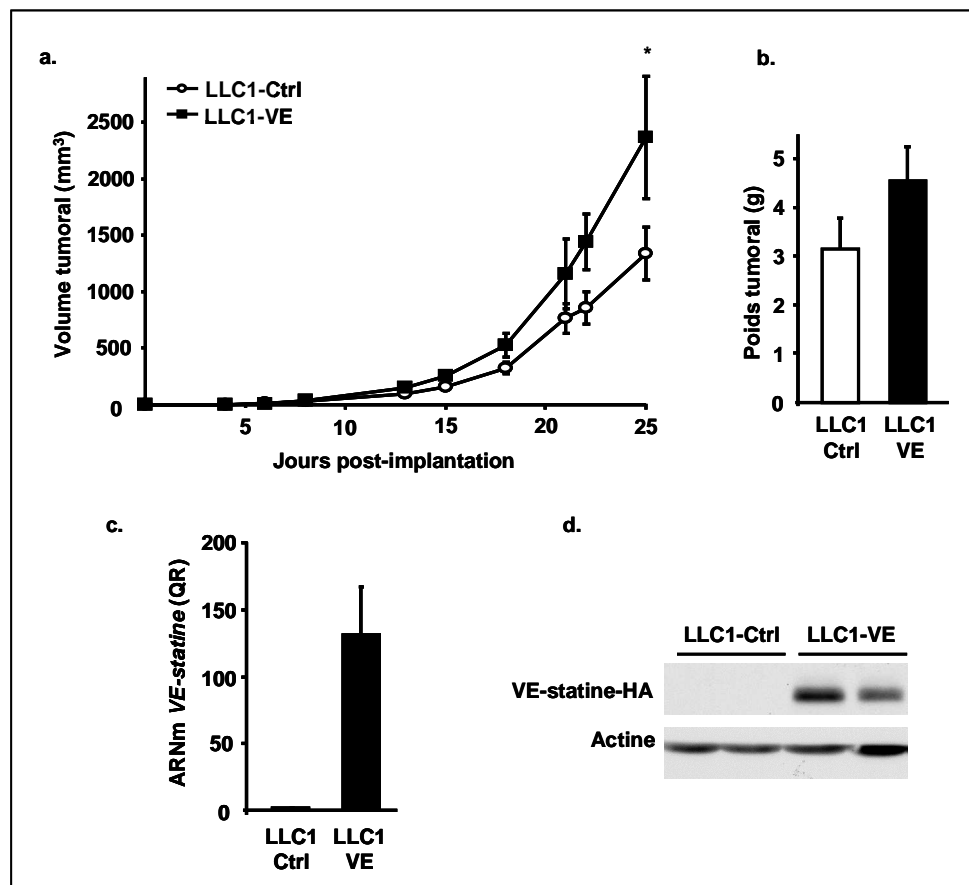


Figure 30 : Confirmation de l'effet pro-tumoral de la surexpression de la VE-statine avec le modèle LLC1 en sous-cutané.

Les LLC1-Ctrl et -VE ont été injectées ($5 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$, 7 animaux par groupe) par voie sous-cutanée au niveau du flanc de souris C57BL/6. **a.** Les tumeurs ont été mesurées régulièrement, * $p < 0,05$. **b.** Après sacrifice, les tumeurs ont été prélevées et pesées. **c., d.** La surexpression de la VE-statine dans les tumeurs a été vérifiée par RT-PCR quantitative (**c.**) et par Western blot anti-HA (**d.**, dépôt de 75 μg d'extrait). Ces données sont représentatives de 3 expériences effectuées dans des conditions similaires.

2. Validation de l'approche de surexpression de la VE-statine

L'effet pro-tumoral de la surexpression de la VE-statine a ainsi été observé dans deux modèles de développement tumoral utilisant des lignées tumorales et des souches de souris

différentes. Il a également été retrouvé dans toutes les expériences de tumorigenèse que nous avons effectuées : l'effet pro-tumoral de la VE-statine est donc très reproductible avec le système de surexpression rétroviral utilisé.

De plus, ces résultats sont compatibles avec les observations faites dans les tumeurs humaines. En effet, dans les hépatocarcinomes, les gliomes et les tumeurs colorectales, une forte expression de VE-statine est associée avec un haut grade tumoral, un fort taux métastatique et un mauvais pronostic [Díaz *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010].

Après plusieurs mois d'utilisation, il semble donc que cette approche soit plus solide et plus cohérente que le système inductible précédemment utilisé.

Des études sur le micro-ARN miR-126, porté par le gène *VE-statine*, ont montré son implication dans les processus d'angiogenèse [Wang *et al.*, 2008] et de tumorigenèse [Otsubo *et al.*, 2011]. Nous avons voulu nous voir si la surexpression de la VE-statine modifiait la production de miR-126. En effet, une variation de sa production aurait pu biaiser l'analyse des effets de la surexpression de la VE-statine. La séquence codant pour le miR-126 est situé dans une partie intronique du gène *VE-statine*. Par conséquent, l'insertion de l'ADNc (sans introns) de la VE-statine dans le pMSCV ne permet pas la production du miR. Cependant, la régulation de l'expression des micro-ARN étant mal connue, il n'était pas à exclure que la surexpression de la VE-statine modifie la production du miR-126. L'analyse par RT-PCR montre que les taux de miR-126 (miR-126-3p et son complémentaire miR-126-5p) sont similaires entre les tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE (**Figure 31**). La surexpression de VE-statine ne modifie donc pas la production de miR-126, par conséquent, les effets observés sont induits spécifiquement par la VE-statine, et non par miR-126.

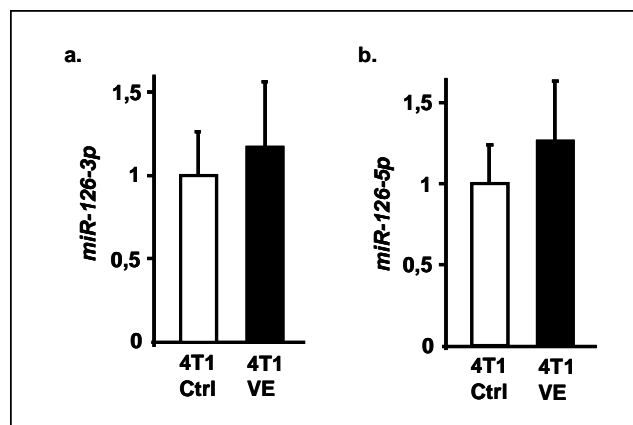


Figure 31 : La surexpression de la VE-statine ne modifie pas les taux de miR-126 -3p et -5p.

Les micro-ARN ont été extraits et des RT spécifiques des miR-126-3p et miR-126-5p ont été effectuées. Les taux de miR-126 -3p (a.) et -5p (b.) ont été évalués par RT-PCR quantitative et normalisés à l'actine.

Ces observations nous ont amenés à valider la stratégie de surexpression de la VE-statine par infection virale et la suite des analyses s'est appuyée sur cette approche.

3. Augmentation de l'invasion métastatique

Nous avons étudié l'effet de la surexpression de la VE-statine sur le développement des métastases. L'un des sites fréquents d'implantation des métastases pour la lignée 4T1 est le poumon. Les souris portant des tumeurs 4T1-VE développent plus de métastases pulmonaires que les souris portant des tumeurs 4T1-Ctrl. Le nombre moyen de métastases à la surface des poumons est de 5,8 +/- 3,2 pour les cellules 4T1-VE contre 1,6 +/- 0,5 pour les cellules 4T1-Ctrl (**Figure 32a., b.**). Le nombre de métastases compté sur des coupes de poumons marquées à l'hématoxyline/éosine confirme ce résultat (**Figure 32c., d.**).

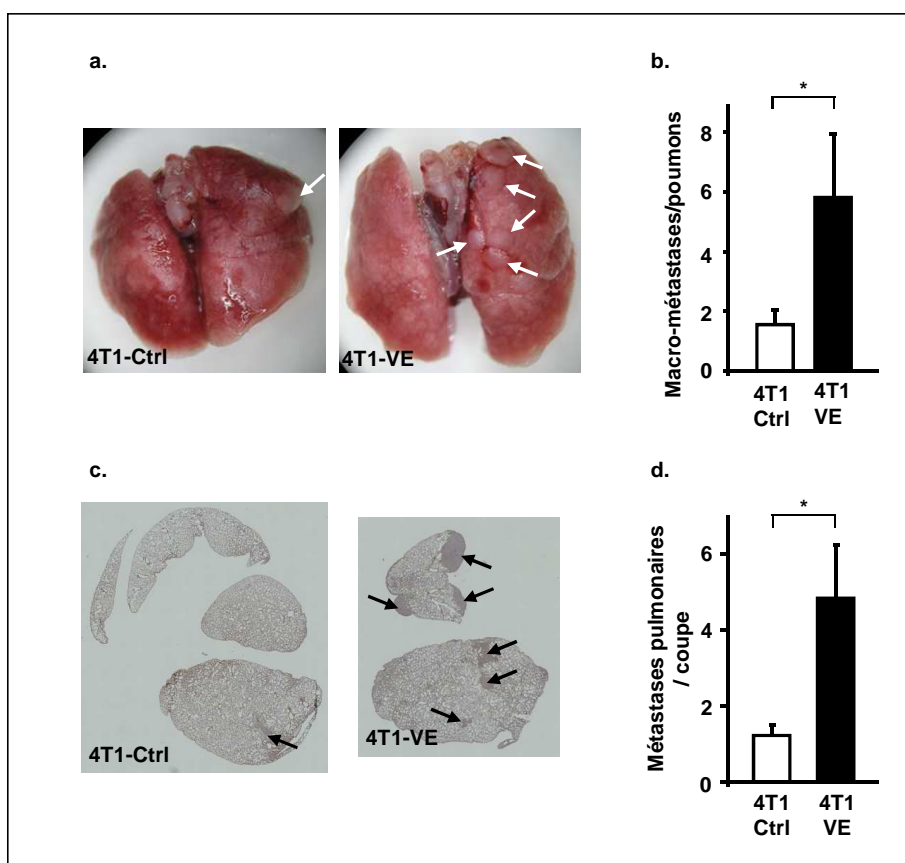


Figure 32 : La surexpression de la VE-statine par les 4T1 augmente le nombre de métastases pulmonaires.

a. Les poumons des souris portant des tumeurs 4T1-Ctrl ou 4T1-VE ont été prélevés et photographiés, les flèches blanches indiquent les macro-métastases. b. Le nombre moyen de macro-métastases à la surface des poumons a été calculé pour chaque groupe. c. Des coupes de poumons ont été colorées à l'hématoxyline/éosine, les flèches noires indiquent les métastases. d. Le nombre de métastases par coupe a été évalué, * $p < 0,05$. Ces données sont représentatives de 5 expériences effectuées dans des conditions similaires.

Avec le modèle LLC1, la détection des métastases est plus difficile car leur nombre est plus faible. Dans les études de la dissémination métastatique décrites dans la littérature, le protocole expérimental est différent de celui que nous avons utilisé : les LLC1 sont majoritairement injectées au niveau du coussinet de la patte des souris et les tumeurs sont réséquées lorsqu'elles ont atteint un certain volume afin que les métastases se développent [Hembrough *et al.*, 2003; Mazzone *et al.*, 2009]. Nous n'avons pas développé cette approche.

Nous avons analysé l'effet de la VE-statine sur le développement tumoral précoce. Les tumeurs ont été prélevées lorsqu'elles ont atteint la taille de petites masses palpables (5 à 20 mm³), c'est à dire 4 jours après injection pour les LLC1 et 6 jours pour les 4T1. D'après l'analyse histologique, les contours des tumeurs Ctrl sont bien délimités, la masse tumorale se distingue aisément des tissus l'entourant (la peau et le péritoine). Dans les tumeurs surexprimant la VE-statine, de nombreuses vésicules sont présentes et elles sont majoritairement situées au bord de la tumeur. De plus, les tissus péri-tumoraux semblent avoir été envahis (**Figure 33a.**). Les vésicules sont vraisemblablement des gouttelettes lipidiques : en effet, elles ressemblent aux vésicules lipidiques identifiées dans une étude précédente par un marquage de la protéine de surface des gouttelettes lipidiques, la périlipine (**Figure 33b.**). Environ trois quarts des tumeurs 4T1-VE et LLC1-VE possèdent des vésicules lipidiques intratumorales contre environ un tiers des tumeurs 4T1-Ctrl et LLC1-Ctrl (**Figure 33c.**). La présence de vésicules lipidiques est associée à un phénotype invasif accru [Erlor *et al.*, 2006], ce qui suggère un effet pro-invasif de la VE-statine.

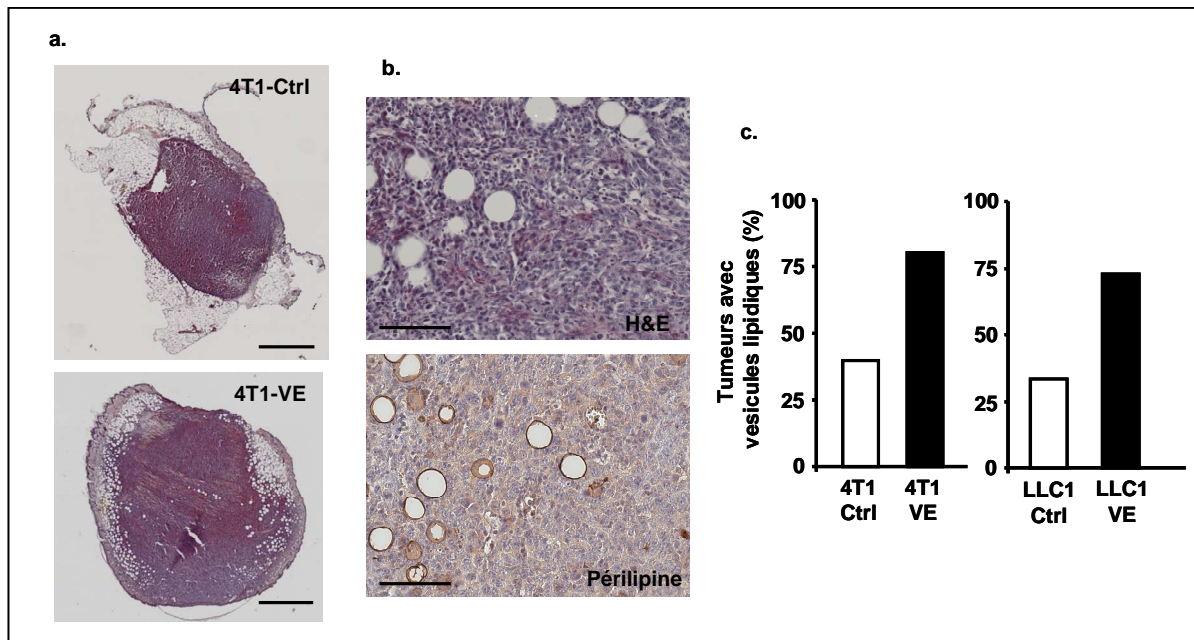


Figure 33 : La surexpression de la VE-statine augmente la présence de vésicules lipidiques dans les tumeurs précoces.

Les LLC1 et les 4T1, -Ctrl et -VE, ont été injectées ($5 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$) respectivement par voie sous cutanée au niveau du flanc de souris C57BL/6 et dans la glande mammaire de souris Balb/c. Les tumeurs LLC1 ont été prélevées 4 jours après injection et les 4T1 6 jours après. **a.** Coloration des coupes de tumeurs 4T1 à l'hématoxyline/éosine, la barre représente 1 mm. **b.** Identification des vésicules observées en hématoxyline/éosine (**haut**, tumeur 4T1-VE) comme étant des vésicules lipidiques grâce à un marquage de la périlipine (**bas**, marron, tumeur LLC1 c1), la barre représente 100 μm . **c.** Quantification du pourcentage de tumeurs 4T1 et LLC1 contenant des vésicules lipidiques.

Ces deux approches expérimentales suggèrent donc que la surexpression de la VE-statine augmente l'invasion des cellules tumorales et la formation de métastases.

4. Caractérisation des tumeurs

Afin de comprendre les mécanismes qui sont à l'origine de l'effet pro-tumoral de la VE-statine, nous avons étudié les différentes caractéristiques des tumeurs, en termes de prolifération cellulaire, de mort cellulaire et d'angiogenèse tumorale.

a) Etude de la prolifération et de la mort cellulaires

Tout d'abord, nous avons voulu savoir si l'augmentation de la croissance tumorale en présence de VE-statine était due à une augmentation de la prolifération des cellules ou à une diminution de la mort cellulaire.

La prolifération cellulaire a été évaluée par un immunomarquage de la protéine nucléaire Ki67, marqueur des cellules en prolifération. Le marquage Ki67 ne varie pas entre les groupes surexprimant ou non la VE-statine (**Figure 34a., b.**).

Nous avons étudié la mort par nécrose et par apoptose. Les zones nécrotiques ont été identifiées par un marquage hématoxyline/éosine et quantifiées. L'aire nécrotique des tumeurs 4T1-VE est significativement supérieure à celle des tumeurs 4T1-Ctrl, alors qu'aucune variation statistiquement différente n'est observée entre les tumeurs LLC1-Ctrl et LLC1-VE (**Figure 34c, d.**). Concernant la mort par apoptose, deux approches ont été utilisées. La première a été un marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL, suivi d'une observation des cellules marquées par microscopie. Cette technique permet de détecter la fragmentation de l'ADN résultant du processus apoptotique. Son inconvénient majeur est cependant un marquage aspécifique des cellules nécrotiques possédant un haut niveau de fragmentation de l'ADN. Nous avons par conséquent effectué l'analyse des cellules apoptotiques dans les zones non nécrotiques. Très peu de cellules y sont marquées et la proportion de cellules TUNEL⁺ est identique entre les tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE (**Figure 34e.**). La deuxième approche utilisée a été la quantification des taux de caspase 3 clivée par Western blot. En effet, cette protéase à cystéine, participant au processus apoptotique, est activée spécifiquement dans les cellules apoptotiques par clivage [Schlegel *et al.*, 1996]. Comme avec la technique TUNEL, aucune différence significative n'est observée entre les tumeurs 4T1 surexprimant ou non la VE-statine (**Figure 34e.**).

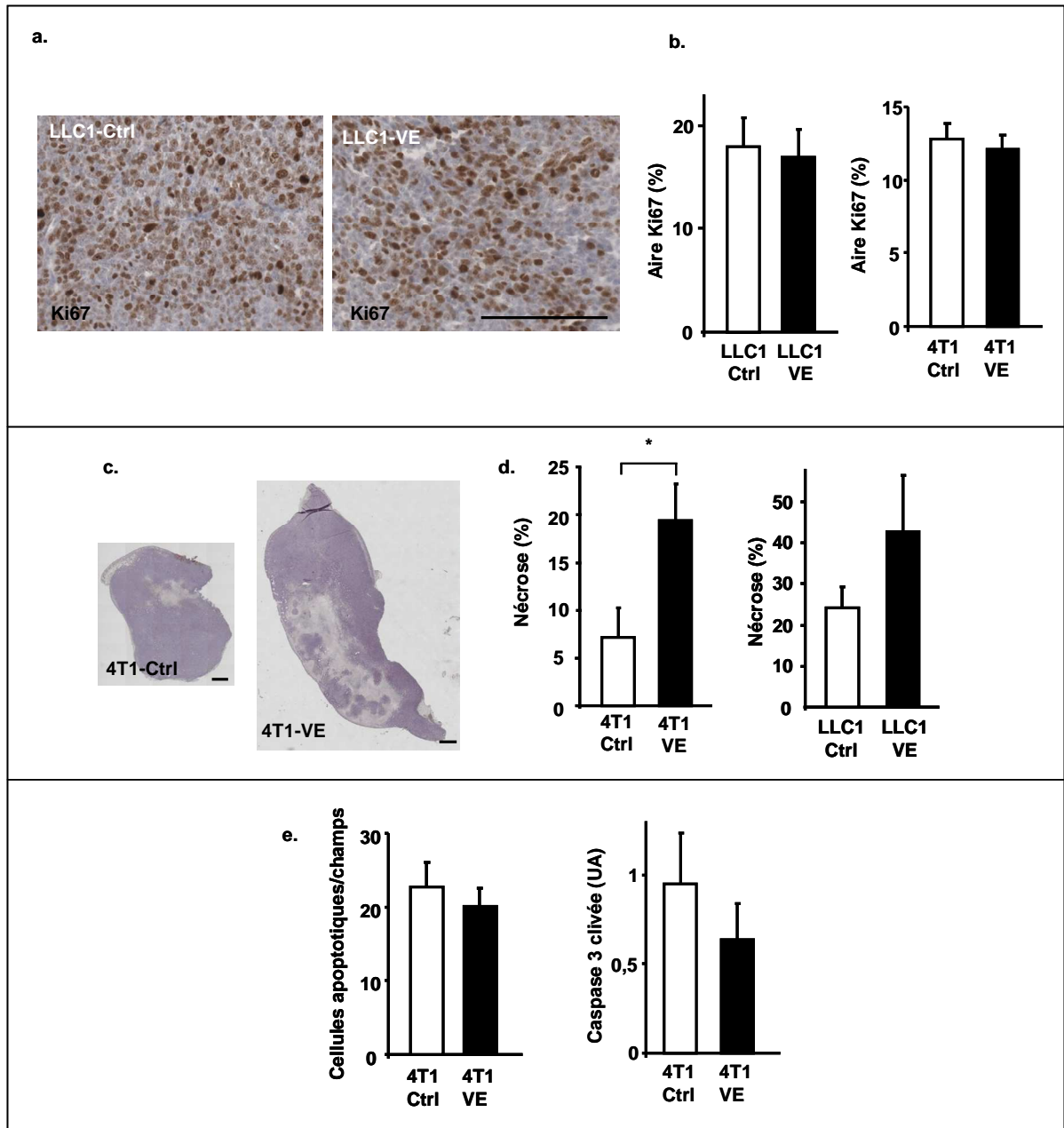


Figure 34 : Effets de la surexpression de la VE-statine sur la prolifération et la mort cellulaires.

a. Les cellules en prolifération ont été visualisées par immunomarquage Ki67 (marron), les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline, la barre représente 100 μ m. **b.** L'index de prolifération des tumeurs LLC1 (**gauche**) et 4T1 (**droite**) a été quantifié par un logiciel d'analyse d'image. **c.** Les coupes de tumeurs ont été colorées à l'hématoxyline/éosine et les zones grises, non marquées, ont été identifiées comme étant des zones nécrotiques, la barre représente 1 mm. **d.** Le pourcentage moyen de nécrose dans les tumeurs 4T1 (**gauche**) et LLC1 (**droite**) a été calculé pour chaque groupe, * $p < 0,05$. **e.** L'apoptose a été évaluée par comptage des cellules apoptotiques après un marquage TUNEL (**gauche**) et par quantification des niveaux de caspase3 clivée par Western blot (**droite**).

Ces résultats de prolifération et de mort cellulaires n'expliquent donc pas la différence de croissance observée. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'angiogenèse tumorale.

b) Etude des vaisseaux intra-tumoraux

Comme lors de l'étude de l'effet de la production de VE-statine par un système inductible sur la tumorigénèse, nous avons émis l'hypothèse que la différence de croissance entre les tumeurs surexprimant ou non la VE-statine pouvait être dû à une modification de l'angiogenèse tumorale. Nous avons donc étudié la vascularisation des tumeurs. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'aspect quantitatif des vaisseaux sanguins, mais également lymphatiques. Puis dans un deuxième temps, les vaisseaux sanguins ont été étudiés d'un point de vue qualitatif.

(1) Quantification des vaisseaux

Les vaisseaux sanguins ont été visualisés par un immunomarquage CD31 (**Figure 35a.**). La microdensité vasculaire des zones fortement vascularisées (*hot-spots* angiogéniques) est significativement plus élevée dans les tumeurs 4T1-VE (22,5 +/- 1,0 %) que dans les tumeurs 4T1-Ctrl (19,0 +/- 1,3 %). Aucune différence significative n'est observée entre les tumeurs LLC1-Ctrl et LLC1-VE (**Figure 35b.**).

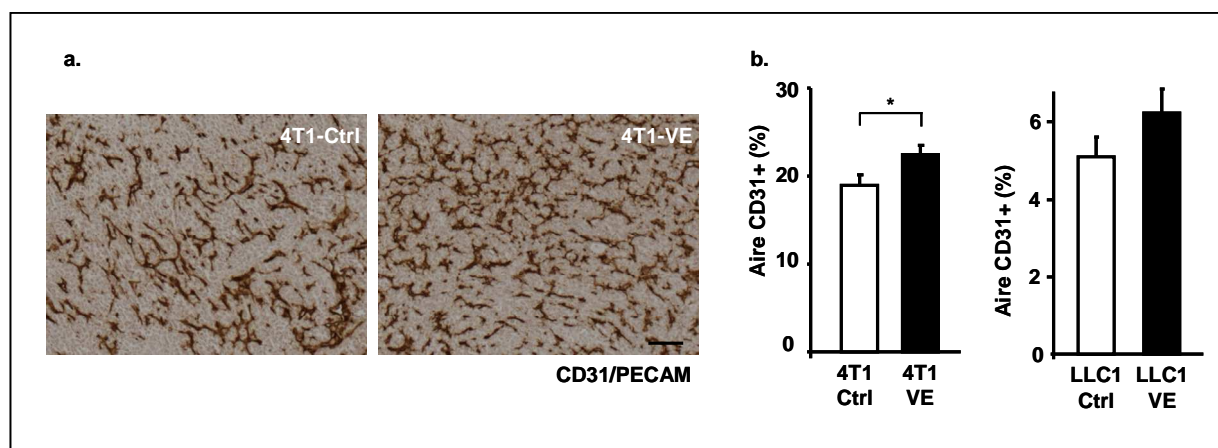


Figure 35 : La surexpression de la VE-statine augmente la microdensité vasculaire des tumeurs 4T1.

Les vaisseaux sanguins ont été visualisés par un marquage CD31/PECAM (marron) suivi d'une contre-coloration à l'hématoxyline. **a.** Les zones hautement vascularisées des tumeurs 4T1 ont été photographiées, la barre représente 100 μ m. **b.** Le marquage CD31 a été quantifié dans les zones hautement vascularisées des tumeurs 4T1 (**gauche**) et LLC1 (**droite**) par un logiciel d'analyse d'image, * $p < 0,05$. Ces données sont représentatives de 2 expériences effectuées dans des conditions similaires.

A l'heure actuelle, aucun rôle de la VE-statine dans la lymphangiogenèse n'a été décrit. Cependant, nous avons voulu savoir si la surexpression de la VE-statine avait un impact sur la vascularisation lymphatique. Nous avons donc effectué un marquage du récepteur VEGFR3, exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques. La majorité des vaisseaux lymphatiques VEGFR3⁺, de type capillaire, est retrouvée à la périphérie des tumeurs, au niveau de la peau (**Figure 36a.**), cependant certains sont présents au sein de la masse tumorale (**Figure 36b.**). La proportion de vaisseaux lymphatiques par rapport à l'aire tumorale est la même entre les tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE (**Figure 36c.**).

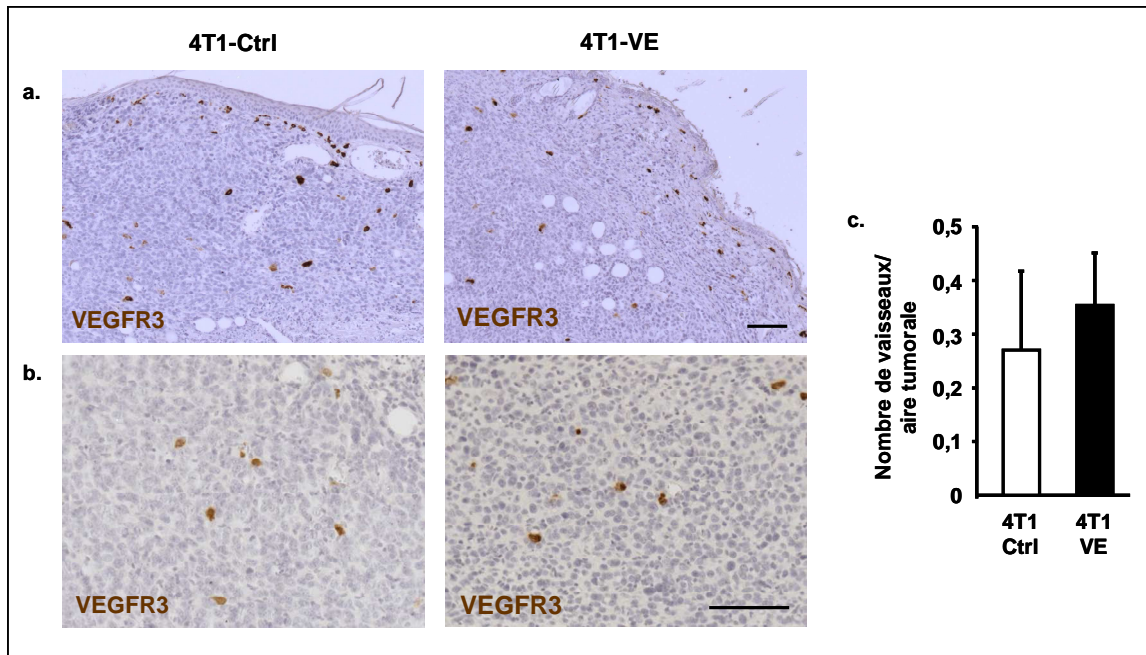


Figure 36 : La surexpression de la VE-statine ne modifie pas le nombre de vaisseaux VEGFR3⁺.

Les vaisseaux lymphatiques ont été visualisés par un marquage VEGFR3 (marron), les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline. **a.**, **b.** La majorité des vaisseaux VEGFR3⁺ est retrouvée à la périphérie des tumeurs (**a.**), cependant certains sont présents au sein de la masse tumorale (**b.**). Les barres représentent 100 μ m. **c.** Le nombre de vaisseaux VEGFR3⁺ a été compté et rapporté à la surface tumorale non nécrotique.

En conclusion de ce point, seule une augmentation modeste du nombre des vaisseaux sanguins est retrouvée dans les tumeurs 4T1-VE par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl. Nous avons alors cherché à savoir si la qualité de cette vascularisation était différente.

(2) Analyse qualitative des vaisseaux sanguins

L'une des étapes nécessaires à la maturation des vaisseaux sanguins est le dépôt de la membrane basale autour des vaisseaux. Nous avons visualisé l'un de ces composants, le collagène IV, par un marquage d'immunohistochimie. Ce marquage est diminué de moitié dans les tumeurs 4T1-VE par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl (**Figure 37**), ce qui suggère la présence de vaisseaux moins matures lorsque la VE-statine est surexprimée.

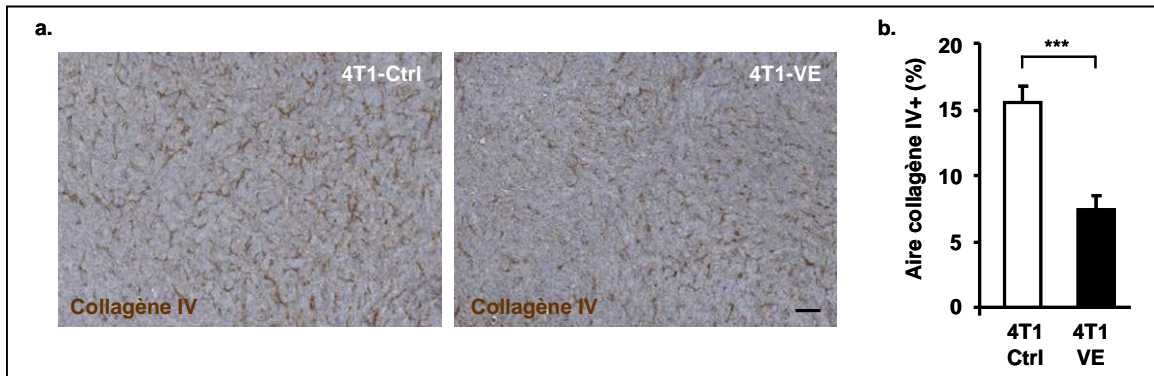


Figure 37 : La surexpression de la VE-statine diminue le marquage collagène IV.

a. Les coupes de tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE ont été marquées avec un anticorps anti-collagène IV (marron) et contre-colorées à l'hématoxyline, la barre représente 100 μ m. **b.** L'aire du marquage collagène IV⁺ a été évaluée par un logiciel d'analyse d'image, *** $p < 0,001$. Ces données sont représentatives de 2 expériences effectuées dans des conditions similaires.

D'autre part, la fonctionnalité des vaisseaux sanguins tumoraux est connue pour être affectée dans les tumeurs [Fukumura et Jain, 2007], c'est pourquoi nous avons étudié la perméabilité des vaisseaux sanguins et l'efficacité de la perfusion tumorale par un marquage de l'hypoxie intratumorale. Les tumeurs 4T1-VE possèdent plus de vaisseaux présentant des fuites (46,7 \pm 6,4 %) que les tumeurs Ctrl (25,3 \pm 5,8 %) (**Figure 38a., b.**). L'hypoxie intratumorale est également augmentée dans les tumeurs 4T1-VE, suggérant que la vascularisation des tumeurs 4T1-VE permet une alimentation moins efficace que celle des tumeurs 4T1-Ctrl.

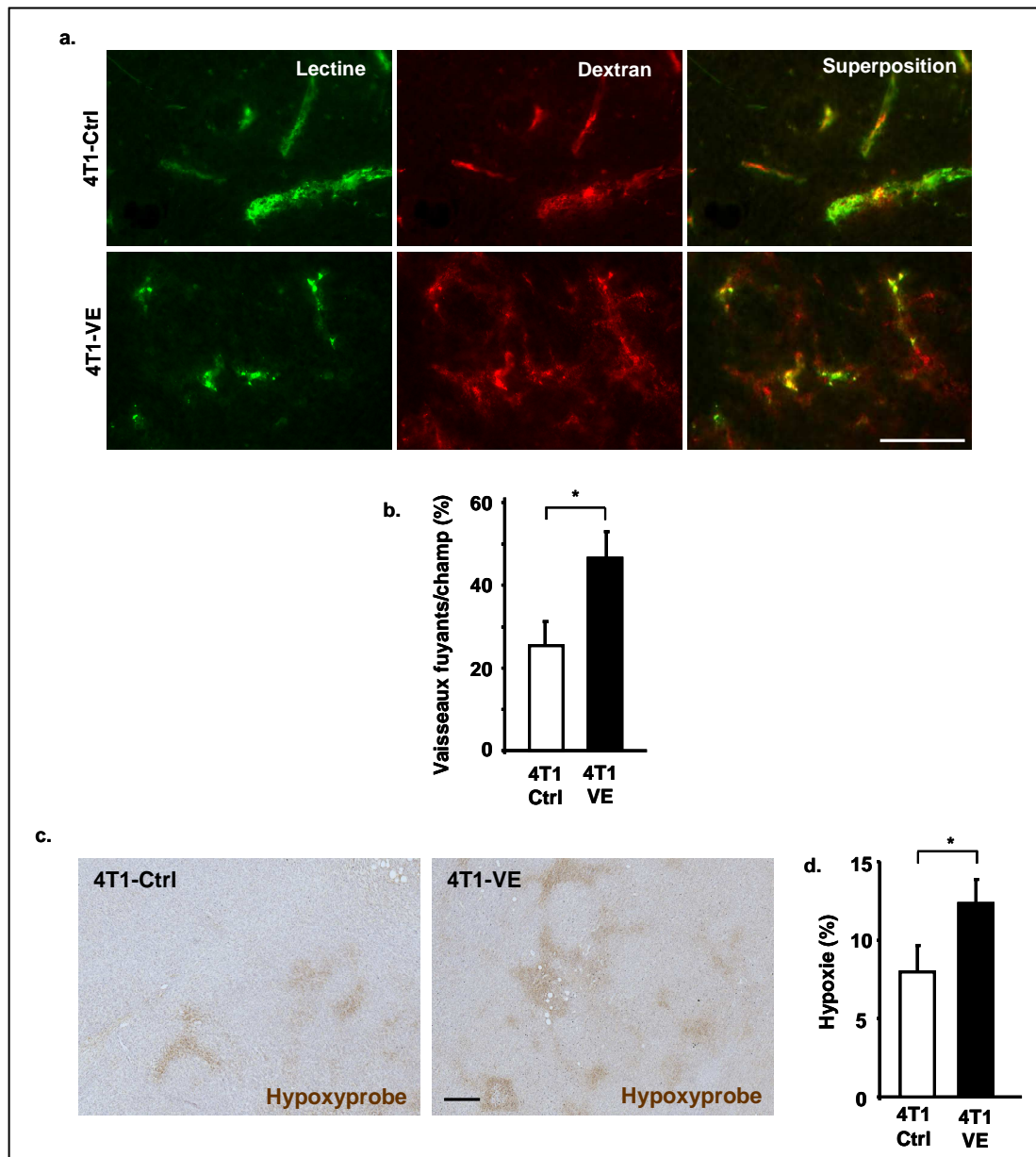


Figure 38 : La perméabilité des vaisseaux sanguins et l'hypoxie sont augmentées dans les tumeurs 4T1-VE.

a. Les souris ont été injectées avec de la lectine-FITC (vert) et du Dextran (70 kDa) couplé au Texas Red (rouge) avant le sacrifice. Les tumeurs ont été disséquées et analysées par microscopie à fluorescence. Les vaisseaux perfusés sont marqués en vert et le marquage rouge à l'extérieur des vaisseaux lectine⁺ indique les fuites vasculaires ; la barre représente 100 μ m. **b.** Le nombre de vaisseaux fuyants par rapport aux vaisseaux perfusés (Lectine⁺) a été quantifié, * $p < 0,05$. **c.**, **d.** L'hypoxie a été estimée par injection de pimonidazole (Hypoxyprobe) aux souris portant des tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE avant sacrifice, les zones hypoxiques ont été révélées par immunomarquage anti-Hypoxyprobe (**c.**) et ont été quantifiées dans les zones non nécrotiques par un logiciel d'analyse d'images, * $p < 0,05$ (**d.**).

Les différences observées au niveau des vaisseaux des tumeurs 4T1-VE, c'est-à-dire la légère augmentation de la microdensité vasculaire, l'augmentation des zones hypoxiques et l'augmentation de la perméabilité vasculaire, ne semblent pas pouvoir expliquer à elles seules une croissance tumorale deux fois plus rapide. De plus, aucune différence significative de microdensité vasculaire n'est observée pour les tumeurs LLC1.

Nous avons analysé la prolifération, la mort cellulaire et l'angiogenèse tumorale afin de comprendre par quels mécanismes la surexpression de la VE-statine permettait une augmentation de la croissance tumorale. Cependant, aucune différence majeure, pouvant expliquer le phénotype observé, n'a été trouvée. Nous avons alors décidé de faire une analyse plus large, ciblée sur l'angiogenèse, à l'aide de *PCR Arrays* et de *Protein Arrays*.

c) Etude par *PCR Arrays* et *Protein Arrays*

L'utilisation de deux *PCR Arrays* nous a permis d'analyser, par RT-PCR quantitative, l'expression de 141 gènes associés à l'angiogenèse, dont des gènes de facteurs de croissance, de cytokines, de chimiokines, de protéases et de leurs inhibiteurs. Nous avons choisi une tumeur 4T1 représentative de chacune des deux conditions et nous avons comparé leur profil d'expression génique.

L'expression du gène *VE-statine* a été analysée dans l'un des *PCR Arrays*. Le taux d'ARNm *VE-statine* est augmenté fortement (93 fois) dans la tumeur 4T1-VE par rapport à la tumeur 4T1-Ctrl (**Figure 39a.**). Ce résultat permet de confirmer le bon fonctionnement du *PCR Array*.

D'après l'analyse des *PCR Arrays*, l'expression de nombreux gènes est modulée d'au moins 2 fois. Nous avons cependant choisi de centrer notre attention sur les gènes présentant la plus forte variation d'expression dans la tumeur 4T1-VE par rapport à la tumeur 4T1-Ctrl.

L'expression du gène codant pour la protéase *MMP9* est augmentée de 18 fois dans la tumeur 4T1-VE par rapport à la tumeur 4T1-Ctrl. L'expression de *Chga* (*chromogranine A*) est diminuée de 27 fois. La protéine Chga est produite par les cellules endocrines et c'est un marqueur tissulaire et sérique des tumeurs neuroendocrines [Nobels *et al.*, 1997]. L'expression de trois gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires est également réprimée. En effet, les taux d'ARNm *CXCL5* et *IL-12b* sont réduits de 8 fois et le niveau d'ARNm *IFN γ* est fortement diminué (de 19 fois ou de 26 fois selon le *PCR Array* utilisé) (**Figure 39b., c.**).

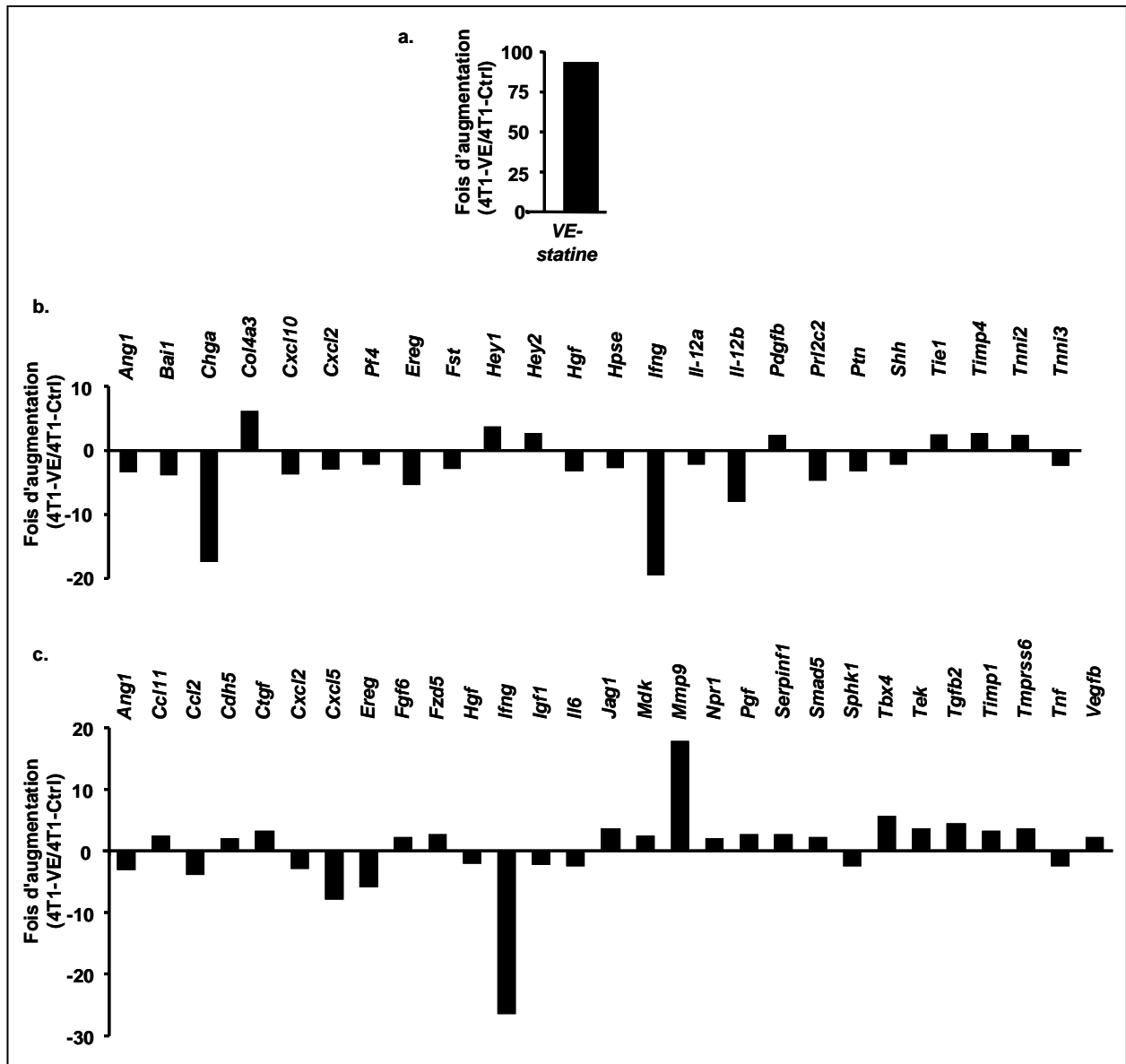


Figure 39 : Comparaison de l'expression de gènes intervenant dans l'angiogenèse d'une tumeur 4T1-VE par rapport à une tumeur 4T1-Ctrl.

L'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse a été analysée par RT-PCR avec les *PCR Arrays* : *Mouse Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis Inhibitors* (a., b.) et *Mouse Angiogenesis* (c.). Les histogrammes représentent la variation d'expression des gènes (en fois d'augmentation) d'une tumeur 4T1-VE par rapport à celle d'une tumeur 4T1-Ctrl, seules les variations supérieures à 2 fois sont représentées. Pour une meilleure visibilité, la variation de l'expression de la VE-statine (a.) n'a pas été représentée sur le même histogramme que les autres gènes analysés dans le même *PCR Array* (b.). Pour la signification des abréviations, se référer aux pages 23 à 26.

Cette analyse par *PCR Array* n'ayant comparé que 2 tumeurs entre elles, il a donc été nécessaire de confirmer ces résultats par RT-PCR quantitative sur un nombre plus grand d'échantillons.

Les variations de l'expression de *MMP9*, *Chga* et *CXCL5* entre les tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE ne sont pas retrouvées lors de l'analyse de l'expression de ces gènes sur un plus grand nombre de tumeurs (Figure 40a., b., c.). Cependant, l'expression de *IL-12b* et de *IFN γ* est fortement diminuée, respectivement de 75 % et de 96 %, dans un panel de tumeurs 4T1-VE par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl (Figure 40d., e.), confirmant la répression observée par *PCR Array*. L'expression du

gène *IFN γ* est diminuée de 62 % dans les tumeurs LLC1-VE par rapport aux tumeurs LLC1-Ctrl, même si cette diminution n'est pas aussi importante que celle observée dans les tumeurs 4T1 (**Figure 40e.**), cette observation confirme la validité du résultat précédemment observé.

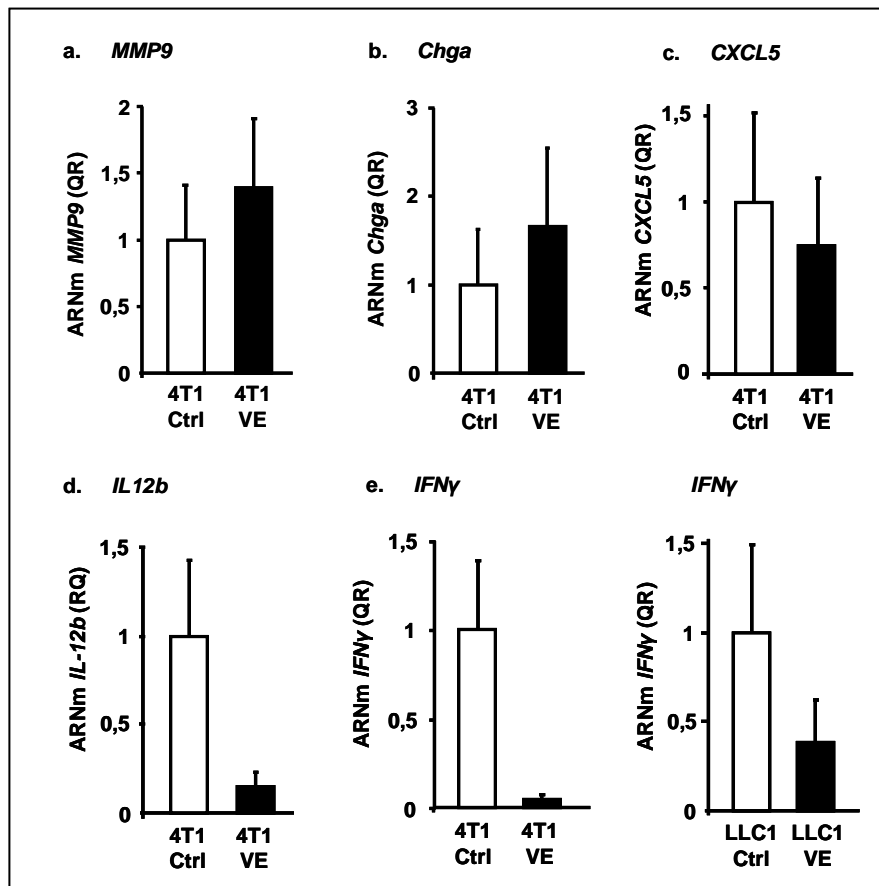


Figure 40 : Vérification des résultats de PCR Array sur des groupes de tumeurs.

Les taux d'ARNm *MMP9* (a.), *Chga* (b.), *CXCL5* (c.), *IL-12b* (d.) et *IFN γ* (e.) ont été quantifiés par RT-PCR quantitative dans les tumeurs 4T1 (a. - e.) et LLC1 (e.) surexprimant ou non la VE-statine.

L'analyse par *PCR Array* suivie d'une validation sur un plus grand échantillonnage nous a donc permis de montrer une forte répression de l'expression de deux cytokines pro-inflammatoires, l'*IFN γ* et l'*IL-12* dans les tumeurs surexprimant la VE-statine, deux molécules inhibitrices de l'angiogenèse [Sgadari *et al.*, 1996].

En parallèle des *PCR Arrays*, nous avons effectué un premier *Protein Array*, qui nous a permis d'analyser l'expression de 54 protéines impliquées dans l'angiogenèse. Comme précédemment, nous avons choisi une tumeur 4T1 représentative de chacune des deux conditions et nous avons comparé leur taux protéique. Sur les 54 protéines testées, 9 protéines sont réprimées plus de 2 fois dans la tumeur surexprimant la VE-statine par rapport à la tumeur contrôle. Parmi ces 9 protéines, celles qui ont un taux diminué de plus de 4 fois sont les cytokines IP-10 (gène cible de l'*IFN γ*), KC (*Keratinocyte-derived Chemokine*, *CXCL1*), MCP-1 et MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein 1 a*) (**Figure 41a.**).

Suite à ce résultat et à ceux des *PCR Arrays*, nous avons effectué un second *Protein Array* qui a permis d'analyser l'expression de 40 cytokines. Les 3 quarts de ces protéines sont réprimées d'au moins 2 fois dans la tumeur 4T1-VE. (**Figure 41b.**)

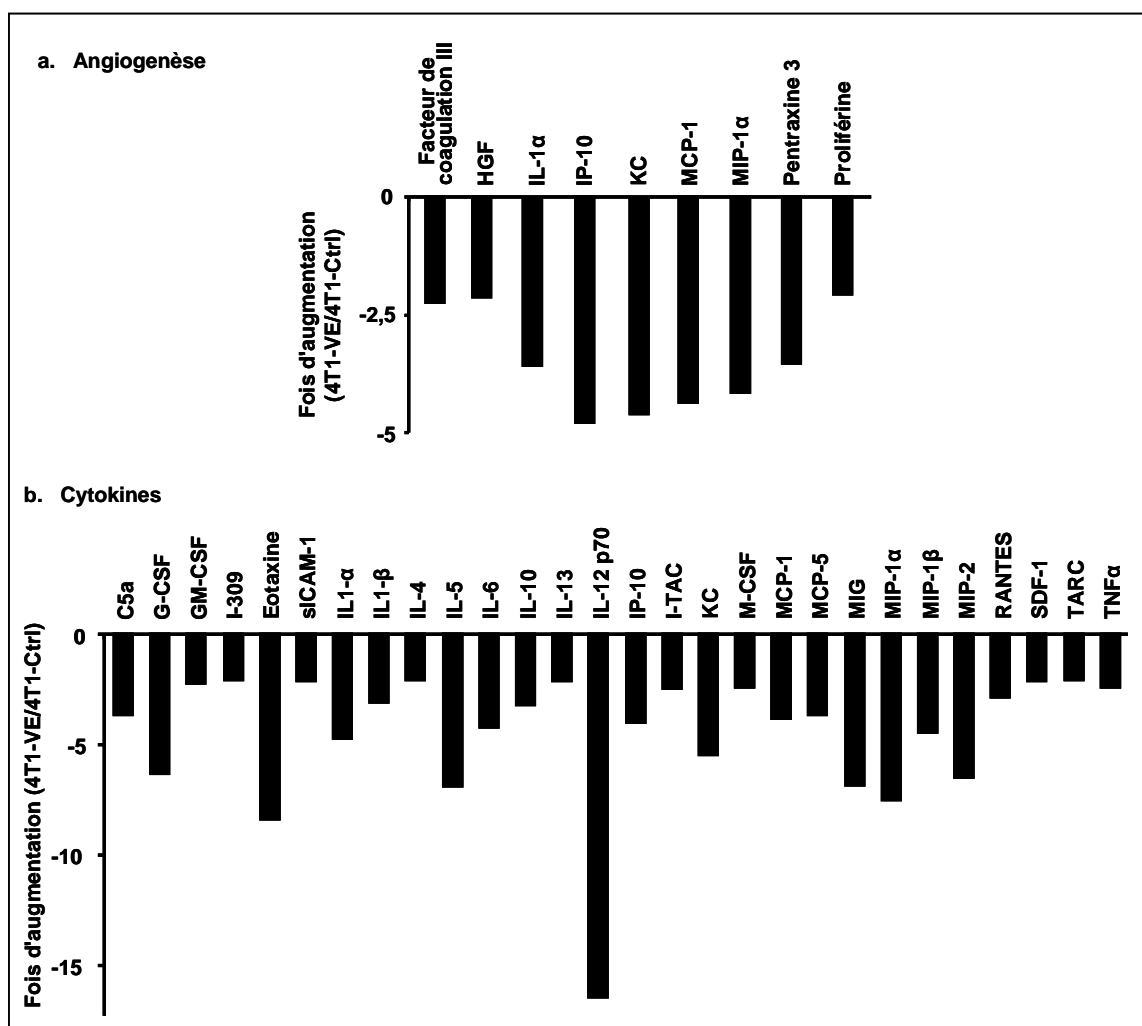


Figure 41 : Comparaison de la quantité de protéines intervenant dans l'angiogenèse et des cytokines d'une tumeur 4T1-VE par rapport à une tumeur 4T1-Ctrl.

a., b. La quantité des protéines impliquées dans l'angiogenèse (**a.**) et de cytokines (**b.**) a été analysée par *Protein Array*. Les histogrammes représentent la variation de la quantité de protéine (en fois d'augmentation) d'une tumeur 4T1-VE par rapport à celle d'une tumeur 4T1-Ctrl, seules les variations supérieures à 2 fois sont représentées. Pour la signification des abréviations, se référer aux pages 23 à 26.

Bien que ces résultats méritent d'être confirmés par l'analyse d'un plus grand nombre de tumeurs, il semble que la surexpression de la VE-statine induise une diminution des taux protéiques de nombreuses cytokines. De plus, l'expression des gènes de deux cytokines pro-inflammatoires, l'IFN γ et l'IL-12, est fortement inhibée dans les tumeurs surexprimant la VE-statine, par rapport aux tumeurs contrôle. Comme décrit dans l'introduction, le système immunitaire module la croissance tumorale et l'IFN γ est une molécule majeure de l'immunité tumorale [Shankaran *et al.*, 2001]. L'IL-12, dont l'une des deux sous-unités est codée par le gène *IL-12b*, y participe également en induisant entre autres la production d'IFN γ [Nastala *et al.*, 1994]. La diminution de ces cytokines dans les tumeurs surexprimant la VE-statine, associée à une croissance tumorale plus importante, suggère

donc une modulation de l'immunité anti-tumorale par la VE-statine. Nous avons alors analysé les populations de cellules immunitaires infiltrées dans les tumeurs surexprimant ou non la VE-statine.

5. Rôle de la VE-statine sur l'immunité anti-tumorale

a) Diminution du nombre de cellules immunitaires

Nous avons tout d'abord analysé les populations de cellules immunitaires infiltrées dans les tumeurs par une approche de RT-PCR quantitative. Cette technique permet, en effet, d'évaluer relativement aisément et rapidement l'expression de plusieurs de gènes des marqueurs des cellules immunitaires dans les tumeurs avant d'éventuellement effectuer une analyse plus complète.

Le taux d'ARNm *CD3ε* (marqueur global des lymphocytes T, LT) est fortement diminué dans les tumeurs 4T1 et LLC1 surexprimant la VE-statine, respectivement de 70 % et 57 %. L'expression des gènes *CD4* (marqueur des LT CD4), *CD8* (marqueur des LT CD8) et *CD94* (marqueur des *Natural Killers*, NK) est également fortement diminuée, respectivement de 59 %, 60 % et 64 % dans les tumeurs 4T1-VE par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl. Les marqueurs des macrophages (*EMR1* et *CD68*) et des lymphocytes B, LB, (*CD19*) ne varient pas (**Tableau 4**).

Ces résultats suggèrent une réduction du nombre de certaines populations de cellules immunitaires dans les tumeurs surexprimant la VE-statine. Cependant, ces dernières données sont davantage le reflet de l'expression des marqueurs, que celui du nombre de cellules les exprimant. C'est pourquoi il a été nécessaire de confirmer ces données par deux autres approches : l'immunohistochimie et la cytométrie en flux.

Cellules	Gène	4T1-Ctrl ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	4T1-VE ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	LLC1-Ctrl ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	LLC1-VE ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)
LT totaux	<i>CD3ε</i>	1,00 +/- 0,35	0,31 +/- 0,16	1,00 +/- 0,34	0,43 +/- 0,22
LT CD4	<i>CD4</i>	1,00 +/- 0,40	0,41 +/- 0,23		
LT CD8	<i>CD8</i>	1,00 +/- 0,36	0,40 +/- 0,21		
LB	<i>CD19</i>	1,00 +/- 0,57	0,67 +/- 0,35		
NK	<i>CD94</i>	1,00 +/- 0,42	0,36 +/- 0,18	1 +/- 0,67	0,61 +/- 0,50
Macrophages	<i>EMR1</i>	1,00 +/- 0,26	0,72 +/- 0,42		
	<i>CD68</i>	1,00 +/- 0,21	1,04 +/- 0,55		

Tableau 4 : Diminution du taux d'expression des marqueurs de certaines populations de cellules immunitaires dans les tumeurs surexprimant la VE-statine.

Analyse par RT-PCR quantitative des niveaux d'expression des gènes marqueurs de cellules immunitaires dans les tumeurs 4T1 et LLC1 contrôle (-Ctrl) ou surexprimant la VE-statine (-VE).

Nous avons d'abord porté notre attention sur les lymphocytes T totaux. L'analyse par immunohistochimie a permis de montrer une diminution importante (70 %) du nombre des lymphocytes T (cellules *CD3ε*⁺) détectés dans les tumeurs 4T1-VE par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl. De façon intéressante, alors que dans la condition 4T1-Ctrl, les cellules *CD3ε*⁺ sont situées dans le tissu tumoral, elles sont fréquemment observées à l'intérieur des vaisseaux sanguins des tumeurs 4T1-VE (**Figure 42a**).

Après observation des coupes de tumeurs marquées à l'hématoxyline/éosine à fort grossissement, nous avons également noté la présence de petites cellules nucléées, ressemblant à des cellules immunitaires, à l'intérieur des vaisseaux sanguins 4T1-VE. Dans les tumeurs 4T1-Ctrl, il y a peu ou pas de petites cellules nucléées dans les vaisseaux et le tissu tumoral apparaît plus granuleux que celui des tumeurs surexprimant la VE-statine (**Figure 42b.**).

Un co-marquage immunohistochimique CD31 et CD3ε montre que la quantité de LT CD3ε⁺ présents à côté de vaisseaux tumoraux, vraisemblablement infiltrés dans le tissu tumoral, est plus importante dans les tumeurs 4T1-Ctrl que dans les 4T1-VE (**Figure 42c.**). Notons qu'aucune cellule n'est observée dans la lumière des vaisseaux des cellules 4T1-VE, contrairement aux deux observations précédentes, probablement lié à une différence technique inhérente au protocole d'immunohistochimie. En effet, le co-marquage CD31/CD3ε a été effectué sur des coupes congelées et les cellules présentes dans la lumière des vaisseaux sanguins se décrochent très certainement des lames lors des lavages. Le marquage CD3ε et la coloration hématoxyline/éosine ont été effectuées sur des coupes paraffine, les cellules retrouvées au niveau des vaisseaux sanguins ont probablement été mieux fixées à la lame de verre et ont mieux résisté aux lavages successifs.

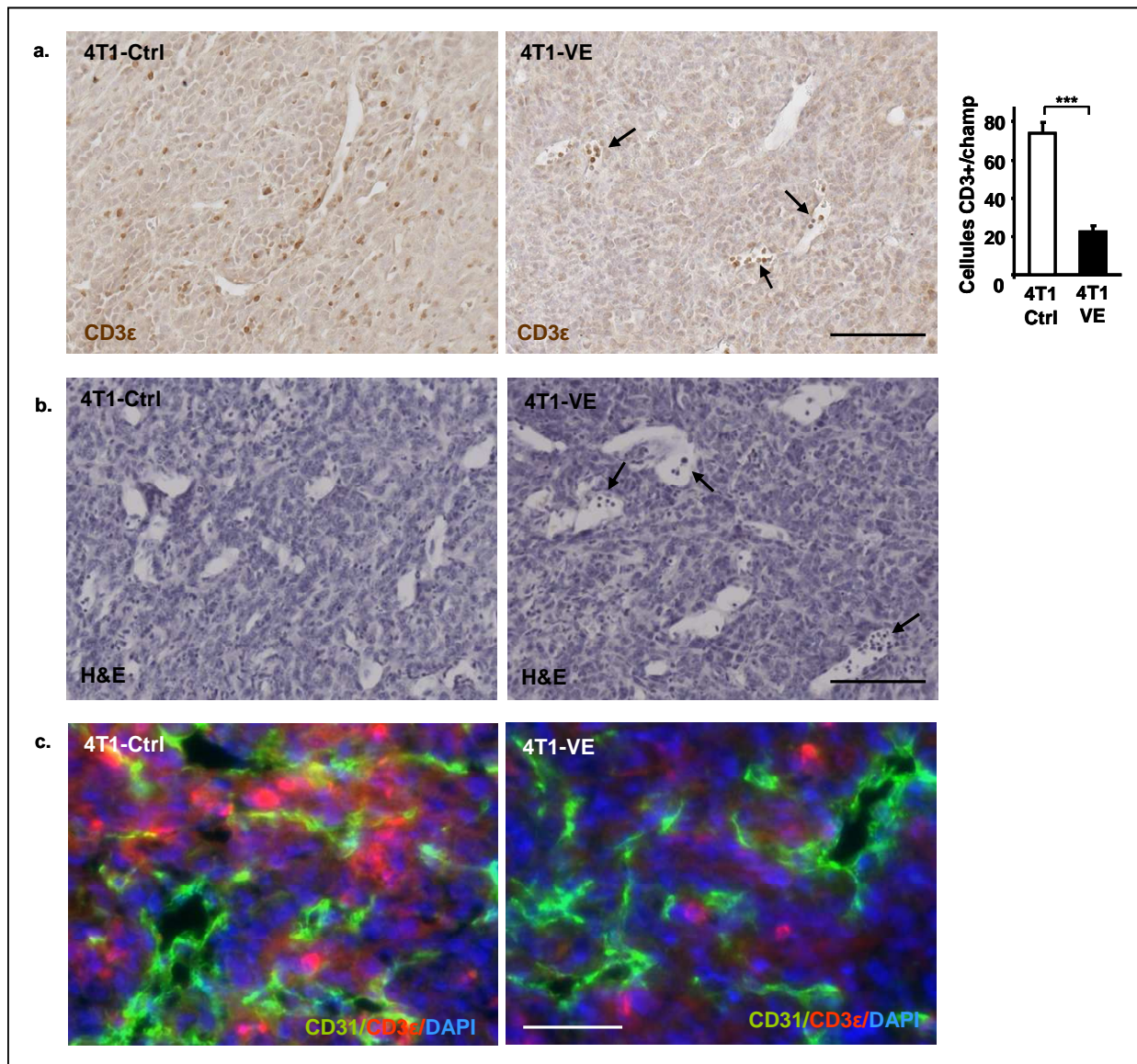


Figure 42 : Diminution de l'infiltration des lymphocytes T dans les tumeurs surexprimant la VE-statine et accumulation de petites cellules nucléées dans leurs vaisseaux.

a. Les lymphocytes T totaux ont été marqués à l'aide d'un anticorps anti-CD3ε (marron), la barre représente 100 μm, les LT sont présents à l'intérieur du tissu tumoral des tumeurs 4T1-Ctrl alors qu'ils sont majoritairement localisés dans la lumière des vaisseaux dans la condition 4T1-VE (flèches noires). A droite, les histogrammes représentent le nombre de cellules CD3ε⁺ infiltrées dans le tissu tumoral, *** $p < 0,001$, ces données sont représentatives de 2 expériences effectuées dans des conditions similaires. **b.** Les coupes de tumeurs ont été colorées à l'hématoxyline/éosine, il y a une accumulation de petites cellules nucléées dans la lumière des vaisseaux sanguins dans les tumeurs 4T1-VE (**droite**, flèches noires), ce qui n'est pas le cas des tumeurs 4T1-Ctrl (**gauche**), la barre représente 100 μm. **c.** Immunomarquage des vaisseaux sanguins (CD31, vert) et des lymphocytes T (CD3ε, rouge), les noyaux sont marqués au DAPI (bleu), la barre représente 50 μm.

L'infiltration des LT totaux est donc moins importante dans les tumeurs 4T1-VE par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl et les LT CD3ε⁺ sont fréquemment retrouvés dans la lumière des vaisseaux tumoraux 4T1-VE.

La population des LT CD3ε comprend des LT CD4 et des LT CD8. Nous avons vérifié si la présence de ces deux populations était modulée de manière identique dans les tumeurs 4T1-VE. D'après les marquages immunohistochimiques, le nombre de LT CD4 et LT CD8 est diminué dans les

tumeurs 4T1-VE respectivement de 42 % et de 45 % (**Figure 43b., c.**), la répression est donc similaire pour les deux types de populations de LT CD3ε.

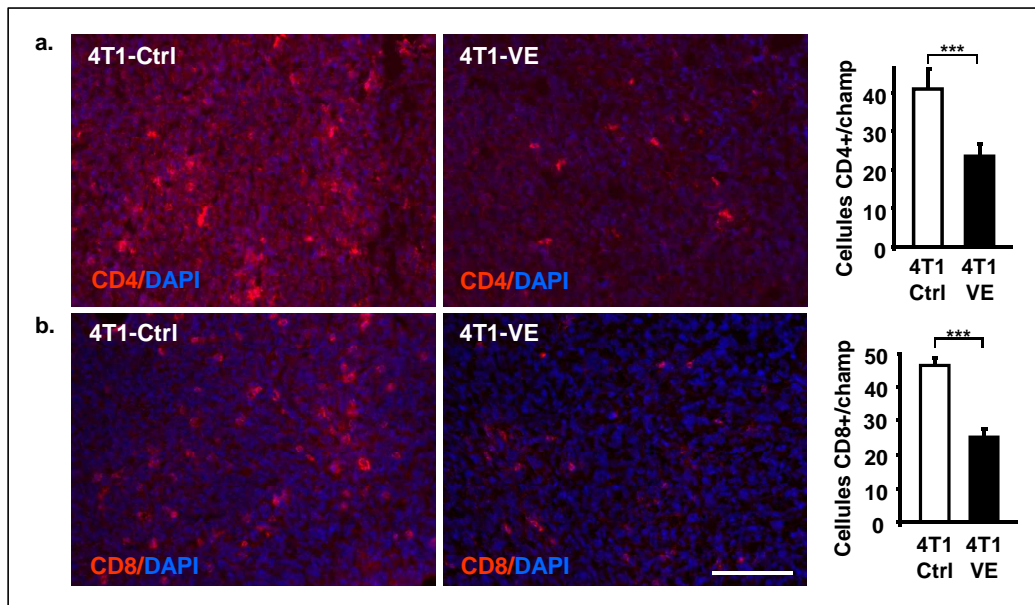


Figure 43 : Diminution de l’infiltration des lymphocytes T CD4 et CD8 dans les tumeurs surexprimant la VE-statine.

a., b. Les LT CD4 et CD8 sont visualisés respectivement par un marquage de CD4 (**a.**, rouge,) et de CD8 (**b.**, rouge), les noyaux sont marqués au DAPI (bleu), la barre représente 100 µm. A droite, les histogrammes représentent le nombre de cellules CD4⁺ et CD8⁺ infiltrées dans le tissu tumoral, *** $p < 0,001$. Ces données sont représentatives de 2 expériences effectuées dans des conditions similaires.

La surexpression de la VE-statine induit donc une forte diminution du nombre de LT intratumoraux, à la fois des LT CD4 et LT CD8. Nous nous sommes alors intéressés aux autres populations de cellules immunitaires. D’après l’analyse des marquages immunohistochimiques, le nombre de cellules NK (NKp46⁺), de LB (CD19⁺) et de macrophages (CD68⁺) est diminué dans les tumeurs 4T1-VE, respectivement de 55 %, 72 % et 67 %, par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl (**Figure 44a., b., c.**). Une même tendance est observée pour les cellules dendritiques (CD11c⁺) (**Figure 44d.**).

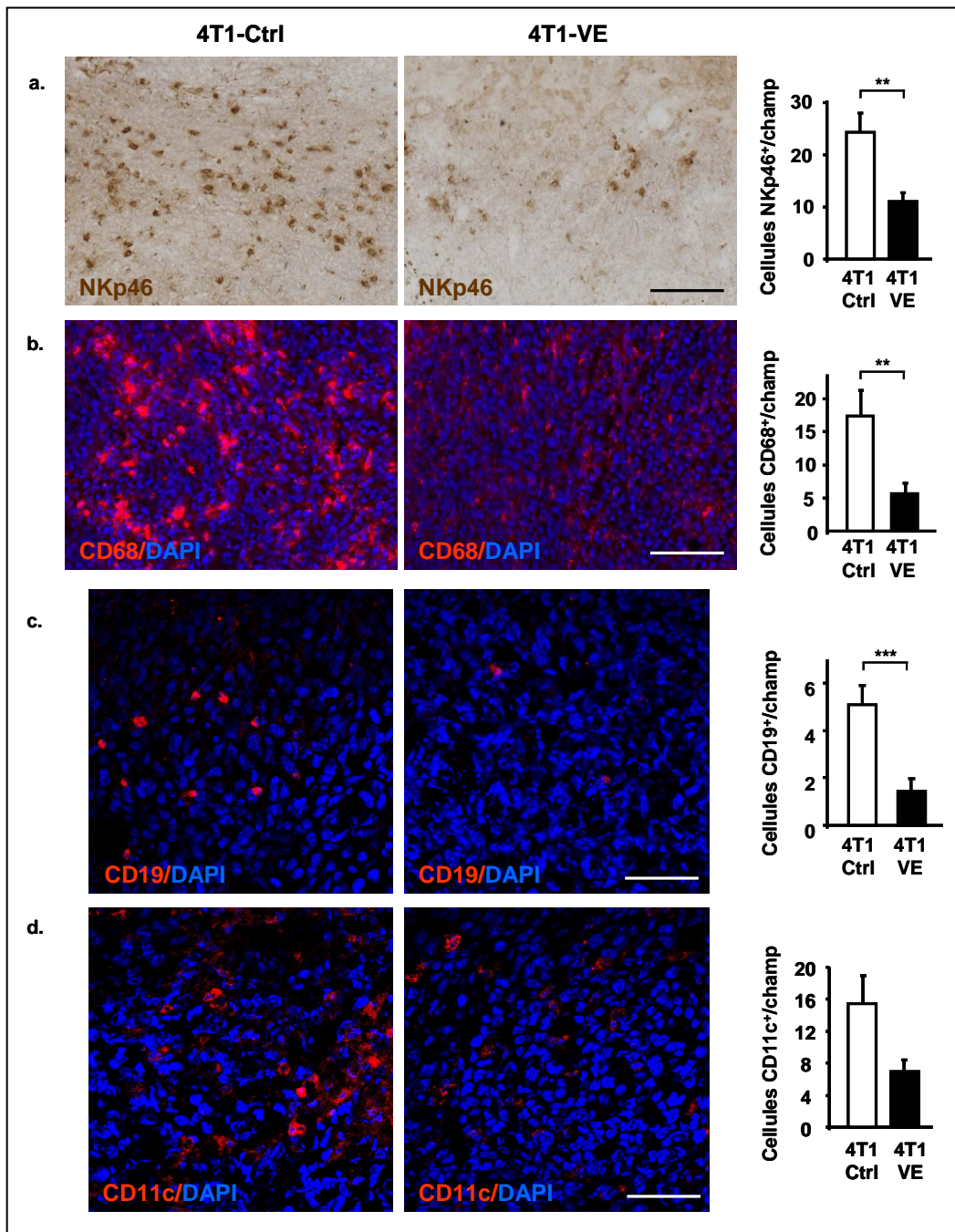


Figure 44 : Diminution de l'infiltration des cellules NK, des macrophages et des lymphocytes B dans les tumeurs surexprimant la VE-statine.

a., b. Les cellules NK ont été visualisées par un marquage NKp46 (**a.**, marron) et les macrophages par un marquage CD68 (**b.**, rouge), la barre représente 100 μ m. **c., d.** Les LB et les cellules dendritiques ont été visualisés respectivement par un marquage de CD19 (**c.**, rouge,) et de CD11c (**d.**, rouge), les images ont été obtenues par microscopie confocale, la barre représente 50 μ m. **b., c., d.** Les noyaux ont été marqués avec du DAPI (bleu). **a., b., c., d.** A droite, les histogrammes représentent le nombre de cellules NKp46⁺, CD68⁺, CD19⁺ et CD11c⁺ infiltrées dans le tissu tumoral, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Une diminution significative du nombre de LT CD3 ϵ (CD4 et CD8), de cellules NK, de macrophages et de LB a donc été observée par les immunomarquages. Cependant, cette technique comporte certains inconvénients. Premièrement, elle ne permet d'analyser les populations cellulaires présentes qu'à un seul endroit de la tumeur, la zone où la coupe a été faite et il est possible que les observations ne soient pas représentatives de la tumeur entière. Néanmoins, nous avons limité ce

biais en réalisant ces marquages sur 5 à 7 tumeurs par groupe et en les répétant sur plusieurs expériences indépendantes. Deuxièmement, nous avons identifié des populations cellulaires par le marquage d'un seul antigène, or celui-ci peut être présent à la surface de plusieurs types cellulaires. C'est par exemple le cas de la protéine CD4, qui est exprimée par une population de LT, mais également par les macrophages [Maddon *et al.*, 1987].

En complément, nous avons donc effectué une analyse de cytométrie en flux sur des tumeurs dissociées, en collaboration avec le Dr François Trottein et le Dr Christelle Faveeuw (CIIL, Lille). L'avantage de cette technique est de pouvoir effectuer des co-marquages plus aisément qu'en immunohistochimie. Les populations cellulaires d'intérêt ont été identifiées par un marquage de l'antigène pan-leucocytaire CD45 et de l'antigène spécifique de la population de cellules immunitaires étudiée (CD3 ϵ par exemple). Des triples marquages ont également été effectués, par exemple un marquage CD45/CD3 ϵ /CD4 afin d'identifier les LT CD4.

D'après l'analyse de la cytométrie en flux, les LB (CD45⁺ CD19⁺) et les cellules NK (CD45⁺ NKp46⁺) diminuent de manière significative dans les tumeurs 4T1-VE, respectivement de 60 % et 56 %, par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl. Contrairement aux marquages immunohistochimiques, la diminution de lymphocytes T (CD45⁺ CD3 ϵ ⁺) n'est pas significative (**Figure 45a.**). De façon surprenante, il y a une augmentation significative (2 fois) des LT CD4 (CD3 ϵ ⁺ CD4⁺) et une diminution significative (42 %) des LT CD8 (CD3 ϵ ⁺ CD8⁺) dans les tumeurs 4T1-VE (**Figure 45b.**), alors que l'analyse immunohistochimique avait montrée une réduction de l'incidence de ces deux populations de LT. Les cellules immunosuppressives MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*) participent à la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur et donc à l'échappement tumoral [Vesely *et al.*, 2011], nous avons voulu savoir si leur nombre était augmenté dans les tumeurs surexprimant la VE-statine. Cependant, l'infiltration des MDSC (CD45⁺ CD11b⁺ Gr1⁺) ne varie pas (**Figure 45a.**).

Ces données ne confirment donc qu'une partie des résultats d'immunohistochimie (diminution des cellules NK, LB et LT CD8 dans les tumeurs 4T1-VE). Cependant, il est nécessaire d'analyser ces résultats avec prudence. La dissociation des tumeurs est difficile et il est possible que toutes les cellules immunitaires n'aient pas été efficacement dissociées du tissu tumoral.

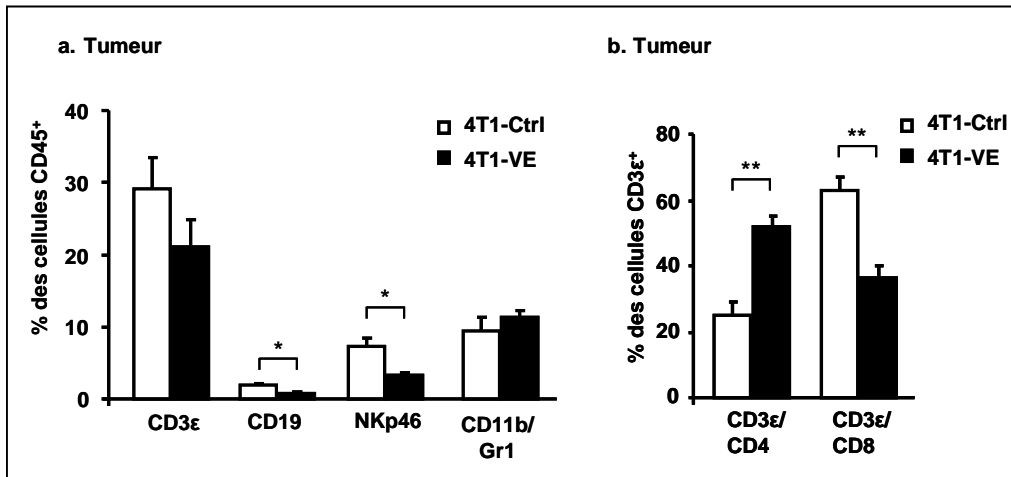


Figure 45 : Analyse des populations de cellules immunitaires dans les tumeurs par cytométrie en flux.

a., b. Les tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE ont été prélevées après 21 jours de croissance et analysées par cytométrie en flux. **a.** La proportion de LT (CD3ε), de LB (CD19), de cellules NK (NKp46) et de MDSC (CD11b/Gr1) parmi les leucocytes (CD45+) a été évaluée, * $p < 0,05$. **b.** La proportion de LT CD4 (CD3/CD4) et CD8 (CD3/CD8) parmi les LT (CD45/CD3ε) a été évaluée, ** $p < 0,01$.

Malgré les problèmes inhérents aux approches employées, nous avons tout de même confirmé que les proportions de certaines populations de cellules de l'immunité sont réduites dans les tumeurs 4T1-VE par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl. Comme la VE-statine est capable de circuler avec le sang [Lelièvre *et al.*, 2008], nous avons voulu savoir si la VE-statine a exercé un effet systémique ou au contraire, localisé au niveau de la tumeur. Pour cela, nous avons choisi d'étudier les populations de cellules immunitaires présentes au niveau de la rate, qui est un organe lymphoïde secondaire majeur. Nous avons effectué, par cytométrie en flux, une analyse des populations de cellules immunitaires présentes dans les rates de souris portant des tumeurs 4T1-Ctrl ou 4T1-VE. Aucune différence n'a été observée entre les deux conditions (**Figure 46**), ce qui suggère que la VE-statine n'a pas d'effet systémique sur l'immunité des animaux, mais plutôt local au niveau de la tumeur. Cependant, il n'est pas à exclure que la VE-statine modifie les proportions de cellules immunitaires présentes au niveau des ganglions lymphatiques, mais cette étude n'a pas été effectuée.

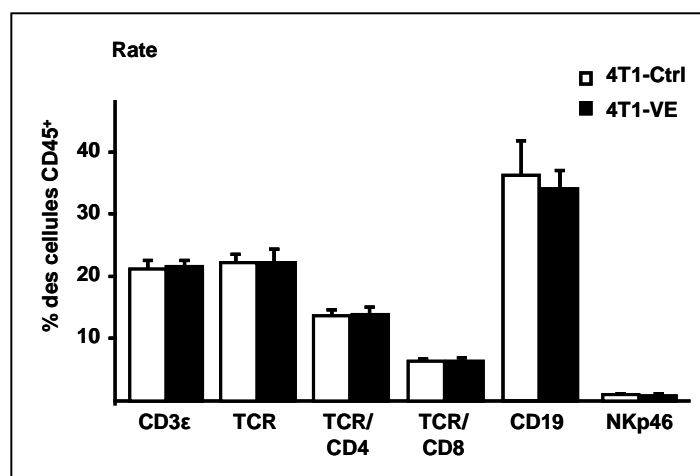


Figure 46 : Analyse des populations de cellules immunitaires dans les rates par cytométrie en flux.

Les rates des souris ayant des tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE ont été analysées par cytométrie en flux. La proportion de LT (CD3ε, TCR, CD4, CD8) de LB (CD19) et de cellules NK (NKp46) parmi les leucocytes (CD45⁺) a été évaluée.

Nous avons donc observé, à l'aide de trois techniques différentes, une diminution de la présence de cellules immunitaires dans le tissu des tumeurs 4T1-VE par rapport aux 4T1-Ctrl.

b) Diminution de l'expression des cytokines inflammatoires

Les cytokines inflammatoires participent au recrutement des cellules immunitaires lors de l'inflammation [Bevilacqua, 1993]. Suite à l'analyse des *PCR Arrays*, nous avons confirmé la diminution de l'expression des deux molécules pro-inflammatoires : IFN γ et IL-12. Nous avons voulu savoir si l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires, telles que IP-10, IL-1 α , IL-1 β , était diminuée et si celle de molécules anti-inflammatoires, telles que TGF β et IL-10, était augmentée.

L'expression de *IP-10*, gène cible de l'IFN γ est diminué dans les tumeurs 4T1-VE (**Tableau 5**), ce qui est cohérent avec la baisse de l'expression de *IFN γ* retrouvée dans ces tumeurs (**Figure 40e.**). Les taux d'ARNm *IL-1 α* et *IL-1 β* sont également inférieurs dans les tumeurs 4T1-VE par rapport aux taux retrouvés dans les tumeurs 4T1-Ctrl. Concernant les molécules anti-inflammatoires, aucune différence d'expression n'est observée pour le *TGF β* entre les deux conditions alors que le taux d'ARNm *IL-10* est diminué dans les tumeurs 4T1-VE (**Tableau 5**).

Il y a bien une diminution de l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dans les tumeurs 4T1-VE, cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation des deux molécules anti-inflammatoires testées.

Gène	4T1-Ctrl ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	4T1-VE ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
<i>IP10</i>	1,00 +/- 0,35	0,25 +/- 0,15
<i>IL-1α</i>	1,00 +/- 0,36	0,50 +/- 0,25
<i>IL-1β</i>	1,00 +/- 0,22	0,54 +/- 0,35
<i>TGFβ</i>	1,00 +/- 0,21	1,00 +/- 0,56
<i>IL-10</i>	1,00 +/- 0,27	0,36 +/- 0,21

Tableau 5 : Effet de la surexpression de la VE-statine sur l'expression de gènes de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Les taux d'expression de gènes de molécules pro-inflammatoires (*IP-10*, *IL-1 α* , *IL-1 β*) et anti-inflammatoires (*TGF β* , *IL-10*) ont été quantifiés par RT-PCR quantitative dans les tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE.

En résumé, la surexpression de la VE-statine par les cellules tumorales induit une augmentation de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique associée à une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires dans la tumeur et une diminution de l'expression de cytokines inflammatoires. La surexpression de notre protéine d'intérêt semble donc moduler la réponse immunitaire, or le système immunitaire est important dans la lutte anti-tumorale. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'augmentation de la croissance tumorale des tumeurs surexprimant la VE-statine était due à la diminution du nombre de leucocytes intratumoraux. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de tester le rôle de la VE-statine dans un modèle de tumorigenèse chez des souris immunodéprimées. En absence de système immunitaire intact, la surexpression de la VE-statine ne devrait plus avoir d'effet sur la tumorigenèse.

c) Absence d'effets de la VE-statine en absence d'un système immunitaire fonctionnel

Les cellules 4T1-Ctrl et 4T1-VE ont été injectées dans la glande mammaire des souris immunodéprimées SCID-Beige, dépourvues de lymphocytes T, B et de cellules NK. Contrairement aux expériences de tumorigenèse menées chez des souris immunocompétentes, la croissance tumorale et le poids des tumeurs sont identiques dans les conditions 4T1-VE et 4T1-Ctrl (**Figure 47a., b.**).

Cette absence de différence peut être due soit à une augmentation de la croissance des tumeurs 4T1-Ctrl, soit à une diminution de celles des 4T1-VE. La comparaison des courbes de croissance obtenues chez les SCID-Beige avec celles obtenues chez les souris immunocompétentes Balb/c montre que les tumeurs 4T1-Ctrl implantées dans les souris SCID-Beige poussent plus vite que les mêmes cellules implantées dans les Balb/c. Leur croissance est la même que celles des cellules 4T1-VE injectées chez les souris SCID-Beige ou chez les souris Balb/c (**Figure 47a.**).

Le nombre de métastases à la surface des poumons est le même dans la condition 4T1-Ctrl et 4T1-VE (**Figure 47b.**). De façon intéressante, le nombre de métastases comptabilisé sur des coupes de poumons semble être plus important dans le groupe 4T1-VE (**Figure 47c.**). Cela suggère que la surexpression de la VE-statine augmente potentiellement le nombre de micro-métastases, non observables à la surface des poumons.

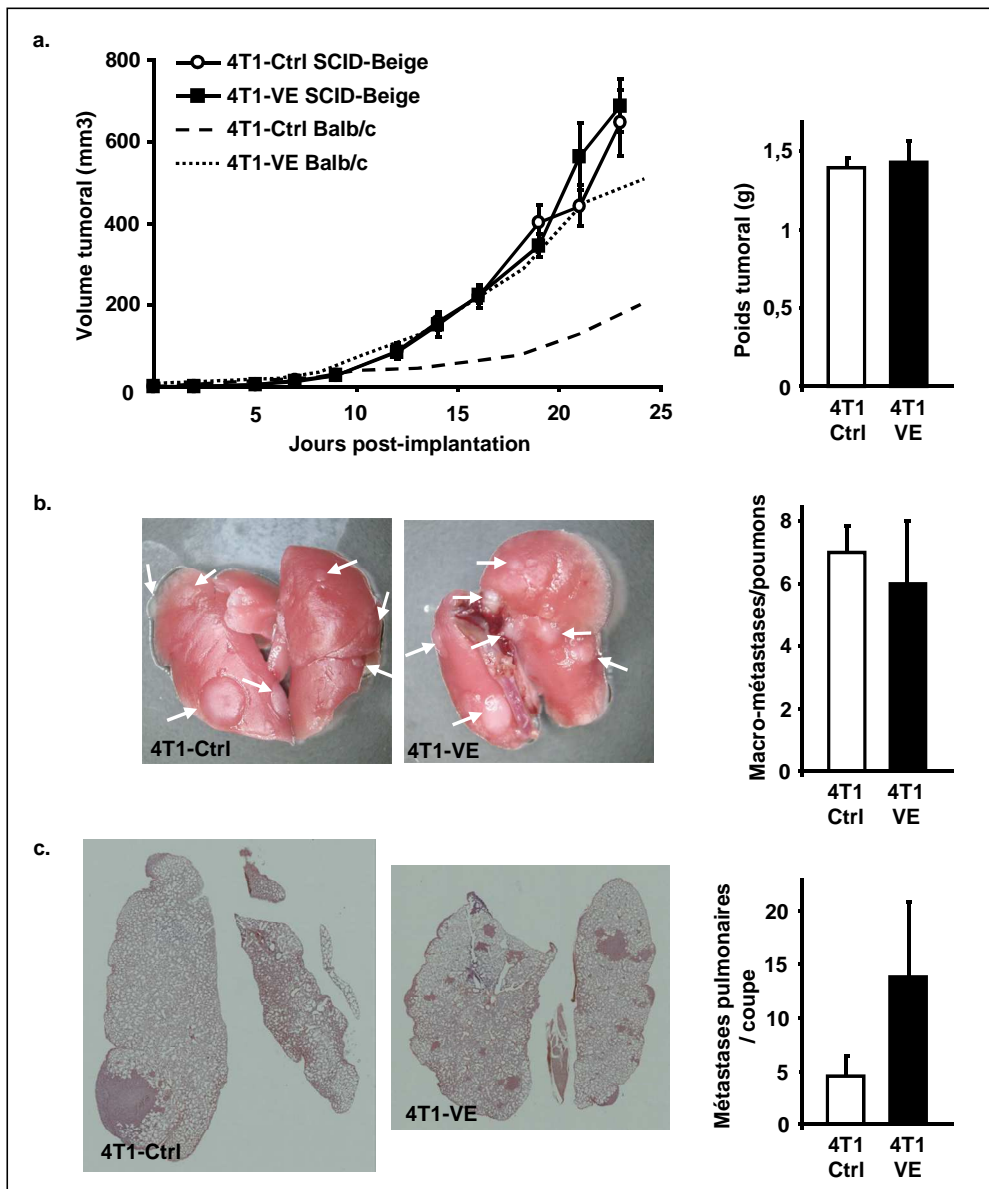


Figure 47 : La VE-statine n'a plus d'effets dans un contexte immunodéficient.

a. Les 4T1-Ctrl et -VE ont été injectées ($5 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$, 7 animaux par groupe) dans la glande mammaire des souris SCID-Beige et les tumeurs ont été mesurées régulièrement, les courbes correspondant à la croissance des 4T1-Ctrl (_ _ _) et des 4T1-VE (....) injectées aux souris Balb/c ont été représentées (**gauche**). Après sacrifice, les tumeurs ont été prélevées et pesées (**droite**). **b.** Les poumons des souris ont été prélevés et photographiés, les flèches blanches indiquent les macro-métastases (**gauche**), le nombre moyen de macro-métastases à la surface des poumons a été calculé pour chaque groupe (**droite**). **c.** Des coupes de poumons ont été colorées à l'hématoxyline/éosine, les masses denses correspondent à des métastases (**gauche**), le nombre moyen de métastases par coupe a été compté (**droite**).

L'effet pro-tumoral de la VE-statine n'est donc observé qu'en présence d'un système immunitaire fonctionnel, ce qui suggère fortement que la VE-statine exerce son effet via une modulation de l'immunité anti-tumorale.

III. Inhibition de l'adhérence des leucocytes par la VE-statine

A. Répression des molécules d'adhérence *in vivo*

La présence de cellules immunitaires est moins importante dans les tumeurs surexprimant la VE-statine que dans les tumeurs contrôle. Etant donné que la VE-statine est physiologiquement exprimée par les cellules endothéliales, nous avons émis l'hypothèse que sa surexpression pourrait diminuer l'expression des molécules d'adhérence par les cellules endothéliales, et donc réduire l'infiltration des leucocytes dans le tissu tumoral.

Nous avons choisi d'étudier l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1 par immunohistochimie au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux car ce sont des molécules majeures exprimées par les cellules endothéliales et impliquées dans l'adhérence des leucocytes. Ces molécules interagissent avec leurs ligands leucocytaires, permettant ainsi l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium [Ley *et al.*, 2007].

Un premier marquage d'ICAM-1 a été effectué sur des coupes de tumeurs 4T1 implantées chez des souris Balb/c. Le marquage semble plus important dans les tumeurs 4T1-Ctrl, cependant il est situé à la fois au niveau des vaisseaux sanguins et des cellules tumorales (**Figure 48a.**). Il a été décrit dans la littérature que les cellules 4T1 expriment ICAM-1 en réponse à l'IFN γ [duPre' *et al.*, 2008], ce qui pourrait expliquer ce marquage, qui perturbe l'analyse des taux d'expression au niveau des vaisseaux. Pour éviter ce problème, nous avons refait le marquage d'ICAM-1 sur des coupes de tumeurs implantées chez la souris Scid beige, qui expriment très peu d'IFN γ (**Figure 48b.**). Le marquage est alors essentiellement retrouvé au niveau des vaisseaux sanguins et les intensités de marquage d'ICAM-1 sont plus élevées dans les tumeurs 4T1-Ctrl que dans les tumeurs 4T1-VE (**Figure 48c.**). De la même façon, une diminution de l'expression de la molécule d'adhérence VCAM-1 est également retrouvée dans les tumeurs 4T1-VE (**Figure 48d.**).

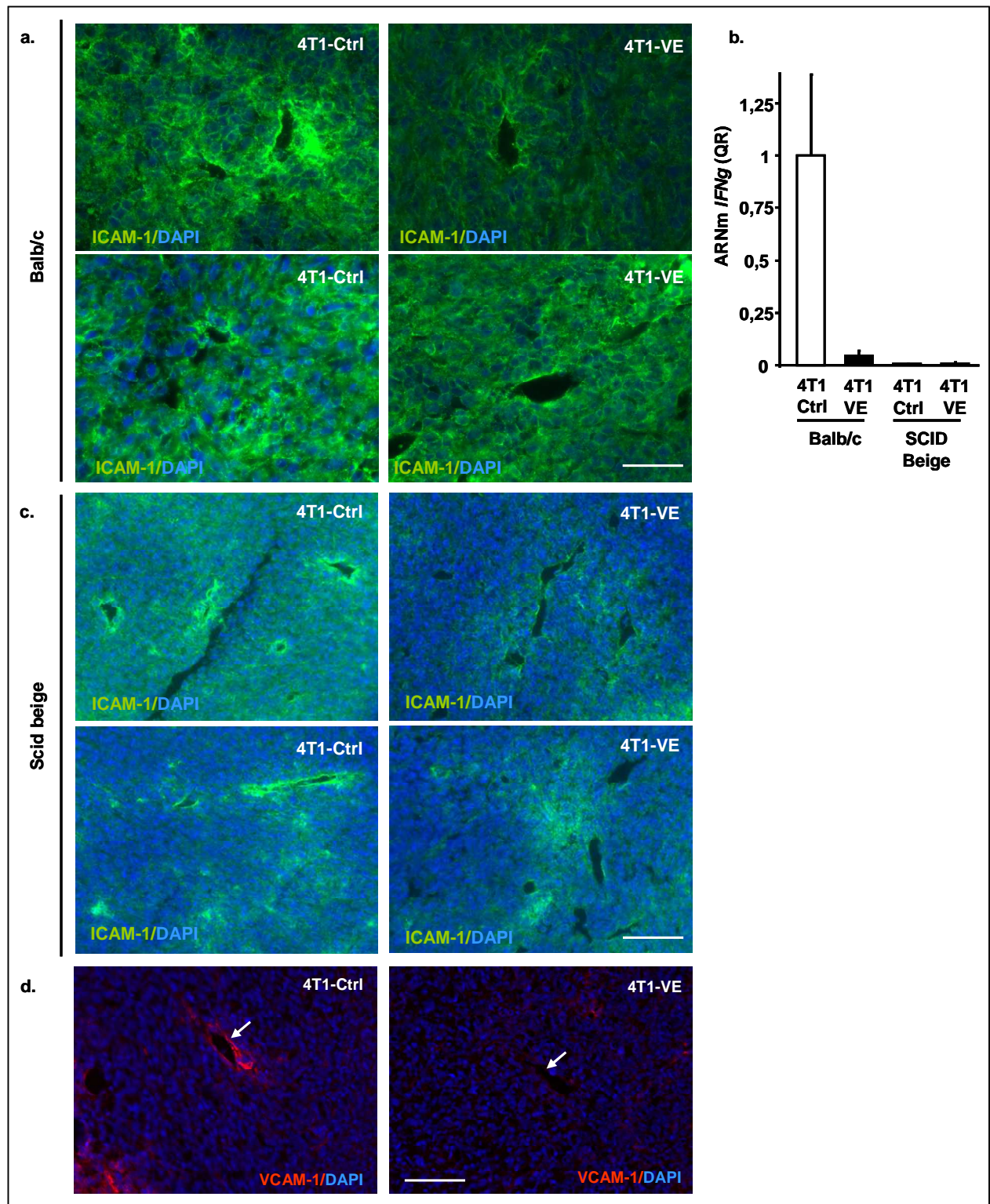


Figure 48 : Diminution de l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 dans les vaisseaux sanguins 4T1-VE.

a. Immunomarquage ICAM-1 (vert) de tumeurs 4T1-Ctrl (**gauche**) et 4T1-VE (**droite**) implantées chez les souris Balb/c, les vaisseaux et les cellules tumorales sont ICAM-1⁺. **b.** Les taux d'ARNm *IFN* γ des tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE implantées chez des souris Balb/c et Scid beige ont été quantifiés par RT-PCR quantitative. **c.** Immunomarquage ICAM-1 (vert) de tumeurs 4T1-Ctrl (**gauche**) et 4T1-VE (**droite**) implantées chez les souris Scid beige, seuls les vaisseaux tumoraux sont marqués. **d.** Des coupes de tumeurs 4T1-Ctrl (**gauche**) et 4T1-VE (**droite**) implantées chez les souris Balb/c ont été marquées avec un anticorps anti-VCAM-1 (rouge), les flèches blanches désignent un vaisseau sanguin. **a.**, **c.**, **d.** Les noyaux sont visualisés par un marquage DAPI (bleu), la barre représente 100 μ m.

La surexpression de la VE-statine diminue donc l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 par les vaisseaux tumoraux, ce qui suggère une modification de l'état d'activation de l'endothélium tumoral.

B. Répression des molécules d'adhérence *in vitro*

Nous avons alors poursuivi l'étude de l'effet de la VE-statine sur l'expression des molécules d'adhérence et sur l'adhérence des cellules immunitaires en utilisant un test *in vitro* d'adhérence statique de la lignée Jurkat (lymphocytes T immortalisés) sur les cellules endothéliales humaines primaires, les HUVEC. Pour cela, nous avons modulé la quantité de VE-statine, soit par ajout de notre protéine d'intérêt par l'utilisation de milieux conditionnés, soit par inhibition de l'expression du gène *VE-statine* par interférence de l'ARN. Par cette dernière approche, nous avons pu étudier l'effet de la VE-statine produite par les cellules endothéliales dans un contexte indépendant de la tumeur.

Tout d'abord, nous avons testé l'effet d'un prétraitement des HUVEC avec des milieux conditionnés par les cellules tumorales 4T1-Ctrl (MC-Ctrl) ou 4T1-VE (MC-VE) sur l'adhérence des Jurkat. Le prétraitement des HUVEC avec le MC-VE réduit de moitié l'adhérence des Jurkat sur les HUVEC, comparé avec l'incubation avec le MC-Ctrl (**Figure 49**).

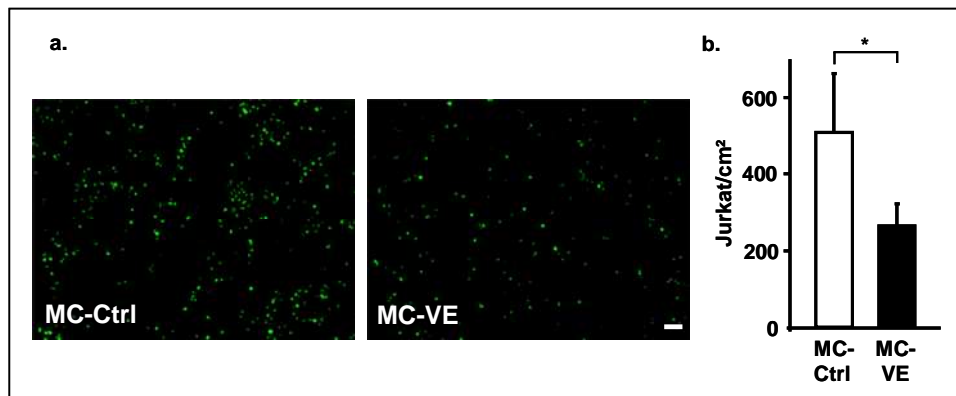


Figure 49 : Le traitement des HUVEC avec du milieu conditionné par les cellules 4T1-VE diminue l'adhérence des Jurkat sur les HUVEC.

a. Les Jurkat marquées au Dil (vert) ont été mis au contact d'une monocouche d'HUVEC confluentes prétraitées pendant 24 h avec des milieux conditionnés par des cellules tumorales 4T1-Ctrl (MC-Ctrl) ou 4T1-VE (MC-VE), les Jurkat adhérentes ont été photographiées, la barre représente 100 μ m. **b.** Le nombre de Jurkat adhérentes par cm^2 a été quantifié, * $p < 0,05$.

Nous avons ensuite inhibé l'expression de la VE-statine endogène des cellules endothéliales de 60 % par interférence de l'ARN (**Figure 50a.**). Cette inhibition augmente significativement l'adhérence des Jurkat sur les HUVEC de 2,5 fois (**Figure 50b.**). D'autre part, l'analyse par RT-PCR quantitative a permis de montrer que les taux d'expression de *E-sélectine*, *VCAM-1* et *ICAM-1* sont fortement augmentés (respectivement de 7, 4 et 4 fois) dans ces conditions, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'adhérence des Jurkat. Les taux de *P-sélectine* et *CD31* ne varient pas dans ces mêmes conditions (**Figure 50c.**). Le fait que le taux d'ARNm *P-sélectine* ne change pas peut s'expliquer par la régulation de cette molécule d'adhérence au niveau protéique. Elle est, en effet,

stockée dans les corps de Weibel Palade des cellules endothéliales et elle est redistribuée à la membrane plasmique lors de la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires [McEver *et al.*, 1989]

Afin de savoir si les effets répressifs de la VE-statine sur l'adhérence des Jurkat dépendent directement de la répression d'*ICAM-1* et de *VCAM-1*, nous avons ensuite étudié l'effet de l'inhibition simultanée de l'expression de la VE-statine et de celle d'*ICAM-1* ou de *VCAM-1*. Nous avons tout d'abord contrôlé les niveaux d'expression des deux molécules d'adhérence après les transfections. Comme dans l'expérience précédente, la transfection des HUVEC avec le si-RNA ciblant *VE-statine* augmente l'expression d'*ICAM-1*. Cependant, et comme attendu, cet effet est neutralisé par la co-transfection des si-RNA ciblant *ICAM-1*. Il en est de même pour la co-transfection de siRNA ciblant la VE-statine et ciblant *VCAM-1* (**Figure 50d.**). Nous avons alors évalué l'adhérence des Jurkat sur ces HUVEC transfectées. L'inhibition seule de l'expression du gène *VE-statine* augmente l'adhérence des Jurkat. Cependant, lorsque l'expression des gènes *VE-statine* et *ICAM-1* est inhibée de manière concomitante par interférence de l'ARN, l'augmentation de l'adhérence des Jurkat est réduite. Cet effet est encore plus prononcé lorsque l'expression des gènes *VE-statine* et *VCAM-1* est simultanément inhibée. Il y a en effet une diminution significative de l'adhérence des Jurkat et un retour à l'adhérence basale retrouvée lors de la transfection d'un si-RNA contrôle (**Figure 50e.**). Ces résultats suggèrent donc que les effets répressifs de la VE-statine sur l'adhérence des Jurkat dépendent directement de la répression d'*ICAM-1* et de *VCAM-1* dans les cellules endothéliales non activées.

La VE-statine inhibe donc l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales, ce qui a pour conséquence de diminuer l'adhérence des lymphocytes sur l'endothélium. C'est donc un répresseur de l'activation des cellules endothéliales. Lorsque la VE-statine est surexprimée par les cellules tumorales, l'expression des molécules d'adhérence par l'endothélium tumoral est également diminuée. L'infiltration leucocytaire dans la tumeur est donc réduite, ce qui participe à l'échappement de la tumeur au système immunitaire et permet une meilleure croissance tumorale par rapport aux tumeurs ne surexprimant pas la VE-statine. Ce travail fait l'objet d'une publication sous presse dans le journal *Cancer Research* (Delfortrie *et al*, voir la partie Annexes).

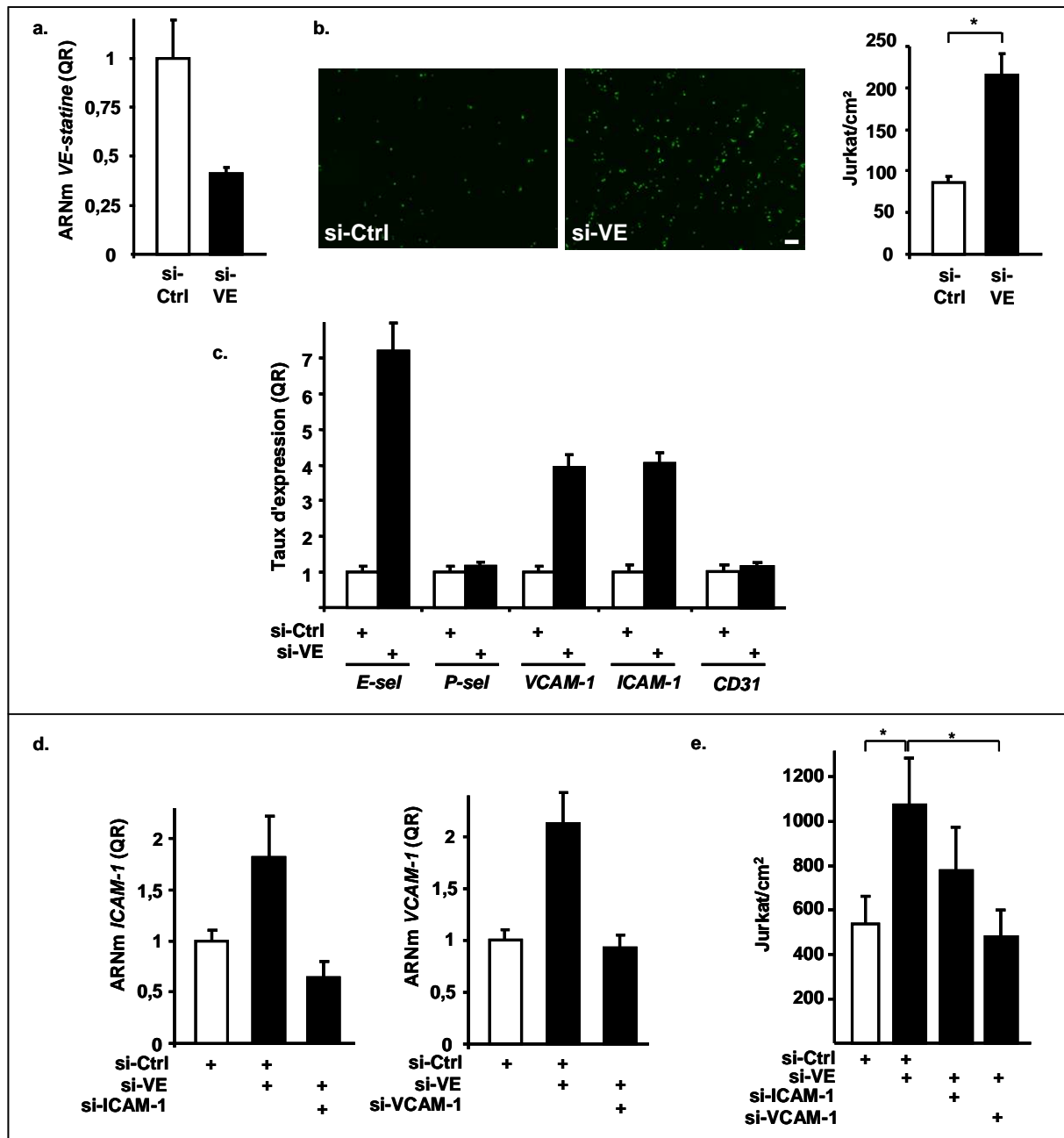


Figure 50 : L'inhibition de la VE-statine endothéliale endogène augmente l'adhérence des Jurkat sur les HUVEC via une surexpression des molécules d'adhérence.

a. Les HUVEC ont été transfectées par un si-RNA contrôle (si-Ctrl) ou par un si-RNA ciblant la *VE-statine* (si-VE) et le taux d'ARNm *VE-statine* a été quantifié par RT-PCR quantitative. **b. gauche,** Les Jurkat marquées au Dil (vert) ont été mises au contact d'une monocouche d'HUVEC confluentes transfectées avec un si-Ctrl ou si-VE, les Jurkat adhérentes ont été photographiées, la barre représente 100 μ m. **droite.** Le nombre de Jurkat adhérentes par cm^2 a été quantifié, * $p < 0,05$. **c.** Les taux d'expression de *E-sélectine*, *P-sélectine*, *VCAM-1*, *ICAM-1* et *CD31/PECAM* des HUVEC transfectées par le si-Ctrl ou le si-VE ont été mesurés par RT-PCR quantitative. **d.** Les HUVEC ont été transfectées avec un si-Ctrl, avec un si-VE, ou co-transfectées avec un si-VE et un si-RNA ciblant *ICAM-1* (si-ICAM-1) ou avec un si-VE et un si-RNA ciblant *VCAM-1* (si-VCAM-1) et les taux d'expression d'*ICAM-1* et de *VCAM-1* ont été quantifiés par RT-PCR quantitative. **e.** Les Jurkat marquées au Dil ont été mises au contact d'une monocouche d'HUVEC confluentes transfectées avec un si-Ctrl, avec un si-VE, ou co-transfectées avec un si-VE et un si-ICAM-1 ou avec un si-VE et un si-VCAM-1 et les Jurkat adhérentes ont été quantifiées, * $p < 0,05$.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle de la VE-statine dans la tumorigenèse et dans l'angiogenèse. Pour cela, nous avons décidé de surexprimer la VE-statine dans des cellules tumorales et d'étudier l'effet de cette surexpression *in vitro* et dans des modèles de tumorigenèse expérimentale chez la souris, une approche jamais publiée jusqu'ici.

Les résultats originaux obtenus au cours de ce travail sont que : premièrement, la surexpression de la VE-statine augmente la croissance tumorale et la dissémination métastatique, deuxièmement, l'effet pro-tumoral de la VE-statine est dû, au moins en partie, à l'inhibition de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales, qui induit une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs et favorise ainsi un échappement au système immunitaire. Enfin, la VE-statine endogène aux cellules endothéliales normales participe au maintien de l'endothélium dans un état non activé, non inflammatoire.

1. Système d'expression inductible par la doxycycline

Afin de surexprimer la VE-statine, la première approche a été d'établir des clones stables qui surexpriment notre protéine d'intérêt de manière inductible par la doxycycline. Selon les résultats *in vitro* et la première étude de tumorigenèse *in vivo*, l'induction par la doxycycline a un effet anti-tumoral très clair. Cependant, suite à des problèmes de reproductibilité *in vivo*, nous avons dû changer de stratégie de surexpression. Nous ne connaissons pas les raisons exactes pour lesquelles ce système inductible n'est pas fiable.

L'inconvénient des systèmes d'expression inductible par la doxycycline sont les effets secondaires de l'administration de doxycycline dans l'eau de boisson. En effet, elle peut causer une déshydratation des souris, accompagnée d'une perte de poids, probablement due à une réduction de la prise de boisson causée par le goût de la doxycycline [Cawthorne *et al.*, 2007]. Nous avons choisi de traiter les souris avec une dose de doxycycline de 0,5 mg/ml dans l'eau de boisson et cette dose nous a permis d'obtenir, dans la première expérience, une différence de croissance entre les clones non induits (- Dox) et induit (+ Dox) sans variation majeure de la prise de boisson. Cependant, afin d'augmenter la surexpression de notre protéine, nous avons voulu augmenter la dose de doxycycline à 2 mg/ml en ajoutant 5 % de saccharose, afin d'améliorer le goût de l'eau et donc la prise de boisson, conditions qui avaient été utilisées par d'autres équipes [Eberle *et al.*, 2003; Wang et El-Deiry, 2004]. De grandes disparités de prise de boisson ont alors été observées. Le groupe contrôle a augmenté sa prise de boisson sucrée de 2 à 3 fois par rapport à de l'eau non sucrée, alors que celle du groupe traité avec 0,5 mg/ml de doxycycline n'a été que légèrement augmentée. La prise d'eau du groupe traité avec 2 mg/ml de doxycycline et 5 % de saccharose a été plus faible que celles du groupe contrôle et du groupe traité à 0,5 mg/ml de doxycycline, ces souris n'ont donc pas reçu pas la dose de doxycycline escomptée. Dans cette expérience, nous n'avons observé aucune différence de croissance entre les clones induits et non induits. La prise de sucre pouvant moduler la croissance tumorale et donc biaiser notre analyse, il nous a donc paru souhaitable d'utiliser la dose de 0,5 mg/ml dans de l'eau non enrichie en sucre. Après une étude comparant les moyens d'administration de la doxycycline, l'administration du traitement dans la nourriture est vraisemblablement la meilleure

méthode pour administrer la doxycycline. Elle permet une induction de l'expression satisfaisante sans déshydratation visible [Cawthorne *et al.*, 2007], cependant sa mise en œuvre est moins facile que le traitement par l'eau de boisson, car elle impose de contrôler l'alimentation des animaux.

Les systèmes d'expression inductible par la tétracycline sont régulièrement utilisés pour étudier les effets de la surexpression d'une protéine d'intérêt ou de l'inhibition de l'expression d'une protéine par production de shRNA. Le système pSTAR a été utilisé dans plusieurs études *in vitro* [Dorsey *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2009], mais je n'ai trouvé aucune publication rapportant l'utilisation de ce système *in vivo*. Par contre, d'autres systèmes inductibles par la doxycycline ont été utilisés dans des modèles murins de tumorigenèse [Eberle *et al.*, 2003; Coluccia *et al.*, 2004; Wang et El-Deiry, 2004; Welman *et al.*, 2006]. L'induction *in vivo* de l'expression d'une protéine ou de shRNA par la doxycycline paraît donc réalisable et exploitable, il est possible simplement que le système pSTAR soit moins fiable que d'autres systèmes existants.

Nous avons établi des clones stables afin de surexprimer la VE-statine, il est possible que le phénotype que nous observons soit dû à un effet clonal. Par exemple, le plasmide pSTAR, avec la séquence VE-statine, se serait inséré à côté d'un gène suppresseur de tumeur. Le traitement à la doxycycline pourrait donc induire la surexpression de la VE-statine, mais également celle d'une protéine anti-tumorale, qui serait responsable du phénotype observé. Néanmoins, le fait d'avoir obtenu 2 clones ayant les mêmes caractéristiques affaiblit cette hypothèse. L'effet observé pourrait donc être dû à la VE-statine, et pour une raison inconnue, il est différent de celui obtenu par la surexpression par infection virale. Cependant, le pSTAR pourrait avoir des sites d'insertion préférentiels et s'être inséré au même endroit du génome pour les deux clones. C'est pourquoi il serait intéressant d'identifier la zone d'insertion du plasmide en séquençant l'ADN génomique de ces clones. L'insertion pourrait également avoir eu lieu au même endroit par hasard.

2. Effet de la VE-statine sur la croissance tumorale et sur la réponse immunitaire

La seconde stratégie de surexpression de la VE-statine a été l'utilisation d'un système d'infection rétrovirale, car c'est une approche qui permet de travailler sur une large population cellulaire infectée, sans nécessiter la sélection de clones. Nous avons ainsi montré que la surexpression de la VE-statine a un effet pro-tumoral. Elle augmente, en effet, la croissance tumorale dans deux modèles différents : un modèle orthotopique, dans lequel les cellules 4T1 sont implantées dans la glande mammaire de souris Balb/c, et un modèle hétérotopique, dans lequel les cellules LLC1 sont injectées par voie sous-cutanée à des souris C57BL/6. Nous avons également montré que la surexpression de la VE-statine a un effet pro-invasif, puisqu'elle augmente la formation des métastases dans le modèle 4T1 et augmente la présence de vésicules lipidiques dans les tumeurs 4T1 et LLC1 implantées chez la souris depuis moins d'une semaine.

Ces résultats sont à l'opposé de l'effet anti-tumoral retrouvé avec le système de surexpression inductible par la doxycycline. Ils sont, cependant, compatibles avec les observations faites dans les tumeurs humaines. En effet, la VE-statine est exprimée de manière ectopique par les cellules

cancéreuses de plusieurs tumeurs humaines et une forte expression est associée avec un haut grade tumoral, un fort taux métastatique et un mauvais pronostic dans les hépatocarcinomes, les gliomes et les tumeurs colorectales [Díaz *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010]. De plus, la seule étude expérimentale publiée du rôle de la VE-statine dans la formation des métastases montre un rôle pro-métastatique de cette protéine [Wu *et al.*, 2009]. Enfin, un anticorps humanisé ciblant la VE-statine a été développé par Genentech (Roche) et est actuellement en phase d'essai clinique (phase I en cours, phase II en cours ou planifiée) [Genentech, 2011]. L'ensemble de ces données suggère un effet pro-tumorigène de la VE-statine. Il semble donc que l'approche par infection virale soit plus cohérente que le système inductible et la suite des analyses s'est appuyée sur cette approche.

Une autre équipe a étudié l'effet de la surexpression de la VE-statine dans un modèle de tumorigénèse et les résultats sont présentés dans un brevet [Kuo et Kuhnert, 2008]. La lignée murine T241, issue d'un fibrosarcome, a été infectée par des lentivirus codant la VE-statine, puis des clones ont été sélectionnés. Les T241 contrôle et deux clones surexprimant la VE-statine ont été injectés par voie sous-cutanée à des souris. Ces deux clones ont un fort ralentissement de croissance tumorale, par rapport aux cellules T241. Ce résultat est divergeant par rapport à celui que nous avons obtenu, sans explication claire pour l'instant.

Nous avons montré que l'effet pro-tumoral de la VE-statine est dû à une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires, très probablement induite par la diminution de l'expression des molécules d'adhérence. Nous avons en effet observé une diminution du nombre de cellules immunitaires dans les tumeurs surexprimant la VE-statine, par rapport aux tumeurs contrôle. Cette diminution concerne plusieurs populations cellulaires : les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules NK et les macrophages. Les protéines ICAM-1 et VCAM-1 sont réprimées au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux, suggérant un rôle de la VE-statine sur l'adhérence des cellules immunitaires. La modulation de l'adhérence des cellules immunitaires participe au phénomène d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire et la répression des molécules d'adhérence a été décrite dans plusieurs tumeurs humaines. Par exemple, l'expression des gènes *ICAM-1* et *ICAM-2* est diminuée dans les cellules endothéliales issues de carcinomes rénaux par rapport à celles issues de tissus normaux [Griffioen *et al.*, 1996]. La E-sélectine est réprimée dans les vaisseaux de carcinomes à cellules squameuses et cette répression est associée à un recrutement de cellules immunosuppressives, les lymphocytes T régulateurs [Clark *et al.*, 2008]. Dans notre étude, nous avons observé une diminution de l'infiltration des cellules de l'immunité, il serait, néanmoins, intéressant d'analyser les populations de cellules immunosuppressives. D'après l'analyse de cytométrie en flux, le nombre de cellules myéloïdes immunosuppressives MDSC ne varie pas entre les tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE. Cependant, cette expérience nécessite d'être effectuée à nouveau en améliorant le protocole de dissociation de la tumeur. De plus, il faudrait regarder si, dans les tumeurs surexprimant la VE-statine, il y a une augmentation de la proportion des TAM parmi les macrophages, et de même s'il y a une augmentation de la proportion de lymphocytes T régulateurs ($CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$) parmi les LT CD4, par rapport aux tumeurs contrôle.

Nous expliquons la diminution du nombre de cellules immunitaires dans les tumeurs surexprimant la VE-statine par rapport aux tumeurs contrôle, par une diminution de l'infiltration des cellules causée par la répression de l'expression des molécules d'adhérence endothéliales. Cependant, nous n'avons pas exploré l'effet possible de la VE-statine sur l'activité des cellules immunitaires et des expériences sont en train d'être menées sur ce point.

Nous avons montré que le système immunitaire est indispensable pour que la VE-statine exerce son effet pro-tumoral en réalisant une étude de tumorigenèse chez des souris immunodéficientes (SCID-Beige). La surexpression de la VE-statine n'a plus d'effet sur la croissance des tumeurs en absence d'un système immunitaire fonctionnel. Ces résultats montrent l'importance d'utiliser des modèles de tumorigenèse chez des souris immunocompétentes. Si nous avons choisi d'utiliser des cellules tumorales humaines et de les implanter chez des souris immunodéficientes, il est probable que nous n'aurions pas observé de phénotype majeur et conclu à une absence d'effet de la VE-statine sur la croissance tumorale.

La seule autre étude expérimentale du rôle de la VE-statine a été effectuée chez des souris *Nude*, déficientes en lymphocytes T. Malgré le fait que le système immunitaire des animaux ne soit pas intact, les auteurs ont tout de même observé un effet pro-tumoral et pro-métastatique de la VE-statine [Wu *et al.*, 2009]. Ces souris, contrairement à la souche SCID-Beige, possèdent des lymphocytes B et des cellules NK et l'effet de la VE-statine sur l'infiltration de ces cellules pourrait suffire à observer un effet. La deuxième hypothèse est que l'augmentation de la dissémination métastatique induite par la VE-statine n'est pas totalement dépendante du système immunitaire. Nous avons également observé un effet pro-métastatique de la VE-statine chez des souris immunodéprimées. En effet, bien que le nombre de macro-métastases observé à la surface des poumons soit le même pour les souris SCID-Beige portant des tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE, les souris SCID-Beige portant des tumeurs 4T1-VE semblent développer plus de micro-métastases que les souris portant des tumeurs 4T1-Ctrl. Cet effet pro-métastatique pourrait être dû à une modification de la qualité des vaisseaux induite par la VE-statine, qui faciliterait l'extravasation des cellules tumorales dans le sang. Une diminution du marquage collagène IV et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins ont, en effet, été observées dans les tumeurs surexprimant la VE-statine implantées dans les souris immunocompétentes. Il serait pertinent d'étudier la fonctionnalité des vaisseaux des tumeurs implantées chez des souris SCID-Beige, pour voir s'ils ont les mêmes caractéristiques que les vaisseaux des tumeurs implantées chez les souris immunocompétentes.

Dans l'étude du rôle de la VE-statine dans la formation des métastases, les auteurs suggèrent que la VE-statine stimule la migration des cellules en induisant la phosphorylation de la protéine FAK, ce qui promeut la dissémination métastatique [Wu *et al.*, 2009]. Ce mécanisme d'action n'a pas été exploré dans notre étude. Ces auteurs ont observé une augmentation de la migration *in vitro* d'une lignée d'hépatocarcinome dont l'expression de la VE-statine est inhibée par interférence de l'ARN, alors que nous n'avons pas observé de différence de migration entre les cellules surexprimant ou non la VE-statine. Néanmoins, il serait tout de même intéressant d'analyser le taux d'expression de FAK et son niveau de phosphorylation dans les tumeurs surexprimant ou non la VE-statine.

La production d'un grand nombre de cytokines inflammatoires est diminuée dans les tumeurs surexprimant la VE-statine. Cette diminution est certainement due à la réduction du nombre des cellules immunitaires infiltrées, qui produisent ces cytokines. A son tour, la diminution des cytokines pro-inflammatoires va induire une réponse inflammatoire réduite par rapport à celle retrouvée dans les tumeurs ne surexprimant pas la VE-statine. Par exemple, l'un des effets de l'IFN γ , produit majoritairement par les cellules NK et les LT, est d'induire l'expression d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales [Pober *et al.*, 1986] et d'augmenter l'expression de VCAM-1 induite par le TNF- α [Lechleitner *et al.*, 1998]. La diminution de l'expression de ces molécules d'adhérence que nous observons au niveau des vaisseaux sanguins des tumeurs surexprimant la VE-statine est sûrement en partie due à la diminution du taux d'IFN γ . Néanmoins, les effets de la VE-statine sur l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 ne sont pas uniquement dépendant de l'IFN γ . En effet, une diminution d'ICAM-1 est observée dans les vaisseaux des tumeurs 4T1-VE implantées chez des souris SCID-Beige, alors que ces dernières ont un niveau d'expression d'IFN γ très faible et inchangé entre les tumeurs 4T1-Ctrl et 4T1-VE.

3. Implication des LOX dans les effets de la VE-statine ?

Avant mon arrivée dans le laboratoire, l'équipe avait montré que la VE-statine était un inhibiteur endogène du dépôt d'élastine par les cellules endothéliales, via l'inhibition de l'activité enzymatique des lysyl oxydases [Lelièvre *et al.*, 2008]. De façon intéressante, certaines LOX sont impliquées dans la croissance de la tumeur primaire et dans la dissémination métastatique. Les LOX sont-elles impliquées dans les effets pro-tumoral et pro-métastatique de la VE-statine ? L'expression de LOX est corrélée avec une diminution de la survie globale et de la survie sans métastases des patients atteints d'un cancer du sein (statut du récepteur aux œstrogènes négatif) ou d'un cancer de la tête et du cou [Erlor *et al.*, 2006]. La même corrélation a été trouvée pour LOXL2 dans les tumeurs du sein (statut du récepteur aux œstrogènes négatif) [Barker *et al.*, 2011].

Plusieurs équipes ont étudié le rôle de LOX et LOXL2 dans la croissance tumorale primaire. Dans un modèle de tumorigenèse expérimentale, le traitement par différents inhibiteurs de LOX n'a pas d'effet majeur sur la croissance des tumeurs primaires [Erlor *et al.*, 2006]. Cependant, lorsque le stroma est pré-conditionné avec LOX avant l'injection de cellules tumorales, la progression tumorale est accélérée [Levental *et al.*, 2009]. Pour LOXL2, selon l'inhibiteur utilisé, une inhibition a pour conséquence, soit une réduction de la croissance tumorale [Barry-Hamilton *et al.*, 2010], soit aucun effet majeur sur la croissance des tumeurs primaires [Barker *et al.*, 2011]. Pour résumé, selon les conditions expérimentales utilisées, LOX et LOXL2 n'ont pas d'effet sur la croissance tumorale ou la stimulent. Dans notre modèle, la surexpression de la VE-statine induit très probablement l'inhibition des LOX dans la tumeur primaire, même si cela reste à vérifier. Or cette surexpression augmente la croissance de la tumeur, ce qui suggère que l'effet pro-tumoral de la VE-statine est indépendant des LOX.

Pour ce qui est de la dissémination métastatique, le traitement avec des inhibiteurs de LOX et de LOXL2 inhibe ou abolit le développement des métastases dans différents modèles expérimentaux [Erlér *et al.*, 2006; Barry-Hamilton *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 2011]. LOX et LOXL2 sont donc des protéines pro-métastatiques. Deux questions se posent : premièrement, pourquoi la surexpression de la VE-statine, protéine qui inhibe les LOX, n'induit pas une diminution de la formation des métastases? Deuxièmement, pourquoi cette surexpression induit, au contraire, une augmentation de la dissémination métastatique ?

LOX joue un rôle important dans l'établissement de la niche pré-métastatique. Elle est sécrétée par la tumeur primaire, accumulée dans les sites fréquents de développement métastatique, et permet le recrutement des cellules myéloïdes CD11b⁺ au niveau de la niche pré-métastatique avant l'arrivée des cellules tumorales [Erlér *et al.*, 2009]. Il est possible que la surexpression de la VE-statine ne réduise pas la formation des métastases car la VE-statine n'inhibe pas l'activité LOX au niveau de ces niches. Pourtant, il a été montré, dans un modèle de surexpression de la VE-statine par les kératinocytes, que la VE-statine circule avec le sang [Lelièvre *et al.*, 2008], ce qui laisse supposer qu'elle puisse exercer son effet inhibiteur sur LOX. Il se peut que la VE-statine, surexprimée dans nos modèles, ne s'accumule pas aux mêmes endroits, ou plus tardivement, que LOX, et donc qu'elle ne puisse pas l'inhiber LOX. Pour vérifier cela, il serait intéressant d'effectuer un co-marquage LOX et VE-statine des poumons des souris portant des tumeurs 4T1-Ctrl ou 4T1-VE afin de voir si elles sont co-localisées. Bien qu'il soit possible que l'effet pro-métastatique de la VE-statine soit indépendant de LOX, il se peut également que cette dernière soit impliquée dans cet effet. LOX est exprimée par les cellules tumorales hypoxiques [Erlér *et al.*, 2006], or les tumeurs surexprimant la VE-statine sont plus hypoxiques que les tumeurs contrôle, il est donc possible qu'elles produisent plus de LOX. Si la VE-statine n'inhibe pas ou peu LOX au niveau des niches pré-métastatiques, cela pourrait favoriser le développement de métastases. Il serait intéressant de regarder si LOX est accumulée en plus grande quantité ou si le nombre de niches pré-métastatiques est augmenté dans les poumons des souris portant des tumeurs surexprimant la VE-statine.

Pour ce qui est de LOXL2, cette enzyme est impliquée dans l'établissement du stroma tumoral. Son inhibition réduit le nombre de fibroblastes activés et de cellules endothéliales associés au stroma, diminue la production de facteurs de croissance et inhibe la voie du TGFβ [Barry-Hamilton *et al.*, 2010]. Une autre équipe a montré que LOXL2 augmente l'expression et l'activité de TIMP1 (*Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProteinase 1*) et de MMP9, ce qui augmente la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire permettant la dissémination métastatique. De plus, l'inhibition de LOXL2 n'affecte pas le recrutement de cellules CD11b⁺ au niveau de la niche pré-métastatique [Barker *et al.*, 2011]. Il semble donc que LOXL2 exerce son effet pro-métastatique au niveau de la tumeur primaire, et non à distance. Comme la surexpression de la VE-statine induit probablement l'inhibition des LOX au niveau de la tumeur primaire, l'effet pro-métastatique de la VE-statine doit donc être indépendant de LOXL2.

4. Effet de la VE-statine sur l'angiogenèse tumorale

Nous avons observé une modification modérée des vaisseaux tumoraux à la surexpression de la VE-statine. D'une part, une légère augmentation de la microdensité vasculaire est observée dans les tumeurs 4T1 surexprimant la VE-statine par rapport aux tumeurs 4T1-Ctrl. Cette observation est cohérente avec la diminution de la microdensité vasculaire observée dans les tumeurs d'une lignée d'hépatocarcinome pour laquelle l'expression du gène *VE-statine* a été inhibé, par rapport aux tumeurs contrôle [Wu *et al.*, 2009]. Elle l'est également avec la corrélation entre la surexpression de la VE-statine et la densité microvasculaire dans les gliomes humains [Huang *et al.*, 2010].

D'autre part, l'aspect qualitatif des vaisseaux est également modifié et cette information est originale. La surexpression de VE-statine induit la formation de vaisseaux tumoraux moins matures que ceux des tumeurs contrôle. En effet, le marquage du collagène IV est diminué dans les tumeurs 4T1-VE. L'équipe a montré que la VE-statine inhibe la migration des cellules musculaires lisses induites par le PDGF-BB *in vitro* [Soncin *et al.*, 2003]. La diminution du marquage collagène IV peut être la conséquence d'un dépôt réduit de cette protéine matricielle, dû à une réduction du recrutement des cellules musculaires lisses (productrices de matrice extracellulaire [Jain, 2003]) induite par la VE-statine. Afin de voir si leur recrutement était diminué, nous avons effectué un co-marquage des cellules endothéliales (CD31) et des cellules musculaires lisses (SMA). Cependant, nous avons été confrontés à des problèmes techniques. Nous avons obtenu un marquage SMA diffus et nous n'avons pas distingué de marquage spécifique aux vaisseaux. Cela peut être expliqué par un problème possible de spécificité de l'anticorps, il serait donc intéressant de tester un autre anticorps anti-SMA. Il est également possible que les fibroblastes associés aux tumeurs (CAF), qui expriment également la protéine SMA [Kalluri et Zeisberg, 2006], aient été détectés par ce marquage, ce qui perturberait la visualisation des cellules musculaires lisses.

La perméabilité des vaisseaux des tumeurs 4T1-VE est augmentée par rapport aux vaisseaux des tumeurs 4T1-Ctrl. Cela pourrait être causé par l'inhibition du recrutement des cellules musculaires lisses par la VE-statine et la diminution du collagène IV. Les vaisseaux des tumeurs 4T1-VE apparaissent ainsi moins fonctionnels que les vaisseaux des tumeurs Ctrl, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des zones hypoxiques et nécrotiques dans les tumeurs 4T1-VE, ce qui stimulerait la dissémination métastatique.

Une autre hypothèse peut expliquer la modification des vaisseaux tumoraux : la modulation de la voie Notch par la VE-statine, qui a été décrite dans deux études [Schmidt *et al.*, 2009; Nichol *et al.*, 2010].

La première étude, focalisée sur la différenciation des cellules souches neurales, a décrit un effet antagoniste de la VE-statine sur la signalisation Notch induite par Jagged-1 [Schmidt *et al.*, 2009]. L'effet de Jag1 dans l'angiogenèse tumorale est mal connu. Cependant dans l'angiogenèse normale, il augmente le bourgeonnement, la prolifération des cellules endothéliales et le recrutement des cellules musculaires lisses vasculaires. Il a donc un effet pro-angiogénique via l'inhibition de la

voie Dll4-Notch [Benedito *et al.*, 2009]. Sa surexpression dans une lignée de carcinome à cellules squameuse augmente la croissance tumorale et le nombre de vaisseaux [Zeng *et al.*, 2005]. L'inhibition par la VE-statine de la voie Notch induite par Jagged-1 induirait probablement une diminution de l'angiogenèse dans les tumeurs surexprimant la VE-statine, or ce n'est pas ce qui est observé dans notre modèle.

La seconde étude, centrée sur le rôle de la VE-statine dans l'angiogenèse, a montré un effet antagoniste sur la voie Notch induite par Dll4 dans des cellules endothéliales humaines *in vitro* et dans la rétine, conduisant à un phénotype hyperangiogénique [Nichol *et al.*, 2010]. Plusieurs études ont étudié le rôle de Dll4 dans la tumorigenèse. Le blocage de Dll4 induit une augmentation de l'angiogenèse mais une réduction de la croissance tumorale. En effet, les vaisseaux sont peu fonctionnels : ils sont peu matures, faiblement perfusés, ce qui augmente l'hypoxie dans ces tumeurs et qui réduit la croissance des tumeurs [Noguera-Troise *et al.*, 2006; Schemet *et al.*, 2007]. Ce phénotype ne correspond pas à ce que nous avons observé dans notre étude. Le nombre de vaisseaux dans les tumeurs 4T1-VE est augmenté et ils sont moins fonctionnels que ceux des tumeurs 4T1-Ctrl, cependant la croissance des tumeurs 4T1-VE est augmentée. Il se pourrait donc que dans notre modèle, la VE-statine n'inhibe pas la voie Dll4-Notch. Les mêmes auteurs ont suggéré également un effet antagoniste de la VE-statine sur la voie Notch induite par Dll4 chez l'embryon [Nichol *et al.*, 2010]. L'activation de la voie Dll4 induit une diminution de l'angiogenèse tumorale, ce qui peut avoir des conséquences différentes selon les cellules tumorales : une diminution de la croissance tumorale [Segarra *et al.*, 2008], augmentation de croissance ou aucun effet [Li *et al.*, 2007].

Il semble donc difficile de savoir si la voie Notch est modulée dans notre étude sur la simple comparaison de phénotypes. L'analyse d'un des *PCR Arrays* a montré une augmentation de l'expression de *Hey1* et de *Hey2*, respectivement de 3,5 fois et 2,5 fois, dans une tumeur 4T1-VE comparée à une tumeur 4T1-Ctrl (Figure 39b.). Cela suggère un rôle potentiellement agoniste de la VE-statine sur la voie Notch. Il serait intéressant de confirmer ce résultat sur un plus grand nombre d'échantillons et d'analyser l'expression d'autres gènes cibles de la voie Notch dans les tumeurs surexprimant ou non la VE-statine

5. Rôle de la VE-statine dans l'endothélium normal

Ce travail a permis de montrer que la VE-statine, naturellement produite par les cellules endothéliales, inhibe l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium normal en inhibant l'expression de molécules d'adhérence. En effet, l'inhibition de l'expression du gène *VE-statine* par interférence de l'ARN induit une diminution expression des gènes *ICAM-1*, *VCAM-1* et *E-sélectine*, ce qui augmente l'adhérence des lymphocytes. Ces résultats ont été obtenus par un test d'adhérence statique *in vitro* des leucocytes sur des cellules endothéliales dont l'expression de la VE-statine a été inhibée par interférence de l'ARN. Il serait intéressant d'étudier l'adhérence *in vitro* des leucocytes sur les cellules endothéliales, exprimant ou non la VE-statine, en flux par vidéomicroscopie. Ce flux mime le flux sanguin, ce modèle se rapproche donc plus des conditions physiologiques. De plus, il permettrait

d'étudier si la VE-statine module le nombre de leucocytes qui roule sur l'endothélium, la vitesse du roulement et le nombre de leucocytes adhérents.

Le mécanisme moléculaire par lequel la VE-statine inhibe l'expression de ces protéines n'est pas encore connu. Il est possible que la VE-statine, produite par les cellules endothéliales et présente au niveau de la matrice extracellulaire, se fixe à un récepteur endothélial, encore inconnu, ce qui déclencherait une voie de signalisation qui inhiberait l'expression des molécules d'adhérence.

Une étude récente a décrit une diminution de l'expression d'ICAM-1 en présence de VE-statine recombinante via l'inhibition de l'activation du facteur NF- κ B [Badiwala *et al.*, 2010]. Il est possible que la diminution de l'expression des molécules d'adhérence que nous observons soit due au même mécanisme. En effet, NF- κ B régule la transcription de nombreuses molécules impliquées dans l'inflammation, dont les molécules d'adhérence ICAM-1 [van de Stolpe *et al.*, 1994] et VCAM-1 [Iademaro *et al.*, 1992]. Des études *in vitro* sont en cours pour voir si la VE-statine module la voie NF- κ B.

A l'heure actuelle, seules les protéines Gal-1 et Del-1 ont été décrites pour être des inhibiteurs, endogènes aux cellules endothéliales, de l'adhérence leucocytaire. Elles possèdent de nombreuses caractéristiques communes avec la VE-statine. Ce sont deux protéines produites par les cellules endothéliales, mais également exprimées dans les tumeurs, par les cellules tumorales ou les cellules stromales [Aoka *et al.*, 2002; Camby *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010]. Elles sont déposées dans la matrice extracellulaire et sont impliquées dans l'angiogenèse [Penta *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2004; Thijssen *et al.*, 2006]. Les mécanismes par lesquels ces molécules inhibent l'adhérence sont différents que celui que nous décrivons pour la VE-statine. Gal-1 possède de nombreux effets anti-inflammatoires, parmi lesquels l'inhibition de l'adhérence des leucocytes. Gal-1, produite par les cellules endothéliales, se lie à la molécule de surface CD43 des lymphocytes T adhérents, empêchant la redistribution de cette molécule à la surface des lymphocytes T nécessaire à leur transmigration endothéliale [He et Baum, 2006]. D'autres études montrent que Gal-1 agit également au niveau des cellules immunitaires en induisant la diminution des molécules d'adhérence CD11b et intégrine β 2 à la surface des polynucléaires neutrophiles [Cooper *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2010]. Pour ce qui est de Del-1, cette protéine interagit par l'intégrine leucocytaire LFA-1, empêchant ainsi l'interaction de LFA-1 avec ses ligands endothéliaux tels qu'ICAM-1 [Choi *et al.*, 2008]. L'adhérence des leucocytes sur l'endothélium est également régulée par le micro-ARN, miR-126, porté par le gène *VE-statine* et exprimé spécifiquement par les cellules endothéliales. Il inhibe l'expression protéique de VCAM-1 induite par le TNF- α , ce qui inhibe l'adhérence des leucocytes sur les cellules endothéliales. Il n'a cependant pas d'effet sur l'expression d'ICAM-1 [Harris *et al.*, 2008].

Au regard des mécanismes d'action de Gal-1 et Del-1, il serait judicieux de regarder si la VE-statine interagit avec les molécules d'adhérence leucocytaire, en effectuant par exemple un test d'adhérence *in vitro* de lymphocytes sur une boîte plastique recouverte de protéine recombinante. Il serait également intéressant de regarder si la VE-statine, qui peut circuler avec le sang, inhibe l'expression de molécules d'adhérence des leucocytes.

Des travaux d'un précédent étudiant en thèse du laboratoire, Bertrand Caetano (thèse soutenue en 2006), ont montré une répression de l'expression du gène *VE-statine* par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-1 β et TNF- α . L'expression de *Del-1* est également inhibée par la cytokine pro-inflammatoire TNF- α [Choi *et al.*, 2008]. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'adhérence par la VE-statine et Del-1 est levée lors d'une réponse inflammatoire et que l'état d'activation de l'endothélium est modulé par l'expression de Del-1 et de la VE-statine.

Lors du déclenchement d'une réponse inflammatoire, l'endothélium quiescent est activé par les cytokines pro-inflammatoires, qui induisent l'expression des molécules d'adhérence par les cellules endothéliales [Bevilacqua, 1993]. L'état quiescent et non-inflammatoire des cellules endothéliales n'est vraisemblablement pas dû qu'à l'absence de ces molécules pro-inflammatoires, mais également à la présence de protéines inhibitrices de l'adhérence leucocytaires, comme Del-1, Gal-1 et la VE-statine, exprimées par les cellules endothéliales. Ces protéines, par leur action autocrine, empêche l'adhérence des leucocytes sur les cellules endothéliales, soit en maintenant l'endothélium à l'état quiescent en réprimant l'expression de molécules d'adhérence, soit en empêchant les interactions entre les cellules endothéliales et les leucocytes.

Pour résumer, ces travaux sur l'étude du rôle de la VE-statine dans la tumorigenèse nous ont donc amené à découvrir un rôle inattendu de la VE-statine dans la régulation de la réponse inflammatoire. La VE-statine permet de garder l'endothélium dans un état quiescent. Cette propriété est un avantage pour les tumeurs qui expriment la VE-statine, car elle leur permet d'échapper à l'action anti-tumorale du système immunitaire.

Récemment, une analyse de l'expression de la VE-statine dans le cancer du sein a été effectuée par l'équipe (article en rédaction). L'expression du gène *VE-statine* et la présence de la protéine au niveau des cellules tumorales a été détectée dans des carcinomes mammaires humains de stades différents. Il serait maintenant intéressant de vérifier si les tumeurs humaines qui surexpriment la VE-statine présentent une baisse de l'expression de molécules d'adhérence au niveau des vaisseaux, ainsi qu'une diminution de l'infiltration leucocytaire.

MATERIEL et METHODES

I. Surexpression de la VE-statine et tests *in vitro*

A. Cellules

Les cellules cancéreuses murines utilisées ont été la lignée 4T1 (ATCC CRL-2539, donnée par le Dr Gilles PAGES, Nice) issue d'un carcinome mammaire et la lignée LCC-1 (*Lung Lewis Carcinoma*, ATCC CRL-1642) issue d'un adénocarcinome du poumon. Les cellules endothéliales primaires humaines proviennent de veine de cordon ombilical (HUVEC, Lonza). Les cellules HEK-GP (Clontech) ont été utilisées pour la production de virus. Les lymphocytes T utilisés ont été la lignée immortalisée Jurkat.

Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur 95% d'air et 5% CO₂ en atmosphère humide. Les 4T1 et les Jurkat ont été cultivées dans du milieu RPMI, 10 % sérum de veau fœtal, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine. Les LLC1 et les HEK-GP ont cultivées dans du milieu DMEM, 10 % sérum de veau fœtal, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, à l'exception des clones c1 et c62 inductibles par la tétracycline. Ces derniers ont été cultivés dans du DMEM 10 % sérum de veau fœtal garanti sans tétracycline (Clontech) et 25 µg/ml gentamycine. Les HUVEC ont été cultivées selon les recommandations du fournisseur en milieu EGM-2 et utilisées entre les passages 1 à 5.

B. Stratégies de surexpression de la VE-statine

➤ Surexpression par des clones stables inductibles

L'ADNc de la VE-statine murine de pleine longueur, avec une étiquette C-terminale codant la séquence de *l'influenza hemagglutinin* (HA) a été inséré dans les sites EcoRI/BamHI du vecteur pSTAR [Zeng *et al.*, 1998]. Ce vecteur de type « Tet-ON » permet la surexpression de la VE-statine en présence de doxycycline et confère une résistance à la néomycine. Les cellules LLC-1 (ensemencées la veille à 15000 cellules/cm²) ont été transfectées avec cette construction (1 µg) avec de la Lipofectamine 2000 (6 µl/µg, Invitrogen) et des clones cellulaires ont été sélectionnés en présence de Geneticine® (0,8 mg/ml, Gibco). La production de VE-statine-HA et son inductibilité par la doxycycline ont été vérifiées par RT-qPCR et par Western blot. Pour cela, les clones ont été incubés pendant 2 jours en absence (- Dox) ou en présence (+ Dox) de 2 µg/ml de doxycycline (Sigma), ou en présence de doxycycline pendant 2 jours suivi d'un jour de déplétion (Stop).

➤ Surexpression rétrovirale

L'ADNc de la VE-statine murine de pleine longueur avec une étiquette HA en C-terminal, a été cloné dans la cassette de clonage MCS (*Multiple Cloning Site*) du plasmide pMSCV (Clontech). Les HEKGP (25000 cellules/cm²) ont été transfectées avec le réactif Exgen 500 (3 µl/µg d'ADN, Euromedex), soit avec les plasmides pMSCV contrôle (1,6 µg) et pVSV-G (codant pour des protéines de l'enveloppe virale, 0,4 µg), soit avec le pMSCV-VE-statine-HA (1,6 µg) et le pVSV-G (0,4 µg). Après 48 h, les surnageants des HEKGP transfectées, contenant les rétrovirus contrôle ou codant pour la VE-statine, ont été filtrés et mis au contact des cellules 4T1 ou LLC1 ensemencées (25000

cellules/cm²), en présence de polybrène. Après une centrifugation d'1 h à 250 g des plaques de culture, les cellules ont été remises à l'incubateur. Les cellules 4T1 et LLC-1 infectées ont été ensuite sélectionnées pour leur résistance à la puromycine (4 µg/ml) pendant 7 jours. L'expression de la VE-statine par les cellules a été vérifiée par RT-qPCR et par Western blot.

C. Tests *in vitro*

➤ **Adhérence statique des lymphocytes T**

La capacité des lymphocytes T à adhérer aux cellules endothéliales a été évaluée par un test d'adhérence statique.

Pour évaluer le rôle de la VE-statine, les HUVEC à confluence ont été mises en contact de la VE-statine contenue dans des milieux conditionnés 24 h avant le test d'adhérence. Les milieux conditionnés ont été obtenus par incubation de 4T1-Ctrl ou 4T1-VE (20x10³ cellules/cm²) avec de l'EBM2, 0,2 % BSA pendant 24 h. Les surnageants ont été filtrés (0,22 µm) avant utilisation.

Pour l'approche d'interférence de l'ARN, les HUVEC ont étéensemencées dans des puits de 2 cm² (25000 cellules/cm²) et transfectées le lendemain avec 10 nM de siRNA (Dharmacon) préparé dans du réactif *Primefect siRNA* (0,125 µl/cm², Lonza) et mélangé à de l'EGM-2. Après 24 h, de l'EGM-2 a été ajouté et les cellules ont été cultivées pendant 24 à 48 heures.

Les cellules Jurkat (1x10⁶) ont été marquées par un marqueur fluorescent, le Dil (2µM, 10 min, 37°C, Molecular Probes). Les cellules (10⁵ cellules/cm²) ont été mises en contact avec une monocouche d'HUVEC confluentes et incubées pendant 20 min à température ambiante. Les cellules ont été lavées en PBS et les Jurkat fluorescentes ont été comptées sous un microscope fluorescent.

➤ **Prolifération cellulaire *in vitro***

Pour l'étude des clones inductibles, les cellules c1, c62 et LLC1 ont étéensemencées à 2500 cellules/cm² et cultivées en absence ou en présence de 2 µg/ml de doxycycline. Les 4T1 ont étéensemencées à 1250 cellules/cm². Les cellules ont été trypsinées quotidiennement et comptées avec un compteur de cellules (Beckman Coulter Z2).

➤ **Migration**

Pour les tests de migration, 5x10⁴ cellules ont étéensemencées dans une chambre de type Boyden, sur une membrane avec des pores de 8 µm de diamètre (0,3 cm², Falcon). Après 24h d'incubation à 37°C, les cellules ont été trypsinées et comptées. Le nombre de cellules ayant migré a été rapporté au nombre de cellules totales.

➤ **Croissance en agar mou**

Pour les tests de croissance de façon indépendante de l'ancrage, la première couche est composée de 0,6 % d'agar dans du milieu de culture et a été coulée à 37°C dans des puits de 10 cm² et laissée solidifier à 22°C. Les cellules ont été mélangées avec de l'agar 0,45 % dans du milieu de culture à 37°C et la deuxième couche a été coulée. Pour l'étude des clones inductibles, la densité

cellulaire des LLC1, c1 et c62 était de 500 cellules/cm² et les cellules ont été mises en présence ou non de doxycycline (2 µg/ml) dans les deux couches d'agar. Pour l'étude de la surexpression virale, la densité des LLC1 et des 4T1 infectées était de 250 cellules/cm². Après solidification de la seconde couche, les cellules ont été cultivées pendant 6 jours pour l'émergence des clones inductibles et pendant 10 et 14 jours respectivement pour les LLC1 et 4T1 infectées. Les puits ont été photographiés et le nombre de colonies a été évalué avec le logiciel ImageJ v1.42q.

II. Etude de la tumorigenèse in vivo

A. Modèles tumoraux

Des souris, BALB/c, C57BL/6 et SCID Beige, femelles âgées de 8 semaines injectées à 9 semaines, ont été obtenues chez Charles River. Les souris ont été hébergées dans l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille en accord avec la législation européenne. Tous les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique local (approbation CEEA02/2009).

Pour l'étude des clones inductibles, les LLC1 et c1 (1×10^6 /100 µl PBS) ont été injectées en voie sous cutanée au niveau du flanc de souris syngéniques C57BL/6. Pour la condition « + Dox », les cellules ont été incubées avec la doxycycline 72 h avant l'injection. De l'eau normale (LLC1, c1 - Dox) ou contenant 0,5 mg/ml de doxycycline (c1 + Dox) a été distribuée aux souris. Pour l'étude de l'effet de la surexpression par infection virale, les cellules (5×10^5 /50 µl PBS) ont été injectées en voie sous-cutanée chez des souris C57BL/6 pour les LLC1 et dans la glande mammaire de souris syngéniques BALB/C ou immunodéprimées SCID Beige pour les 4T1.

Les dimensions des tumeurs ont été mesurées régulièrement à l'aide d'un pied à coulisse électronique et le volume tumoral calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Volume} = \text{largeur (mm)} \times \text{largeur (mm)} \times \text{longueur (mm)} \times \pi/6 \text{ [Tomayko et Reynolds, 1989]}$$

B. Perfusion des vaisseaux tumoraux

La perméabilité des vaisseaux sanguins a été évaluée après à l'injection de 100 µl de PBS contenant 0,5 mg/ml de *Lycopersicon esculentum* lectine-FITC (Vector Laboratories) et 2,5 mg/ml Dextran (70kD) -Texas Red (Molecular Probes) dans la veine de la queue. Après 10 min, les souris ont été euthanasiées, les tumeurs ont été collectées et congelées. Des coupes congelées de 10 µM ont été coupées et montées en milieu aqueux (Mowiol) et observées par microscopie à fluorescence.

L'hypoxie a été estimée par injection intra-péritonéale d'une solution de 0,15 M NaCl, 60 mg/kg de pimonidazole Hcl (Hypoxyprobe, HPI). Après 30 min, les souris ont été sacrifiées, les tumeurs collectées et traitées pour une inclusion en paraffine.

C. Analyse histologique des tumeurs et des poumons

1. Préparation des échantillons

Les tumeurs et les poumons prélevés après sacrifice ont soit été directement congelés, soit fixés au paraformaldéhyde (PFA) et inclus en paraffine.

Coupes congelées : Les tumeurs ont été congelées directement après prélèvement dans de l'azote liquide. Elles ont été incluses dans le milieu d'enrobage OCT, qui a été ensuite plongé dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide. Une fois congelés, les blocs ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les échantillons ont été débités en coupes sériées de 10 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat.

Coupes paraffine : Les tumeurs et les poumons ont été fixés la nuit avec une solution de PBS, 4% PFA à 4°C. La fixation est réduite à 4 h à température ambiante pour les tumeurs prélevées moins de 7 jours après implantation (volumes inférieurs à 50 mm³). Après deux lavages au PBS de 5 min, les échantillons ont été incubés dans de l'éthanol (EtOH) 70% pendant une journée minimum à 4°C, puis la déshydratation des échantillons a été poursuivie par des bains d'EtOH 100% (2 x 1 h) et des bains de toluène (4 x 1 h). Les échantillons ont été ensuite plongés dans un bain composé de 50% de toluène et 50% de paraffine pendant 3 h, suivi d'un bain de paraffine pendant une nuit. La paraffine a été renouvelée le lendemain puis le surlendemain et les échantillons ont été inclus le soir. Les tumeurs et les poumons ont été débités en coupes sériées de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome.

2. Anticorps utilisés

Les anticorps primaires ont été utilisés aux dilutions indiquées dans le **Tableau 6**. Les anticorps secondaires ont été dilués et incubés pendant 45 min à 1 h à température ambiante (**Tableau 7**).

	Antigène reconnu	Couplage	Type, Hôte	Dilution	Fournisseur, référence
Anticorps primaires	CD3ε	-	Polyclonal, Lapin	1/100	Abcam, ab5690
	CD4	Biotine	Monoclonal, Rat	1/100	BD-Pharmigen, 553649
	CD8	-	Monoclonal, Rat	1/100	BD-Pharmigen, 550281
	CD11c	APC	Monoclonal, Hamster arménien	1/250	BD-Pharmigen, 550261
	CD19	APC	Monoclonal, Rat	1/250	BD-Pharmigen, 561738
	CD31/PECAM	-	Monoclonal, Rat	1/100	BD-Pharmigen, 550274
	CD68		Monoclonal, Rat	1/100	Abcam, ab53444
	Collagène IV		Polyclonal, Lapin	1/100	Abcam, ab6586
	Hypoxyprobe		Monoclonal, Souris	1/100	HPI
	Ki67		Monoclonal, Lapin	Non Dilué	Roche, Ventana 30-9
	ICAM-1		Monoclonal, Rat	1/1000	Abcam, ab25375
	NKp46		Polyclonal, Chèvre	1/100	R&D, AF2225
	Péripiline		Polyclonal, lapin	1/50	Santa Cruz, sc-67164
	VCAM-1		Monoclonal, Rat	1/250	BD-Pharmigen, 550547
	VE-statine		Monoclonal, Homme (phage)	1/500	AbyD
VEGFR3	Monoclonal, Rat		1/50	BD-Pharmigen, 552857	

Tableau 6 : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.

	Antigène reconnu	Couplage	Hôte	Dilution	Fournisseur, référence
Anticorps secondaires	IgG d'Homme	Biotine	Chèvre	1/500	Jackson, 109-065-097
	IgG de lapin	Biotine	Chèvre	1/250	Vector, BA-1000
	IgG de rat	Biotine	Lapin	1/250	Vector, BA-4001
	IgG de souris	Biotine	Ane	1/100	Jackson IR, 715-065-151
	IgG de chèvre	Biotine	Lapin	1/250	Jackson IR, 305-066-006
	IgG de rat	Alexa-594	Chèvre	1/500	Invitrogen, A11007
	IgG de lapin	Alexa-488	Chèvre	1/500	Invitrogen, A11008

Tableau 7 : Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages.

3. Immunohistochimie pour microscopie dans le visible

a) Marquage manuel

➤ Etapes communes pour les différents marquages

Réhydratation : Les coupes ont été réhydratées dans des bains successifs de toluène (2 x 10 min), EtOH 96 % (2 x 5 min), EtOH 70% (5min), EtOH 30% (5min) et eau (3 x 5 min).

Démasquage des antigènes : Les antigènes ont été démasqués, soit par **traitement à la trypsine** pendant 15 min à 37°C (Trypsine 0,25 g/l de poudre 1 :250 Gibco, 9,1 mM CaCl₂, Tris-HCl 0.05M pH 7,8), soit par **traitement avec un tampon citrate** (*Antigen Unmasking Solution*, H3300, Vector) à 90°C pendant 20 min puis refroidissement 20 min à t température ambiante.

Inhibition des peroxydases endogènes : Les peroxydases endogènes ont été inactivées en incubant les lames dans une solution de méthanol, 0,3 % de H₂O₂ (20 min), sauf pour le marquage de l'hypoxyprobe pour lequel une solution de 0,3 % de H₂O₂ dans de l'eau distillée (5 min) a été utilisée.

Révélation, contre-coloration et montage : La révélation a été effectuée grâce au substrat de la peroxydase contenu dans le kit DAB (SK-4100, Vector). Après contrôle du marquage au microscope, la réaction a été arrêtée à l'eau du robinet. Les coupes ont ensuite été contre-colorées avec de l'Hémalun de Mayer pendant 10 à 30 sec. Après un rinçage abondant à l'eau du robinet, la contre-coloration a été bleuie par un traitement à l'ammoniaque 0,2 % pendant 1 min puis rincée à l'eau distillée. Les coupes ont été déshydratées par des bains successifs d'EtOH croissant (passage rapide dans EtOH 50%, 70% ; EtOH 100% 2 x 3 min) puis des bains de toluène (2 x 5 min). Les lames ont été montées en milieu non aqueux (Vectamount, Vector).

➤ Coloration hématoxyline/éosine

Après déparaffinage, les lames ont été plongées dans un bain d'Hémalun de Mayer (Labo-Moderne) pendant 2 min 30 puis rincées abondamment à l'eau du robinet. Elles ont été ensuite immergées dans de l'éosine 1% (Labo-Moderne). Après un rinçage à l'eau distillée, les coupes ont été déshydratées puis montées sous lamelle avec du Vectamount (Vector).

➤ Marquage des vaisseaux par IHC CD31/PECAM

Les coupes déparaffinées ont été traitées à la trypsine, puis après lavage au PBS (3 x 5 min), les peroxydases endogènes ont été inactivées. Après lavage au PBS (3 x 5 min), les antigènes ont été bloqués pendant 30 min avec une solution de blocage (TNB, kit *TSA Biotin Biosystem*, Perkin Elmer), puis l'anticorps primaire anti-CD31 dilué au 1/100 en TNB a été incubé 1 h à 37°C. Après 3 lavages de 5 min en TNT (0.1M Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20), l'anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de rat dilué au 1/250 en TNB a été incubé pendant 1 h, puis les coupes ont été lavées en TNT (3 x 5 min). Le signal a été amplifié grâce au kit TSA utilisé selon les recommandations du fournisseur. Après révélation, les lames ont été contre-colorées avec de l'Hémalun de Mayer et montées en Vectamount (Vector).

➤ **Marquage des vaisseaux lymphatiques (VEGFR3)**

Après déparaffinage, les antigènes ont été démasqués par traitement citrate. Les coupes ont été lavées au PBS, puis les peroxydases endogènes ont été inactivées et les lames ont été rincées au TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl) 3 fois 5 min. L'anticorps anti-VEGFR3, dilué en 1/50 en TBS, a été incubé 2 h, et après 3 lavages au TBS de 5 min, l'anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de rat, dilué au 1/250 en TBS, a été incubé pendant 45 min. Suite à 2 lavages au TBS de 5min puis 1 lavage au Tris HCl 50 mM ph 7,5, le signal a été amplifié pendant 45 min avec le kit ABC (Vectastain, Vector) utilisé selon les recommandations du fournisseur. Après 3 lavages (50 mM Tris pH 7,5, 3 x 5 min), le signal a été révélé et les coupes ont été contre-colorées avec de l'Hémalun de Mayer et montées en Vectamount (Vector).

➤ **Marquage des vésicules lipidiques (périlipine)**

Le protocole a été donné par l'équipe U545 de Bart Staels, Lille. Après déparaffinage, les peroxydases endogènes ont été inactivées puis les lames ont été rincées au PBS. Les antigènes ont été démasqués par traitement citrate. Les lames ont ensuite été incubées dans une solution de PBS, 0,1 % Triton X100 pendant 10 min. Les antigènes ont été bloqués avec une solution de PBS, 1 % BSA, 5 % de sérum de chèvre pendant 30 min. Les biotines endogènes ont été bloquées avec le kit *Avidin-Biotin blocking kit* (Vector, SP-2001) selon les recommandations du fournisseur. L'anticorps anti-périlipine, dilué au 1/50 en PBS, 1 % BSA, a été incubé sur la nuit à 4°C. Après lavage au TBS (2 x 5 min), l'anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de chèvre dilué au 1/250 en PBS, 1 % BSA, 2 % sérum de souris, a été incubé pendant 45 min. Suite au lavage en PBS (5min), le signal a été amplifié pendant 45 min avec le kit ABC (Vectastain, Vector) utilisé selon les recommandations du fournisseur. Après 3 lavages de 5 min au PBS, le signal a été révélé et les coupes contre-colorées avec de l'Hémalun de Mayer et montées en Vectamount (Vector).

➤ **Marquage des zones hypoxiques (Hypoxyprobe)**

L'hypoxyprobe a été détectée en suivant les recommandations du fournisseur. Après déparaffinage, les peroxydases endogènes ont été inactivées, puis les antigènes ont été démasqués avec traitement citrate. Les coupes ont été lavées avec du TBST (50 mM Tris pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20) pendant 5 min. Les antigènes ont été bloqués avec une solution de TBST, 2 % BSA, 1/5 de sérum de chèvre pendant 30 min. Les anticorps ont été dilués dans du TBST, BSA 2 %. L'anticorps anti-hypoxyprobe, dilué au 1/100, a été incubé pendant 40 min, puis après lavage au TBST (5 min), l'anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de souris, dilué au 1/100, a été incubé pendant 10 min. Le signal a été amplifié avec le kit ABC puis révélé. Les coupes ont été contre-colorées avec de l'Hémalun de Mayer et montées en Vectamount (Vector).

➤ **Marquage des lymphocytes T (CD3ε)**

Après déparaffinage, les peroxydases endogènes ont été inactivées puis les lames ont été rincées au TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl). Les antigènes ont été démasqués par traitement citrate, puis les coupes ont été bloquées avec une solution de TBS, 2 % BSA, 1/5^{ème} de

sérum de chèvre pendant 2 h. Les anticorps ont été dilués en TBS, 2 % BSA. L'anticorps anti-CD3ε, dilué au 1/100, a été incubé sur la nuit à 4°C. Après lavage au TBS (2 x 5 min), l'anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de chèvre, dilué au 1/250, a été incubé pendant 45 min. Suite au lavage en TBS (5min), le signal a été amplifié pendant 45 min avec le kit ABC (Vectastain, Vector) utilisé selon les recommandations du fournisseur. Après lavage (3 x 5 min Tris pH 7,5 50 mM), le signal a été révélé et les coupes contre-colorées avec de l'Hémalun de Mayer et montées en Vectamount (Vector).

➤ **Marquage des cellules NK sur coupes congelées (NKp46)**

Les coupes congelées ont été séchées 90 min à température ambiante, puis post-fixées pendant 10 min avec de l'acétone préalablement refroidi à -20°C. Après lavage 3 x 5min au TBS (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl), les coupes ont été bloquées avec une solution de TBS, 2% BSA et 1/5^{ème} de sérum de lapin pendant 2h. Les anticorps ont été dilués en TBS, 2 % BSA. L'anticorps anti-NKp46, dilué au 1/100, a été incubé sur la nuit à 4°C. Après un lavage de TBS (5 min), les peroxydases endogènes ont été inactivées dans une solution de PBS, 0,3 % de H₂O₂ (20 min). Les coupes ont été lavées (TBS, 2 x 5 min) et incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de lapin, dilué au 1/250, pendant 45 min. Après un lavage TBS, le signal a été amplifié grâce un kit ABC (Vectastain, Vector) pendant 45 min. Après révélation, les lames ont été contre-colorées avec de l'Hémalun de Mayer et montées en Vectamount (Vector).

b) Marquages automatisés

Certains marquages ont été réalisés avec l'automate Ventana Discovery (Roche). Les anticorps ont été dilués dans du *Discovery Diluant Ab* (Ventana, Roche). A la fin du programme automatisé, les coupes ont été déshydratées et montées en milieu non aqueux Vectamount.

Marquage de la VE-statine : Les sites antigéniques ont été démasqués par une protéase (Protéase 1, Ventana, Roche) et les temps d'incubation des anticorps primaire anti-VE-statine, dilué au 1/500, et secondaire anti-IgG d'Homme, dilué au 1/500, ont été, respectivement, d'1 h et de 30 min.

Marquage du collagène IV : Les sites antigéniques ont été démasqués par un traitement citrate (CC1, Ventana, Roche). L'anticorps primaire anti-collagène IV, dilué au 1/100, a été incubé pendant 2 h et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin, dilué au 1/250, a été incubé 30 min.

Marquage des cellules en prolifération : Les cellules en prolifération ont été marquées à l'aide d'un anticorps anti-Ki67 suivant les recommandations du fournisseur Roche.

Marquage des cellules apoptotiques : Les cellules apoptotiques ont été marquées à l'aide de la technique TUNEL grâce au kit *Terminal transferase recombinant kit* (Roche), suivant les recommandations du fournisseur.

4. Immunofluorescence

Les coupes congelées ont été post-fixées avec une solution de PBS, 1 % PFA (5min). Les coupes ont été lavées au TBS (3 x 5min ; 10 mM Tris pH 7,5 ; 150 mM NaCl). Les sites antigéniques ont été bloqués pendant 2h avec une solution de TBS, 1% de BSA et 10% de sérum appartenant à

l'espèce productrice de l'anticorps secondaire si possible. Les coupes ont été incubées, sur la nuit à 4°C, avec l'anticorps primaire dilué en TBS-BSA 1%. Après lavage en TBS (3 x 5 min), l'anticorps secondaire biotinylé ou directement couplé à un fluorochrome a été incubé pendant 1 h à température ambiante. Les coupes ont été lavées au TBS (3 x 5 min). Dans le cas d'un anticorps primaire ou secondaire biotinylé, il a été nécessaire d'incuber les coupes avec une streptavidine couplée à l'Alexa594 ou à l'Alexa488 (Invitrogen) diluée au 1/500^{ème} dans du TBS-BSA 1%. Les noyaux ont été visualisés après incubation avec une solution de DAPI (1 µg/ml, 1 min). Après lavage (TBS, 2 x 5 min), les coupes ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu aqueux (Mowiol).

5. Acquisitions et analyses d'images

La microscopie visible a été réalisée avec un microscope Zeiss Axioplan2 et celle à fluorescence avec un microscope Zeiss AxioImagerZ1 pour la fluorescence et les images ont été acquises avec le logiciel Zeiss AxioVs V4.8.2.0, à l'exception des marquages utilisant un anticorps primaire couplé à l'allophycocyanine (APC) pour lesquels un microscope confocal Zeiss LSM 710 a été utilisé et les images ont été acquises avec le logiciel Zeiss ZEN 2008.

Pour l'analyse de vaisseaux sanguins CD31⁺, les zones les plus riches en vaisseaux (*hotspots* angiogéniques) ont été analysées par quantification du marquage CD31 avec le logiciel ImageJ v1.42q (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009).

Pour l'analyse de la nécrose, les zones nécrotiques ont été identifiées comme les régions non marquées après coloration à l'hématoxyline/éosine.

D. Cytométrie en flux

Cette technique a été réalisée par Dr Christelle FAVEEUW (CIIL, Lille).

Les anticorps suivants proviennent de chez BD Pharmingen, sauf l'anticorps NKp46 qui a été acheté chez Ozyme :

- anti-CD4, CD8, CD45 conjugués au FITC
- anti-CD4, CD45, NKp46 conjugués à la PE
- anti-CD3, CD19 conjugués APC
- purifié anti-CD16/CD32 (553141)
- anti-CD8 conjugué à PE-Cy7

Les rates ont été prélevées et mécaniquement homogénéisées. Les tumeurs ont été prélevées, découpées en petits morceaux et incubées avec de la collagénase VIII (1 mg/ml en PBS, Sigma) et de la DNase I (1 µg/ml en PBS, Sigma) à 37°C pendant 30 min. Les morceaux ont ensuite été homogénéisés dans du PBS 2 % de sérum de veau fœtal et filtrées sur des membranes 90 µm. Pour les rates et les tumeurs, les érythrocytes ont été retirés avec un tampon de lyse *Red Blood Cell Lysing Buffer* (Sigma, R7757) après lavage. Les cellules vivantes ont été comptées et les cellules mortes ont été visualisées au bleu Trypan (Sigma).

Pour l'analyse de cytométrie en flux, 2 à 5 x10⁵ cellules/puits ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et resuspendues dans 50 µl de PBS, 2% de sérum de veau fœtal contenant un

anticorps rat anti-souris CD16/32 (blocage des récepteurs Fc) dilué au 1/40^{ème} pendant 20 min sur glace. Après lavage, les cellules ont été resuspendues dans 50 µl de PBS, 2% de sérum de veau foetal contenant un anticorps anti-CD45 conjugué FITC ou à la phycoérythrine (PE) pendant 30 min sur glace. Après deux lavages, les cellules ont été incubées pendant 30 min sur glace avec la combinaison d'anticorps appropriée afin d'identifier les cellules mononuclées. Après le dernier lavage, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS et les cellules mortes ont été marquées par du 7-AAD (5 µl /tube, eBioscience) afin de pouvoir les exclure de l'analyse.

Les cellules mononuclées, sélectionnées pour leurs marquages CD45⁺ et 7-AAD⁻, ont été analysées sur un cytomètre FACS Calibur (rates) ou sur un cytomètre LSR Fortessa (tumeurs) avec le logiciel FACSDiva (Becton Dickinson).

III. Analyse des taux d'ARNm et de protéines

A. RT-PCR quantitative

Les cellules ont été lysées et les tumeurs broyées en Trizol (Life Technologies). Les ARNs totaux et les micro-ARNs ont été extraits suivant les recommandations du fournisseur. La transcription inverse a été effectuée avec le kit *High capacity cDNA reverse transcription kit Taqman* (Life Technologies) et celle de miR-126-3p et miR-126-5p a été effectuée avec le kit *microRNA reverse transcription kit* (Life Technologies).

Les PCR quantitatives ont été effectuées avec des réactifs et des sondes Taqman (Applied Biosystems) selon les recommandations du fournisseur, sauf pour la quantification des marqueurs des cellules de l'immunité. Pour ces marqueurs, les qPCR ont été effectuées avec du Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) contenant 0,15 µM de chaque sonde (**Tableau 8**). Les PCR ont consisté en 40 cycles de [95°C/15sec, 60°C/1min]. Une courbe de fusion a été effectuée après chaque réaction. Pour chaque gène, les conditions ont été mises au point afin d'obtenir une amplification linéaire pour les plages de valeurs analysées.

Cible	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>CD3ε</i>	5'-aacacgtactgtaccgaaagctc	5'-gatgattatggctactgctgtca
<i>CD4</i>	5'-ccttaggttgacatggagagaa	5'-cccctgacagagtgcacaaca
<i>CD8</i>	5'-cgtgtccctcatggcagaa	5'-aacaagataacgtgggacgagaa
<i>CD19</i>	5'-ttccttctatcccacacaag	5'-gcttcccaataaacccaat
<i>CD94</i>	5'-ccttttctggattggaatgca	5'-tgagggaaactgtgccatcct
<i>CD68</i>	5'-tggcggtggaatacaatgtg	5'-gatgaattctgcgcatgaa

Tableau 8 : Amorces utilisées pour vérifier l'expression des marqueurs des cellules immunitaires

Les oligonucléotides ont été fournis par Isabelle Wolowczuk (UMR 8199, Lille).

Les données ont été exprimées en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où :

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Gène cible}} - Ct_{\text{Actine}} \text{ et } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{référence}}.$$

B. PCR Array

Pour analyser un large panel d'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, nous avons utilisé 2 *RT² ProfilerTM PCR Array* (SABiosciences) : *Mouse Angiogenesis* (PAMM-024A) et *Mouse Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors* (PAMM-072A).

Les tumeurs ont été broyées en Trizol (Life Technologies) et les ARNs totaux ont été extraits suivant les recommandations de SABiosciences. La qualité des ARN a été vérifiée avec un Bioanalyser (Agilent). La reverse-transcription a été effectuée avec le kit *RT² First Strand Kit* (SABiosciences, C-03). Les PCR quantitatives ont été effectuées avec le kit *RT² SYBR[®] Green/RoxTM qPCR Master Mix* (SABiosciences, PA-012) et les *PCR Arrays* précités. L'analyse des données a été faite selon les recommandations du fournisseur.

C. Western-blot

Les protéines ont été extraites en tampon RIPA (PBS, 1 % Igepal CA-630, 0,5 % désoxycholate de sodium, 0,1 % SDS) avec inhibiteur de protéases (cOmplete, Roche), analysées par SDS-PAGE 12% et transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon-P, Millipore). La membrane a été bloquée pendant 1 h avec une solution de 5 % lait écrémé dilué en PBST (PBS, 0,1 % Tween 20 sauf pour le Western-blot anti-HA, 0,25 %). L'anticorps primaire a été dilué (**Tableau 9**) et incubé dans le même tampon pendant 2 h. Après 3 lavages de 10 min au PBST, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP, **Tableau 9**) dilué au 1/10000, a été incubé pendant 45 min. Après 3 nouveaux lavages de 10 min au PBST, les membranes ont été révélées avec un kit de chimioluminescence (Western Lightning[®]-ECL, Perkin Elmer), puis, soit les membranes ont été exposées en présence de films autoradiographiques, soit la chimioluminescence a été mesurée avec un système LAS3000 (Fujifilm). L'intensité des bandes correspondant à la caspase 3 clivée a été quantifiée avec le logiciel Multigauge v3.0.

	Cible	Dilution	Fournisseur, référence
Anticorps primaires	HA	1/1500	Covance, HA.11 Clone 16B12
	hVE-statine	1/1000	R&D Systems, AF3638
	Caspase 3 clivée	1/1000	Cell signaling, 9664S
	Actine	1/1000	Santa Cruz Biotechnology, sc-1615
Anticorps secondaires couplés HRP	IgG de souris	1/10000	Amersham
	IgG de lapin	1/10000	Amersham
	IgG de chèvre	1/10000	Sigma

Tableau 9 : Anticorps utilisés pour les Western-blot.

D. Protein Array

Afin d'analyser l'expression d'un panel de protéines, nous avons utilisé 2 *Proteome ProfilerTM (Antibody Arrays)*, R&D Systems) : *Mouse Angiogenesis Array Kit* (ARY015) et *Mouse Cytokine Array Panel A* (ARY006) selon les recommandations du fournisseur. Les membranes ont été révélées avec un kit de chimioluminescence (Western Lightning[®]-ECL, Perkin Elmer). La chimioluminescence a été

mesurée avec un système LAS3000 (Fujifilm). L'intensité des signaux ont été quantifiée avec le logiciel Multigauge v3.0.

IV. Statistiques

Le test de Mann-Whitney-Wilcoxon a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes entre les groupes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Les barres d'erreur sur les graphes représentent les erreurs standard.

BIBLIOGRAPHIE



- Acevedo, L, Yu, J, Erdjument-Bromage, H, Miao, RQ, Kim, J-E, Fulton, D, Tempst, P, Strittmatter, SM, Sessa, WC. 2004. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nat. Med* 10: 382-388.
- Adams, RH, Alitalo, K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 8: 464-478.
- Almand, B, Clark, JI, Nikitina, E, van Beynen, J, English, NR, Knight, SC, Carbone, DP, Gabrilovich, DI. 2001. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J. Immunol* 166: 678-689.
- Alon, R, Kassner, PD, Carr, MW, Finger, EB, Hemler, ME, Springer, TA. 1995. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol* 128: 1243-1253.
- Amento, EP, Ehsani, N, Palmer, H, Libby, P. 1991. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb* 11: 1223-1230.
- Aoka, Y, Johnson, FL, Penta, K, Hirata Ki, K-ichi, Hidai, C, Schatzman, R, Varner, JA, Quertermous, T. 2002. The embryonic angiogenic factor Del1 accelerates tumor growth by enhancing vascular formation. *Microvasc. Res* 64: 148-161.
- Badiwala, MV, Tumiaty, LC, Joseph, JM, Sheshgiri, R, Ross, HJ, Delgado, DH, Rao, V. 2010. Epidermal growth factor-like domain 7 suppresses intercellular adhesion molecule 1 expression in response to hypoxia/reoxygenation injury in human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 122: S156-161.
- Balmain, A, Brown, K, Akhurst, RJ, Fee, FM. 1988. Molecular analysis of chemical carcinogenesis in the skin. *Br. J. Cancer Suppl* 9: 72-75.
- Baluk, P, Morikawa, S, Haskell, A, Mancuso, M, McDonald, DM. 2003. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol* 163: 1801-1815.
- Barbera-Guillem, E, Nyhus, JK, Wolford, CC, Friece, CR, Sampsel, JW. 2002. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res* 62: 7042-7049.
- Barker, HE, Chang, J, Cox, TR, Lang, G, Bird, D, Nicolau, M, Evans, HR, Gartland, A, Erler, JT. 2011. LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res* 71: 1561-1572.
- Barreiro, O, Yanez-Mo, M, Serrador, JM, Montoya, MC, Vicente-Manzanares, M, Tejedor, R, Furthmayr, H, Sanchez-Madrid, F. 2002. 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.
- Barry-Hamilton, V, Spangler, R, Marshall, D, McCauley, S, Rodriguez, HM, Oyasu, M, Mikels, A, Vaysberg, M, Ghermazien, H, Wai, C, Garcia, CA, Velayo, AC, Jorgensen, B, Biermann, D, Tsai, D, Green, J, Zaffryar-Eilot, S, Holzer, A, Ogg, S, Thai, D, Neufeld, G, Van Vlasselaer, P, Smith, V. 2010. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat. Med* 16: 1009-1017.
- Bartel, DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
- Baum, LG, Seilhamer, JJ, Pang, M, Levine, WB, Beynon, D, Berliner, JA. 1995. Synthesis of an endogenous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation. *Glycoconj. J* 12: 63-68.
- Baumhuter, S, Singer, MS, Henzel, W, Hemmerich, S, Renz, M, Rosen, SD, Lasky, LA. 1993. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262: 436-438.
- Benedito, R, Roca, C, Sörensen, I, Adams, S, Gossler, A, Fruttiger, M, Adams, RH. 2009. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137: 1124-1135.
- Berdasco, M, Esteller, M. 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev. Cell* 19: 698-711.

- Berg, EL, McEvoy, LM, Berlin, C, Bargatze, RF, Butcher, EC. 1993. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 366: 695-698.
- Berlin, C, Berg, EL, Briskin, MJ, Andrew, DP, Kilshaw, PJ, Holzmann, B, Weissman, IL, Hamann, A, Butcher, EC. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74: 185-195.
- Bevilacqua, MP. 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol* 11: 767-804.
- Bevilacqua, MP, Stengelin, S, Gimbrone, MA, Jr, Seed, B. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243: 1160-1165.
- Blank, C, Gajewski, TF, Mackensen, A. 2005. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother* 54: 307-314.
- Bouzin, C, Brouet, A, De Vriese, J, Dewever, J, Feron, O. 2007. Effects of vascular endothelial growth factor on the lymphocyte-endothelium interactions: identification of caveolin-1 and nitric oxide as control points of endothelial cell anergy. *J. Immunol* 178: 1505-1511.
- Bromberg, JF, Horvath, CM, Wen, Z, Schreiber, RD, Darnell, JE, Jr. 1996. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 7673-7678.
- Brustein, M, Kraal, G, Mebius, RE, Watson, SR. 1992. Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing receptor. *J. Exp. Med* 176: 1415-1419.
- Bui, JD, Carayannopoulos, LN, Lanier, LL, Yokoyama, WM, Schreiber, RD. 2006. IFN-dependent down-regulation of the NKG2D ligand H60 on tumors. *J. Immunol* 176: 905-913.
- Cabrera, CM, Jiménez, P, Cabrera, T, Esparza, C, Ruiz-Cabello, F, Garrido, F. 2003. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 61: 211-219.
- Cabrera, T, Collado, A, Fernandez, MA, Ferron, A, Sancho, J, Ruiz-Cabello, F, Garrido, F. 1998. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 52: 114-123.
- Cairns, RA, Harris, IS, Mak, TW. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 85-95.
- Camby, I, Le Mercier, M, Lefranc, F, Kiss, R. 2006. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16: 137R-157R.
- Campagnolo, L, Leahy, A, Chitnis, S, Koschnick, S, Fitch, MJ, Fallon, JT, Loskutoff, D, Taubman, MB, Stuhlmann, H. 2005. EGFL7 is a chemoattractant for endothelial cells and is up-regulated in angiogenesis and arterial injury. *Am. J. Pathol* 167: 275-284.
- Campagnolo, L, Moscatelli, I, Pellegrini, M, Siracusa, G, Stuhlmann, H. 2008. Expression of EGFL7 in primordial germ cells and in adult ovaries and testes. *Gene Expr. Patterns* 8: 389-396.
- Campbell, ID, Bork, P. 1993. Epidermal growth factor-like modules. *Current Opinion in Structural Biology* 3: 385-392.
- Campos, L, Rouault, JP, Sabido, O, Oriol, P, Roubi, N, Vasselon, C, Archimbaud, E, Magaud, JP, Guyotat, D. 1993. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 81: 3091-3096.
- Cance, WG, Harris, JE, Iacocca, MV, Roche, E, Yang, X, Chang, J, Simkins, S, Xu, L. 2000. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin. Cancer Res* 6: 2417-2423.
- Carman, CV, Springer, TA. 2004. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol* 167: 377-388.

- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med* 9: 653-660.
- Carmeliet, P, Jain, RK. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473: 298-307.
- Castermans, K, Griffioen, AW. 2007. Tumor blood vessels, a difficult hurdle for infiltrating leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1776: 160-174.
- Cawthorne, C, Swindell, R, Stratford, IJ, Dive, C, Welman, A. 2007. Comparison of doxycycline delivery methods for Tet-inducible gene expression in a subcutaneous xenograft model. *J Biomol Tech* 18: 120-123.
- Chambers, AF, Groom, AC, MacDonald, IC. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2: 563-572.
- Chang, ZL. 2010. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm. Res* 59: 791-808.
- Chen, HL, Gabrilovich, D, Tampé, R, Girgis, KR, Nadaf, S, Carbone, DP. 1996. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat. Genet* 13: 210-213.
- Chen, JJW, Lin, Y-C, Yao, P-L, Yuan, A, Chen, H-Y, Shun, C-T, Tsai, M-F, Chen, C-H, Yang, P-C. 2005. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J. Clin. Oncol* 23: 953-964.
- Choi, EY, Chavakis, E, Czabanka, MA, Langer, HF, Fraemohs, L, Economopoulou, M, Kundu, RK, Orlandi, A, Zheng, YY, Prieto, DA, Ballantyne, CM, Constant, SL, Aird, WC, Papayannopoulou, T, Gahmberg, CG, Udey, MC, Vajkoczy, P, Quertermous, T, Dimmeler, S, Weber, C, Chavakis, T. 2008. Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science* 322: 1101-1104.
- Christofori, G, Semb, H. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci* 24: 73-76.
- Clark, RA, Huang, SJ, Murphy, GF, Mollet, IG, Hijnen, D, Muthukuru, M, Schanbacher, CF, Edwards, V, Miller, DM, Kim, JE, Lambert, J, Kupper, TS. 2008. Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells. *J. Exp. Med* 205: 2221-2234.
- Colombatti, A, Doliana, R, Bot, S, Canton, A, Mongiat, M, Mungiguerra, G, Paron-Cilli, S, Spessotto, P. 2000. The EMILIN protein family. *Matrix Biol* 19: 289-301.
- Coluccia, AML, Perego, S, Cleris, L, Gunby, RH, Passoni, L, Marchesi, E, Formelli, F, Gambacorti-Passerini, C. 2004. Bcl-XL down-regulation suppresses the tumorigenic potential of NPM/ALK in vitro and in vivo. *Blood* 103: 2787-2794.
- Cooper, D, Norling, LV, Perretti, M. 2008. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *J. Leukoc. Biol* 83: 1459-1466.
- Cox, BD, Natarajan, M, Stettner, MR, Gladson, CL. 2006. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J. Cell. Biochem* 99: 35-52.
- Curiel, TJ, Coukos, G, Zou, L, Alvarez, X, Cheng, P, Mottram, P, Evdemon-Hogan, M, Conejo-Garcia, JR, Zhang, L, Burow, M, Zhu, Y, Wei, S, Kryczek, I, Daniel, B, Gordon, A, Myers, L, Lackner, A, Disis, ML, Knutson, KL, Chen, L, Zou, W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med* 10: 942-949.
- Curti, A, Pandolfi, S, Valzasina, B, Aluigi, M, Isidori, A, Ferri, E, Salvestrini, V, Bonanno, G, Rutella, S, Durelli, I, Horenstein, AL, Fiore, F, Massaia, M, Colombo, MP, Baccarani, M, Lemoli, RM. 2007. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁻ into CD25⁺ T regulatory cells. *Blood* 109: 2871-2877.
- Curto, M, Cole, BK, Lallemand, D, Liu, C-H, McClatchey, AI. 2007. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J. Cell Biol* 177: 893-903.

- De Mazière, A, Parker, L, Van Dijk, S, Ye, W, Klumperman, J. 2008. Eglf7 knockdown causes defects in the extension and junctional arrangements of endothelial cells during zebrafish vasculogenesis. *Dev. Dyn* 237: 580-591.
- Desbaillets, I, Ziegler, U, Groscurth, P, Gassmann, M. 2000. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp. Physiol* 85: 645-651.
- Di Lorenzo, A, Manes, TD, Davalos, A, Wright, PL, Sessa, WC. 2011. Endothelial reticulon-4B (Nogo-B) regulates ICAM-1-mediated leukocyte transmigration and acute inflammation. *Blood* 117: 2284-2295.
- Diamond, MS, Staunton, DE, de Fougères, AR, Stacker, SA, Garcia-Aguilar, J, Hibbs, ML, Springer, TA. 1990. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol* 111: 3129-3139.
- Dighe, AS, Richards, E, Old, LJ, Schreiber, RD. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1: 447-456.
- Dirkx, AEM, Oude Egbrink, MGA, Kuijpers, MJE, van der Niet, ST, Heijnen, VVT, Bouma-ter Steege, JCA, Wagstaff, J, Griffioen, AW. 2003. Tumor angiogenesis modulates leukocyte-vessel wall interactions in vivo by reducing endothelial adhesion molecule expression. *Cancer Res* 63: 2322-2329.
- Dorsey, JF, Cunnick, JM, Mane, SM, Wu, J. 2002. Regulation of the Erk2-Elk1 signaling pathway and megakaryocytic differentiation of Bcr-Abl(+) K562 leukemic cells by Gab2. *Blood* 99: 1388-1397.
- Dovhey, SE, Ghosh, NS, Wright, KL. 2000. Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 60: 5789-5796.
- Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4: 11-22.
- Duda, DG, Cohen, KS, Kozin, SV, Perentes, JY, Fukumura, D, Scadden, DT, Jain, RK. 2006. Evidence for incorporation of bone marrow-derived endothelial cells into perfused blood vessels in tumors. *Blood* 107: 2774-2776.
- Dunn, GP, Bruce, AT, Ikeda, H, Old, LJ, Schreiber, RD. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol* 3: 991-998.
- Dunn, GP, Bruce, AT, Sheehan, KCF, Shankaran, V, Uppaluri, R, Bui, JD, Diamond, MS, Koebel, CM, Arthur, C, White, JM, Schreiber, RD. 2005. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol* 6: 722-729.
- Dunn, GP, Old, LJ, Schreiber, RD. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-148.
- Durrans, A, Stuhlmann, H. 2010. A role for Eglf7 during endothelial organization in the embryoid body model system. *J Angiogenes Res* 2: 4.
- Dvorak, AM, Feng, D. 2001. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J. Histochem. Cytochem* 49: 419-432.
- Dvorak, AM, Kohn, S, Morgan, ES, Fox, P, Nagy, JA, Dvorak, HF. 1996. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J. Leukoc. Biol* 59: 100-115.
- Díaz, R, Silva, J, García, JM, Lorenzo, Y, García, V, Peña, C, Rodríguez, R, Muñoz, C, García, F, Bonilla, F, Domínguez, G. 2008. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 794-802.
- Döme, B, Hendrix, MJC, Paku, S, Tóvári, J, Tímár, J. 2007. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am. J. Pathol* 170: 1-15.
- duPre', SA, Redelman, D, Hunter, KW. 2008. Microenvironment of the murine mammary carcinoma 4T1: endogenous IFN-gamma affects tumor phenotype, growth, and metastasis. *Exp. Mol. Pathol* 85: 174-188.

- Eberle, J, Fecker, LF, Hossini, AM, Wieder, T, Daniel, PT, Orfanos, CE, Geilen, CC. 2003. CD95/Fas signaling in human melanoma cells: conditional expression of CD95L/FasL overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants. *Oncogene* 22: 9131-9141.
- Egeblad, M, Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2: 161-174.
- Enarsson, K, Johnsson, E, Lindholm, C, Lundgren, A, Pan-Hammarström, Q, Strömberg, E, Bergin, P, Baunge, E-L, Svennerholm, A-M, Quiding-Järbrink, M. 2006. Differential mechanisms for T lymphocyte recruitment in normal and neoplastic human gastric mucosa. *Clin. Immunol* 118: 24-34.
- Erler, JT, Bennewith, KL, Cox, TR, Lang, G, Bird, D, Koong, A, Le, Q-T, Giaccia, AJ. 2009. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15: 35-44.
- Erler, JT, Bennewith, KL, Nicolau, M, Dornhöfer, N, Kong, C, Le, Q-T, Chi, J-TA, Jeffrey, SS, Giaccia, AJ. 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440: 1222-1226.
- Etienne-Manneville, S, Manneville, JB, Adamson, P, Wilbourn, B, Greenwood, J, Couraud, PO. 2000. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J. Immunol* 165: 3375-3383.
- Fallarino, F, Gajewski, TF. 1999. Cutting edge: differentiation of antitumor CTL in vivo requires host expression of Stat1. *J. Immunol* 163: 4109-4113.
- Feng, D, Nagy, JA, Pyne, K, Dvorak, HF, Dvorak, AM. 1998. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J. Exp. Med* 187: 903-915.
- Fitch, MJ, Campagnolo, L, Kuhnert, F, Stuhlmann, H. 2004. Egf17, a novel epidermal growth factor-domain gene expressed in endothelial cells. *Dev. Dyn* 230: 316-324.
- Flavell, RA, Sanjabi, S, Wrzesinski, SH, Licona-Limón, P. 2010. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat. Rev. Immunol* 10: 554-567.
- Fleming, RJ. 1998. Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin. Cell Dev. Biol* 9: 599-607.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med* 285: 1182-1186.
- Fukumura, D, Jain, RK. 2007. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc. Res* 74: 72-84.
- Fukumura, D, Xavier, R, Sugiura, T, Chen, Y, Park, EC, Lu, N, Selig, M, Nielsen, G, Taksir, T, Jain, RK, Seed, B. 1998. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94: 715-725.
- Gabrilovich, DI, Chen, HL, Girgis, KR, Cunningham, HT, Meny, GM, Nadaf, S, Kavanaugh, D, Carbone, DP. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med* 2: 1096-1103.
- Gabrilovich, DI, Nagaraj, S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol* 9: 162-174.
- Gallatin, WM, Weissman, IL, Butcher, EC. 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304: 30-34.
- Gao, D, Nolan, DJ, Mellick, AS, Bambino, K, McDonnell, K, Mittal, V. 2008. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 319: 195-198.
- Genentech. 2011. Genentech Pipeline - Anti-EGFL7 Mab [En ligne]. Disponible sur <http://www.gene.com/gene/pipeline/status/oncology/anti-egfl7/>. (Consulté le 02 août 2011)
- Genetet. 2002. *Immunologie*, 4e. EMIInter. 842 p.

- Gerhardt, H, Golding, M, Fruttiger, M, Ruhrberg, C, Lundkvist, A, Abramsson, A, Jeltsch, M, Mitchell, C, Alitalo, K, Shima, D, Betsholtz, C. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol* 161: 1163-1177.
- Gil, CD, Gullo, CE, Oliani, SM. 2010. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. *Int J Clin Exp Pathol* 4: 74-84.
- Girardi, M, Oppenheim, DE, Steele, CR, Lewis, JM, Glusac, E, Filler, R, Hobby, P, Sutton, B, Tigelaar, RE, Hayday, AC. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294: 605-609.
- Greenwald, RJ, Boussiotis, VA, Lorsch, RB, Abbas, AK, Sharpe, AH. 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14: 145-155.
- Griffioen, AW, Coenen, MJ, Damen, CA, Hellwig, SM, van Weering, DH, Vooys, W, Blijham, GH, Groenewegen, G. 1997. CD44 is involved in tumor angiogenesis; an activation antigen on human endothelial cells. *Blood* 90: 1150-1159.
- Griffioen, AW, Damen, CA, Martinotti, S, Blijham, GH, Groenewegen, G. 1996. Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies: the role of angiogenic factors. *Cancer Res* 56: 1111-1117.
- Grivennikov, SI, Greten, FR, Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140: 883-899.
- Groh, V, Wu, J, Yee, C, Spies, T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419: 734-738.
- Guerra, N, Tan, YX, Joncker, NT, Choy, A, Gallardo, F, Xiong, N, Knoblauch, S, Cado, D, Greenberg, NM, Greenberg, NR, Raulet, DH. 2008. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28: 571-580.
- Hanahan, D, Folkman, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364.
- Hanahan, D, Weinberg, RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hanahan, D, Weinberg, RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Handel, TM, Johnson, Z, Crown, SE, Lau, EK, Proudfoot, AE. 2005. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem* 74: 385-410.
- Harris, TA, Yamakuchi, M, Ferlito, M, Mendell, JT, Lowenstein, CJ. 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105: 1516-1521.
- Hashizume, H, Baluk, P, Morikawa, S, McLean, JW, Thurston, G, Roberge, S, Jain, RK, McDonald, DM. 2000. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol* 156: 1363-1380.
- He, J, Baum, LG. 2006. Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. *Lab. Invest* 86: 578-590.
- Hebeda, CB, Teixeira, SA, Muscará, MN, Vinolo, MAR, Curi, R, de Mello, SBV, Farsky, SHP. 2008. In vivo blockade of Ca(+2)-dependent nitric oxide synthases impairs expressions of L-selectin and PECAM-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 377: 694-698.
- Hellström, M, Phng, L-K, Hofmann, JJ, Wallgard, E, Coultas, L, Lindblom, P, Alva, J, Nilsson, A-K, Karlsson, L, Gaiano, N, Yoon, K, Rossant, J, Iruela-Arispe, ML, Kalén, M, Gerhardt, H, Betsholtz, C. 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445: 776-780.
- Hellwig, SM, Damen, CA, van Adrichem, NP, Blijham, GH, Groenewegen, G, Griffioen, AW. 1997. Endothelial CD34 is suppressed in human malignancies: role of angiogenic factors. *Cancer Lett* 120: 203-211.
- Hembrough, TA, Swartz, GM, Papathanassiou, A, Vlasuk, GP, Rote, WE, Green, SJ, Pribluda, VS. 2003. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res* 63: 2997-3000.

- Hendrix, MJC, SefTOR, EA, Hess, AR, SefTOR, REB. 2003. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat. Rev. Cancer* 3: 411-421.
- Hidai, C, Zupancic, T, Penta, K, Mikhail, A, Kawana, M, Quertermous, EE, Aoka, Y, Fukagawa, M, Matsui, Y, Platika, D, Auerbach, R, Hogan, BL, Snodgrass, R, Quertermous, T. 1998. Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: an embryonic endothelial cell protein that binds the alphavbeta3 integrin receptor. *Genes Dev* 12: 21-33.
- Hiratsuka, S, Watanabe, A, Aburatani, H, Maru, Y. 2006. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell Biol* 8: 1369-1375.
- Hirschi, KK, Rohovsky, SA, D'Amore, PA. 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J. Cell Biol* 141: 805-814.
- Ho, H-KV, Jang, JJ, Kaji, S, Spektor, G, Fong, A, Yang, P, Hu, BS, Schatzman, R, Quertermous, T, Cooke, JP. 2004. Developmental endothelial locus-1 (Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia. *Circulation* 109: 1314-1319.
- Holash, J, Maisonpierre, PC, Compton, D, Boland, P, Alexander, CR, Zagzag, D, Yancopoulos, GD, Wiegand, SJ. 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284: 1994-1998.
- Hoshino, R, Chatani, Y, Yamori, T, Tsuruo, T, Oka, H, Yoshida, O, Shimada, Y, Ari-i, S, Wada, H, Fujimoto, J, Kohno, M. 1999. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18: 813-822.
- Hsieh, SH, Ying, NW, Wu, MH, Chiang, WF, Hsu, CL, Wong, TY, Jin, YT, Hong, TM, Chen, YL. 2008. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 27: 3746-3753.
- Huang, B, Pan, P-Y, Li, Q, Sato, AI, Levy, DE, Bromberg, J, Divino, CM, Chen, S-H. 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66: 1123-1131.
- Huang, C-hai, Li, X-jun, Zhou, Y-zeng, Luo, Y, Li, C, Yuan, X-rui. 2010. Expression and clinical significance of EGFL7 in malignant glioma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 136: 1737-1743.
- Iademarco, MF, McQuillan, JJ, Rosen, GD, Dean, DC. 1992. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol. Chem* 267: 16323-16329.
- Im, JH, Fu, W, Wang, H, Bhatia, SK, Hammer, DA, Kowalska, MA, Muschel, RJ. 2004. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 64: 8613-8619.
- Ito, M, Minamiya, Y, Kawai, H, Saito, S, Saito, H, Nakagawa, T, Imai, K, Hirokawa, M, Ogawa, J-ichi. 2006. Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J. Immunol* 176: 5637-5643.
- Jain, RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med* 9: 685-693.
- Joyce, JA, Pollard, JW. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9: 239-252.
- Kalluri, R, Zeisberg, M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 392-401.
- Kaplan, DH, Shankaran, V, Dighe, AS, Stockert, E, Aguet, M, Old, LJ, Schreiber, RD. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95: 7556-7561.
- Kaplan, RN, Riba, RD, Zacharoulis, S, Bramley, AH, Vincent, L, Costa, C, MacDonald, DD, Jin, DK, Shido, K, Kerns, SA, Zhu, Z, Hicklin, D, Wu, Y, Port, JL, Altorki, N, Port, ER, Ruggero, D, Shmelkov, SV, Jensen, KK, Rafii, S, Lyden, D. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438: 820-827.

- Kielty, CM, Sherratt, MJ, Shuttleworth, CA. 2002. Elastic fibres. *J. Cell. Sci* 115: 2817-2828.
- Kim, JM, Rasmussen, JP, Rudensky, AY. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol* 8: 191-197.
- Kim, NW, Piatyszek, MA, Prowse, KR, Harley, CB, West, MD, Ho, PL, Coviello, GM, Wright, WE, Weinrich, SL, Shay, JW. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015.
- Kirkin, V, Joos, S, Zörnig, M. 2004. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1644: 229-249.
- Koebel, CM, Vermi, W, Swann, JB, Zerafa, N, Rodig, SJ, Old, LJ, Smyth, MJ, Schreiber, RD. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450: 903-907.
- Kovács-Sólyom, F, Blaskó, A, Fajka-Boja, R, Katona, RL, Végh, L, Novák, J, Szebeni, GJ, Krenács, L, Uher, F, Tubak, V, Kiss, R, Monostori, E. 2010. Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunol. Lett* 127: 108-118.
- Kubes, P, Suzuki, M, Granger, DN. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88: 4651-4655.
- Kuhnert, F, Mancuso, MR, Hampton, J, Stankunas, K, Asano, T, Chen, C-Z, Kuo, CJ. 2008. Attribution of vascular phenotypes of the murine Egf17 locus to the microRNA miR-126. *Development* 135: 3989-3993.
- Kuo, CJ, Kuhnert, F. 2008. Methods of modulating angiogenesis. *Brevet. US* 2008/0113911 A1.
- Kurnick, JT, Ramirez-Montagut, T, Boyle, LA, Andrews, DM, Pandolfi, F, Durda, PJ, Butera, D, Dunn, IS, Benson, EM, Gobin, SJ, van den Elsen, PJ. 2001. A novel autocrine pathway of tumor escape from immune recognition: melanoma cell lines produce a soluble protein that diminishes expression of the gene encoding the melanocyte lineage melan-A/MART-1 antigen through down-modulation of its promoter. *J. Immunol* 167: 1204-1211.
- Langer, HF, Chavakis, T. 2009. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med* 13: 1211-1220.
- Laudanna, C, Bolomini-Vittori, M. 2009. Integrin activation in the immune system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1: 116-127.
- Le Bras, A, Samson, C, Trentini, M, Caetano, B, Lelievre, E, Mattot, V, Beermann, F, Soncin, F. 2010. VE-statin/egf17 expression in endothelial cells is regulated by a distal enhancer and a proximal promoter under the direct control of Erg and GATA-2. *PLoS ONE* 5: e12156.
- Lechleitner, S, Gille, J, Johnson, DR, Petzelbauer, P. 1998. Interferon enhances tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) expression in human endothelial cells by an interferon-related factor 1-dependent pathway. *J. Exp. Med* 187: 2023-2030.
- Lee, GK, Park, HJ, Macleod, M, Chandler, P, Munn, DH, Mellor, AL. 2002. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 107: 452-460.
- Lee, J-C, Lee, K-M, Kim, D-W, Heo, DS. 2004. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J. Immunol* 172: 7335-7340.
- Lee, MJ, Thangada, S, Claffey, KP, Ancellin, N, Liu, CH, Kluk, M, Volpi, M, Sha'afi, RI, Hla, T. 1999. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99: 301-312.
- Lefler, DJ, Jones, SP, Girod, WG, Baines, A, Grisham, MB, Cockrell, AS, Huang, PL, Scalia, R. 1999. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am. J. Physiol* 276: H1943-1950.
- Lelièvre, E, Hinek, A, Lupu, F, Buquet, C, Soncin, F, Mattot, V. 2008. VE-statin/egf17 regulates vascular elastogenesis by interacting with lysyl oxidases. *EMBO J* 27: 1658-1670.
- Lemmon, MA, Schlessinger, J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141: 1117-1134.

- Lengauer, C, Kinzler, KW, Vogelstein, B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649.
- Levental, KR, Yu, H, Kass, L, Lakins, JN, Egeblad, M, Erler, JT, Fong, SFT, Csiszar, K, Giaccia, A, Weninger, W, Yamauchi, M, Gasser, DL, Weaver, VM. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139: 891-906.
- Lewensohn, DM, Bargatze, RF, Butcher, EC. 1987. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J. Immunol* 138: 4313-4321.
- Ley, K, Laudanna, C, Cybulsky, MI, Nourshargh, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol* 7: 678-689.
- Li, J-L, Sainson, RCA, Shi, W, Leek, R, Harrington, LS, Preusser, M, Biswas, S, Turley, H, Heikamp, E, Hainfellner, JA, Harris, AL. 2007. Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res* 67: 11244-11253.
- Li, Q, Qi, B, Oka, K, Shimakage, M, Yoshioka, N, Inoue, H, Hakura, A, Kodama, K, Stanbridge, EJ, Yutsudo, M. 2001. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. *Oncogene* 20: 3929-3936.
- Libby, P, Ordovas, JM, Auger, KR, Robbins, AH, Birinyi, LK, Dinarello, CA. 1986. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am. J. Pathol* 124: 179-185.
- Lorant, DE, Patel, KD, McIntyre, TM, McEver, RP, Prescott, SM, Zimmerman, GA. 1991. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biol* 115: 223-234.
- Love, KS, Lakshmanan, RR, Butterfield, JH, Fox, CC. 1996. IFN-gamma-stimulated enhancement of MHC class II antigen expression by the human mast cell line HMC-1. *Cell. Immunol* 170: 85-90.
- Lucero, HA, Kagan, HM. 2006. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci* 63: 2304-2316.
- Mackie, RM, Reid, R, Junor, B. 2003. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N. Engl. J. Med* 348: 567-568.
- Maddon, PJ, Molineaux, SM, Maddon, DE, Zimmerman, KA, Godfrey, M, Alt, FW, Chess, L, Axel, R. 1987. Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84: 9155-9159.
- Madjd, Z, Spendlove, I, Pinder, SE, Ellis, IO, Durrant, LG. 2005. Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int. J. Cancer* 117: 248-255.
- Maeda, H, Shiraishi, A. 1996. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J. Immunol* 156: 73-78.
- Mamdouh, Z, Chen, X, Pierini, LM, Maxfield, FR, Muller, WA. 2003. Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* 421: 748-753.
- Mamdouh, Z, Kreitzer, GE, Muller, WA. 2008. Leukocyte transmigration requires kinesin-mediated microtubule-dependent membrane trafficking from the lateral border recycling compartment. *J. Exp. Med* 205: 951-966.
- Mamdouh, Z, Mikhailov, A, Muller, WA. 2009. Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *J. Exp. Med* 206: 2795-2808.
- Marlin, SD, Springer, TA. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51: 813-819.
- Marshall, BT, Long, M, Piper, JW, Yago, T, McEver, RP, Zhu, C. 2003. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature* 423: 190-193.

- Mazzone, M, Dettori, D, Leite de Oliveira, R, Loges, S, Schmidt, T, Jonckx, B, Tian, Y-M, Lanahan, AA, Pollard, P, Ruiz de Almodovar, C, De Smet, F, Vinckier, S, Aragonés, J, Debackere, K, Luttun, A, Wyns, S, Jordan, B, Pisacane, A, Gallez, B, Lampugnani, MG, Dejana, E, Simons, M, Ratcliffe, P, Maxwell, P, Carmeliet, P. 2009. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* 136: 839-851.
- McEver, RP, Beckstead, JH, Moore, KL, Marshall-Carlson, L, Bainton, DF. 1989. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest* 84: 92-99.
- Melder, RJ, Koenig, GC, Witwer, BP, Safabakhsh, N, Munn, LL, Jain, RK. 1996. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat. Med* 2: 992-997.
- Michiels, C. 2003. Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol* 196: 430-443.
- Millán, J, Hewlett, L, Glyn, M, Toomre, D, Clark, P, Ridley, AJ. 2006. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat. Cell Biol* 8: 113-123.
- Miyashita, T, Reed, JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299.
- Mocellin, S, Marincola, FM, Young, HA. 2005. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol* 78: 1043-1051.
- Moiseeva, EP, Javed, Q, Spring, EL, de Bono, DP. 2000. Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc. Res* 45: 493-502.
- Morikawa, S, Baluk, P, Kaidoh, T, Haskell, A, Jain, RK, McDonald, DM. 2002. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol* 160: 985-1000.
- Muller, WA. 2011. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol* 6: 323-344.
- Munder, M, Eichmann, K, Modolell, M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J. Immunol* 160: 5347-5354.
- Müller, A, Homey, B, Soto, H, Ge, N, Catron, D, Buchanan, ME, McClanahan, T, Murphy, E, Yuan, W, Wagner, SN, Barrera, JL, Mohar, A, Verástegui, E, Zlotnik, A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56.
- Nastala, CL, Edington, HD, McKinney, TG, Tahara, H, Nalesnik, MA, Brunda, MJ, Gately, MK, Wolf, SF, Schreiber, RD, Storkus, WJ. 1994. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J. Immunol* 153: 1697-1706.
- Nichol, D, Shawber, C, Fitch, MJ, Bambino, K, Sharma, A, Kitajewski, J, Stuhlmann, H. 2010. Impaired angiogenesis and altered Notch signaling in mice overexpressing endothelial Egf17. *Blood* 116: 6133-6143.
- Nishikawa, H, Kato, T, Tawara, I, Ikeda, H, Kuribayashi, K, Allen, PM, Schreiber, RD, Old, LJ, Shiku, H. 2005. IFN-gamma controls the generation/activation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in antitumor immune response. *J. Immunol* 175: 4433-4440.
- Nobels, FR, Kwekkeboom, DJ, Coopmans, W, Schoenmakers, CH, Lindemans, J, De Herder, WW, Krenning, EP, Bouillon, R, Lamberts, SW. 1997. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 82: 2622-2628.
- Noguera-Troise, I, Daly, C, Papadopoulos, NJ, Coetsee, S, Boland, P, Gale, NW, Lin, HC, Yancopoulos, GD, Thurston, G. 2006. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444: 1032-1037.
- Oertle, T, Merkler, D, Schwab, ME. 2003. Do cancer cells die because of Nogo-B? *Oncogene* 22: 1390-1399.

- Ohm, JE, Gabrilovich, DI, Sempowski, GD, Kisseleva, E, Parman, KS, Nadaf, S, Carbone, DP. 2003. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 101: 4878-4886.
- Otsubo, T, Akiyama, Y, Hashimoto, Y, Shimada, S, Goto, K, Yuasa, Y. 2011. MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis. *PLoS ONE* 6: e16617.
- Owens, LV, Xu, L, Craven, RJ, Dent, GA, Weiner, TM, Kornberg, L, Liu, ET, Cance, WG. 1995. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res* 55: 2752-2755.
- Pagès, F, Berger, A, Camus, M, Sanchez-Cabo, F, Costes, A, Molidor, R, Mlecnik, B, Kirilovsky, A, Nilsson, M, Damotte, D, Meatchi, T, Bruneval, P, Cugnenc, P-H, Trajanoski, Z, Fridman, W-H, Galon, J. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med* 353: 2654-2666.
- Paik, J-H, Skoura, A, Chae, S-S, Cowan, AE, Han, DK, Proia, RL, Hla, T. 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev* 18: 2392-2403.
- Parker, LH, Schmidt, M, Jin, S-W, Gray, AM, Beis, D, Pham, T, Frantz, G, Palmieri, S, Hillan, K, Stainier, D, De Sauvage, FJ, Ye, W. 2004. The endothelial-cell-derived secreted factor Egif7 regulates vascular tube formation. *Nature* 428: 754-758.
- Pasparakis, M. 2009. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol* 9: 778-788.
- Penta, K, Varner, JA, Liaw, L, Hidai, C, Schatzman, R, Quertermous, T. 1999. Del1 induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of alphaVbeta3. *J. Biol. Chem* 274: 11101-11109.
- Petit, AM, Rak, J, Hung, MC, Rockwell, P, Goldstein, N, Fendly, B, Kerbel, RS. 1997. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am. J. Pathol* 151: 1523-1530.
- Phillipson, M, Heit, B, Colarusso, P, Liu, L, Ballantyne, CM, Kubes, P. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med* 203: 2569-2575.
- Phng, L-K, Gerhardt, H. 2009. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev. Cell* 16: 196-208.
- Picker, LJ, Warnock, RA, Burns, AR, Doerschuk, CM, Berg, EL, Butcher, EC. 1991. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 66: 921-933.
- Pitot, HC. 2001. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. *Lancet* 358: 859-860.
- Pober, JS, Gimbrone, MA, Jr, Lapierre, LA, Mendrick, DL, Fiers, W, Rothlein, R, Springer, TA. 1986. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J. Immunol* 137: 1893-1896.
- Qian, B-Z, Pollard, JW. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141: 39-51.
- Rak, J, Mitsuhashi, Y, Sheehan, C, Tamir, A, Vilorio-Petit, A, Filmus, J, Mansour, SJ, Ahn, NG, Kerbel, RS. 2000. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 60: 490-498.
- Raulet, DH. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol* 3: 781-790.
- Ravi, R, Mookerjee, B, Bhujwala, ZM, Sutter, CH, Artemov, D, Zeng, Q, Dillehay, LE, Madan, A, Semenza, GL, Bedi, A. 2000. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14: 34-44.
- Ren, Y, Meng, S, Mei, L, Zhao, ZJ, Jove, R, Wu, J. 2004. Roles of Gab1 and SHP2 in paxillin tyrosine dephosphorylation and Src activation in response to epidermal growth factor. *J. Biol. Chem* 279: 8497-8505.

- Ricci-Vitiani, L, Pallini, R, Biffoni, M, Todaro, M, Invernici, G, Cenci, T, Maira, G, Parati, EA, Stassi, G, Larocca, LM, De Maria, R. 2010. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468: 824-828.
- Ridgway, J, Zhang, G, Wu, Y, Stawicki, S, Liang, W-C, Chantry, Y, Kowalski, J, Watts, RJ, Callahan, C, Kasman, I, Singh, M, Chien, M, Tan, C, Hongo, J-AS, de Sauvage, F, Plowman, G, Yan, M. 2006. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444: 1083-1087.
- Rodriguez, A, Griffiths-Jones, S, Ashurst, JL, Bradley, A. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902-1910.
- Roy, S, Debnath, J. 2010. Autophagy and tumorigenesis. *Semin Immunopathol* 32: 383-396.
- Rubinstein, N, Alvarez, M, Zwirner, NW, Toscano, MA, Ilarregui, JM, Bravo, A, Mordoh, J, Fainboim, L, Podhajcer, OL, Rabinovich, GA. 2004. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5: 241-251.
- Sainsbury, JR, Malcolm, AJ, Appleton, DR, Farndon, JR, Harris, AL. 1985. Presence of epidermal growth factor receptor as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *J. Clin. Pathol* 38: 1225-1228.
- Sako, D, Chang, XJ, Barone, KM, Vachino, G, White, HM, Shaw, G, Veldman, GM, Bean, KM, Ahern, TJ, Furie, B. 1993. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75: 1179-1186.
- Salmi, M, Yegutkin, GG, Lehtonen, R, Koskinen, K, Salminen, T, Jalkanen, S. 2001. A cell surface amine oxidase directly controls lymphocyte migration. *Immunity* 14: 265-276.
- Scheinet, JS, Jiang, W, Kumar, SR, Krasnoperov, V, Trindade, A, Benedito, R, Djokovic, D, Borges, C, Ley, EJ, Duarte, A, Gill, PS. 2007. Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood* 109: 4753-4760.
- Schenkel, AR, Mamdouh, Z, Muller, WA. 2004. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat. Immunol* 5: 393-400.
- Schlegel, J, Peters, I, Orrenius, S, Miller, DK, Thornberry, NA, Yamin, TT, Nicholson, DW. 1996. CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem* 271: 1841-1844.
- Schmidt, M, Paes, K, De Mazière, A, Smyczek, T, Yang, S, Gray, A, French, D, Kasman, I, Klumperman, J, Rice, DS, Ye, W. 2007. EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. *Development* 134: 2913-2923.
- Schmidt, MHH, Bicker, F, Nikolic, I, Meister, J, Babuke, T, Picuric, S, Müller-Esterl, W, Plate, KH, Dikic, I. 2009. Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) modulates Notch signalling and affects neural stem cell renewal. *Nat. Cell Biol* 11: 873-880.
- Schreiber, RD, Old, LJ, Smyth, MJ. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-1570.
- Segarra, M, Williams, CK, Sierra, M de la L, Bernardo, M, McCormick, PJ, Maric, D, Regino, C, Choyke, P, Tosato, G. 2008. Dll4 activation of Notch signaling reduces tumor vascularity and inhibits tumor growth. *Blood* 112: 1904-1911.
- Sgadari, C, Angiolillo, AL, Tosato, G. 1996. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 87: 3877-3882.
- Shankaran, V, Ikeda, H, Bruce, AT, White, JM, Swanson, PE, Old, LJ, Schreiber, RD. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-1111.
- Shaw, SK, Bamba, PS, Perkins, BN, Luscinskas, FW. 2001. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J. Immunol* 167: 2323-2330.

- Shin, MS, Kim, HS, Lee, SH, Park, WS, Kim, SY, Park, JY, Lee, JH, Lee, SK, Lee, SN, Jung, SS, Han, JY, Kim, H, Lee, JY, Yoo, NJ. 2001. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res* 61: 4942-4946.
- Shweiki, D, Itin, A, Soffer, D, Keshet, E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845.
- Sims, GP, Rowe, DC, Rietdijk, ST, Herbst, R, Coyle, AJ. 2010. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol* 28: 367-388.
- Singal, DP, Ye, M, Ni, J, Snider, DP. 1996. Markedly decreased expression of TAP1 and LMP2 genes in HLA class I-deficient human tumor cell lines. *Immunol. Lett* 50: 149-154.
- Sironi, M, Breviario, F, Proserpio, P, Biondi, A, Vecchi, A, Van Damme, J, Dejana, E, Mantovani, A. 1989. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J. Immunol* 142: 549-553.
- Smyth, MJ, Crowe, NY, Godfrey, DI. 2001. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol* 13: 459-463.
- Smyth, MJ, Thia, KY, Street, SE, MacGregor, D, Godfrey, DI, Trapani, JA. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med* 192: 755-760.
- Soncin, F, Mattot, V, Lionneton, F, Spruyt, N, Lepretre, F, Begue, A, Stehelin, D. 2003. VE-statin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration. *EMBO J* 22: 5700-5711.
- Staunton, DE, Dustin, ML, Springer, TA. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339: 61-64.
- Streeter, PR, Rouse, BT, Butcher, EC. 1988. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J. Cell Biol* 107: 1853-1862.
- Stutman, O. 1974. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183: 534-536.
- Su, D, Zhu, S, Han, X, Feng, Y, Huang, H, Ren, G, Pan, L, Zhang, Y, Lu, J, Huang, B. 2009. BMP4-Smad signaling pathway mediates adriamycin-induced premature senescence in lung cancer cells. *J. Biol. Chem* 284: 12153-12164.
- Suchting, S, Eichmann, A. 2009. Jagged gives endothelial tip cells an edge. *Cell* 137: 988-990.
- Suchting, S, Freitas, C, le Noble, F, Benedito, R, Bréant, C, Duarte, A, Eichmann, A. 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104: 3225-3230.
- Sun, J-C, Liang, X-T, Pan, K, Wang, H, Zhao, J-J, Li, J-J, Ma, H-Q, Chen, Y-B, Xia, J-C. 2010. High expression level of EDIL3 in HCC predicts poor prognosis of HCC patients. *World J. Gastroenterol* 16: 4611-4615.
- Suri, C, McClain, J, Thurston, G, McDonald, DM, Zhou, H, Oldmixon, EH, Sato, TN, Yancopoulos, GD. 1998. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282: 468-471.
- Takeda, K, Smyth, MJ, Cretney, E, Hayakawa, Y, Kayagaki, N, Yagita, H, Okumura, K. 2002. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med* 195: 161-169.
- Thijssen, VL, Barkan, B, Shoji, H, Aries, IM, Mathieu, V, Deltour, L, Hackeng, TM, Kiss, R, Kloog, Y, Poirier, F, Griffioen, AW. 2010. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res* 70: 6216-6224.
- Thijssen, VLJL, Postel, R, Brandwijk, RJMGE, Dings, RPM, Nesmelova, I, Satijn, S, Verhofstad, N, Nakabeppu, Y, Baum, LG, Bakkers, J, Mayo, KH, Poirier, F, Griffioen, AW. 2006. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103: 15975-15980.

- Thomas, DA, Massagué, J. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8: 369-380.
- Thompson, RH, Gillett, MD, Cheville, JC, Lohse, CM, Dong, H, Webster, WS, Krejci, KG, Lobo, JR, Sengupta, S, Chen, L, Zincke, H, Blute, ML, Strome, SE, Leibovich, BC, Kwon, ED. 2004. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101: 17174-17179.
- Tomayko, MM, Reynolds, CP. 1989. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol* 24: 148-154.
- Tong, RT, Boucher, Y, Kozin, SV, Winkler, F, Hicklin, DJ, Jain, RK. 2004. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* 64: 3731-3736.
- Toscano, MA, Commodaro, AG, Ilarregui, JM, Bianco, GA, Liberman, A, Serra, HM, Hirabayashi, J, Rizzo, LV, Rabinovich, GA. 2006. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J. Immunol* 176: 6323-6332.
- Uyttenhove, C, Pilotte, L, Théate, I, Stroobant, V, Colau, D, Parmentier, N, Boon, T, Van den Eynde, BJ. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med* 9: 1269-1274.
- van de Stolpe, A, Caldenhoven, E, Stade, BG, Koenderman, L, Raaijmakers, JA, Johnson, JP, van der Saag, PT. 1994. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J. Biol. Chem* 269: 6185-6192.
- van Nimwegen, MJ, Verkoeijen, S, van Buren, L, Burg, D, van de Water, B. 2005. Requirement for focal adhesion kinase in the early phase of mammary adenocarcinoma lung metastasis formation. *Cancer Res* 65: 4698-4706.
- van Wetering, S, van den Berk, N, van Buul, JD, Mul, FPJ, Lommerse, I, Mous, R, ten Klooster, J-P, Zwaginga, J-J, Hordijk, PL. 2003. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 285: C343-352.
- Vesely, MD, Kershaw, MH, Schreiber, RD, Smyth, MJ. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol* 29: 235-271.
- Vogelstein, B, Lane, D, Levine, AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.
- Wang, R, Chadalavada, K, Wilshire, J, Kowalik, U, Hovinga, KE, Geber, A, Fligelman, B, Leversha, M, Brennan, C, Tabar, V. 2010. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468: 829-833.
- Wang, S, Aurora, AB, Johnson, BA, Qi, X, McAnally, J, Hill, JA, Richardson, JA, Bassel-Duby, R, Olson, EN. 2008. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev. Cell* 15: 261-271.
- Wang, S, El-Deiry, WS. 2004. Inducible silencing of KILLER/DR5 in vivo promotes bioluminescent colon tumor xenograft growth and confers resistance to chemotherapeutic agent 5-fluorouracil. *Cancer Res* 64: 6666-6672.
- Wang, S, Voisin, M-B, Larbi, KY, Dangerfield, J, Scheiermann, C, Tran, M, Maxwell, PH, Sorokin, L, Nourshargh, S. 2006. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J. Exp. Med* 203: 1519-1532.
- Watson, NFS, Ramage, JM, Madjd, Z, Spendlove, I, Ellis, IO, Scholefield, JH, Durrant, LG. 2006. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int. J. Cancer* 118: 6-10.
- Weber, F, Byrne, SN, Le, S, Brown, DA, Breit, SN, Scolyer, RA, Halliday, GM. 2005. Transforming growth factor-beta1 immobilises dendritic cells within skin tumours and facilitates tumour escape from the immune system. *Cancer Immunol. Immunother* 54: 898-906.

- Wegmann, F, Petri, B, Khandoga, AG, Moser, C, Khandoga, A, Volkery, S, Li, H, Nasdala, I, Brandau, O, Fässler, R, Butz, S, Krombach, F, Vestweber, D. 2006. ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J. Exp. Med* 203: 1671-1677.
- Weinberg, RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330.
- Welman, A, Cawthorne, C, Ponce-Perez, L, Barraclough, J, Danson, S, Murray, S, Cummings, J, Allen, TD, Dive, C. 2006. Increases in c-Src expression level and activity do not promote the growth of human colorectal carcinoma cells in vitro and in vivo. *Neoplasia* 8: 905-916.
- Williams, CK, Li, J-L, Murga, M, Harris, AL, Tosato, G. 2006. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood* 107: 931-939.
- Wrzesinski, SH, Wan, YY, Flavell, RA. 2007. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin. Cancer Res* 13: 5262-5270.
- Wu, F, Yang, L-Y, Li, Y-F, Ou, D-P, Chen, D-P, Fan, C. 2009. Novel role for epidermal growth factor-like domain 7 in metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 50: 1839-1850.
- Xu, D, Perez, RE, Ekekezie, II, Navarro, A, Truog, WE. 2008. Epidermal growth factor-like domain 7 protects endothelial cells from hyperoxia-induced cell death. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 294: L17-23.
- Xu, X, Fu, XY, Plate, J, Chong, AS. 1998. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 58: 2832-2837.
- Yoon, K, Gaiano, N. 2005. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat. Neurosci* 8: 709-715.
- Yu, J, Fernández-Hernando, C, Suarez, Y, Schleicher, M, Hao, Z, Wright, PL, DiLorenzo, A, Kyriakides, TR, Sessa, WC. 2009. Reticulon 4B (Nogo-B) is necessary for macrophage infiltration and tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106: 17511-17516.
- Zeng, Q, Li, S, Chepeha, DB, Giordano, TJ, Li, J, Zhang, H, Polverini, PJ, Nor, J, Kitajewski, J, Wang, C-Y. 2005. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell* 8: 13-23.
- Zeng, Q, Tan, YH, Hong, W. 1998. A single plasmid vector (pSTAR) mediating efficient tetracycline-induced gene expression. *Anal. Biochem* 259: 187-194.
- Zhang, L, Conejo-Garcia, JR, Katsaros, D, Gimotty, PA, Massobrio, M, Regnani, G, Makrigiannakis, A, Gray, H, Schlienger, K, Liebman, MN, Rubin, SC, Coukos, G. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med* 348: 203-213.
- Zhao, B, Chun, C, Liu, Z, Horswill, MA, Pramanik, K, Wilkinson, GA, Ramchandran, R, Miao, RQ. 2010. Nogo-B receptor is essential for angiogenesis in zebrafish via Akt pathway. *Blood* 116: 5423-5433.
- Zhong, J, Eliceiri, B, Stupack, D, Penta, K, Sakamoto, G, Quertermous, T, Coleman, M, Boudreau, N, Varner, JA. 2003. Neovascularization of ischemic tissues by gene delivery of the extracellular matrix protein Del-1. *J. Clin. Invest* 112: 30-41.
- Zhu, X-D, Zhang, J-B, Zhuang, P-Y, Zhu, H-G, Zhang, W, Xiong, Y-Q, Wu, W-Z, Wang, L, Tang, Z-Y, Sun, H-C. 2008. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol* 26: 2707-2716.
- Zimmerman, GA, McIntyre, TM, Mehra, M, Prescott, SM. 1990. Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J. Cell Biol* 110: 529-540.
- Zitvogel, L, Tesniere, A, Kroemer, G. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol* 6: 715-727.
- Zou, X, Qiao, H, Jiang, X, Dong, X, Jiang, H, Sun, X. 2008. Downregulation of developmentally regulated endothelial cell locus-1 inhibits the growth of colon cancer. *J. Biomed. Sci* 16: 33.

ANNEXES



Suzanne DELFORTRIE

STAGES et EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2008 – 2011 : Thèse de sciences, CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille

Sujet : Rôle de la VE-statine/EGFL7 dans la tumorigenèse : répression de l'activation des cellules endothéliales et contribution à l'échappement à l'immunité anti-tumorale

2008, 24 semaines : Stage de M2R, EA 3452 « Laboratoire d'hématologie, de physiologie et de biologie cellulaire oncologique », Nancy-Université (54)

Sujet : Mise au point d'un modèle d'étude de l'angiogenèse tumorale par microscopie intravitale chez la souris

2007, 7 semaines : Stage de master1, EA 4001 « Radiopotentialisation, de la préclinique à la clinique », Nancy-Université (54)

Sujet : Effet du traitement d'un inhibiteur du protéasome sur une lignée tumorale *in vivo* et *in vitro*.

2006, 6 semaines : Stage volontaire à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7104/UMR_S596/UM41, équipe « Récepteurs nucléaires orphelins, Cofacteurs et Métabolisme » (Illkirch, 67)

COMPETENCES

- Techniques :

Culture cellulaire ; infection virale ; tests d'invasion, de migration, test en agar mou

Expérimentation animale : modèles de tumorigenèse, notions théoriques et pratiques d'imagerie en bioluminescence du petit animal

Titulaire de l'habilitation à l'expérimentation animale de niveau 1

Immunohistochimie (paraffine, cryo-sections) ; microscopie à lumière transmise, à fluorescence

Western blot, qRT-PCR

- Informatique : bureautique (Office), logiciel d'analyse d'images (ImageJ)
- Langues : anglais scientifique
- Communications : posters, conférence grand public

FORMATION

2008 – 2011 : Doctorat en sciences, domaine de la cancérologie, Université Lille-Nord de France (59)

2008 : Master 2 Recherche « Sciences de la Vie et de la Santé » spécialité « Bioingénierie-Pharmacologie » (Nancy-Université, 54)

2007 : Master 1 « Sciences de la Vie et de la Santé » spécialité « Biologie cellulaire intégrée » (Nancy-Université, 54)

2006 : Licence « Sciences du vivant » parcours « Biologie cellulaire et physiologie » (Université Louis Pasteur, Strasbourg, 68)

AUTRES INFORMATIONS

- Née le 11 novembre 1985
- Représentante des doctorants, membre du conseil de l'Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille
- Loisirs : course à pied, natation, loisirs créatifs

Egfl7 promotes tumor escape from immunity by repressing endothelial cell activation

Cancer Research (in press)

Suzanne Delfortrie^{1,2,3,4,a}, Sébastien Pinte^{1,2,3,4,a}, Virginie Mattot^{1,2,3,4}, Chantal Samson^{1,2,3,4}, Gaëlle Villain^{1,2,3,4}, Bertrand Caetano^{1,2,3,4}, Géraldine Lauridant-Philippin^{1,2,3,4,5}, Marie-Christine Baranzelli⁵, Jacques Bonnetterre⁵, François Trottein^{2,3,6,7}, Christelle Favéuw^{2,3,6,7}, and Fabrice Soncin^{1,2,3,4}

Institutions: ¹Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8161, F-59021 Lille, France; ²Université Lille-Nord de France, F-59000 Lille, France; ³Institut Pasteur de Lille, F-59021 Lille, France; ⁴Equipe Labellisée la Ligue, ⁵Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France, ⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1019, F-59021 Lille, France, ⁷CNRS UMR8204, F-59021 Lille, France.

^a equal contribution.

