

# Rôle des mastocytes dans le développement des astrocytomes humains: implication du récepteur CD47 Abdel Aziz Boukhari

## ▶ To cite this version:

Abdel Aziz Boukhari. Rôle des mastocytes dans le développement des astrocytomes humains : implication du récepteur CD47. Pharmacologie. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ043 . tel-01130162

# HAL Id: tel-01130162 https://theses.hal.science/tel-01130162

Submitted on 11 Mar 2015

**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.





Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

STRASBOURG

# **UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

UMR CNRS 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

Faculté de Pharmacie

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Discipline : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie

par

## Abdelaziz BOUKHARI

# Rôle des mastocytes dans le développement des astrocytomes humains : Implication du récepteur CD47

Soutenue publiquement le 25 juin 2012

Membres du jury

Directeur de thèse : Jean-Pierre Gies, Professeur, Strasbourg Rapporteur externe : Jean-Luc Bueb, Professeur, Luxembourg Rapporteur externe : Claude Bertrand, Vice-Président Recherche et développement des Laboratoires IPSEN, Boulogne-Billancourt Présidente du jury : Dominique Wachsmann, Professeur, Strasbourg





Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

# **UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

UMR CNRS 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

Faculté de Pharmacie

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Discipline : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie

par

## Abdelaziz BOUKHARI

# Rôle des mastocytes dans le développement des astrocytomes humains : Implication du récepteur CD47

Soutenue publiquement le 25 juin 2012

Membres du jury

Directeur de thèse : Jean-Pierre Gies, Professeur, Strasbourg Rapporteur externe : Jean-Luc Bueb, Professeur, Luxembourg Rapporteur externe : Claude Bertrand, Vice-Président Recherche et développement des Laboratoires IPSEN, Boulogne-Billancourt Présidente du jury : Dominique Wachsmann, Professeur, Strasbourg

#### Rôle des mastocytes dans le développement des astrocytomes humains : Implication du récepteur CD47

#### Résumé

Des études suggèrent que les cellules inflammatoires joueraient un rôle initiateur du cancer et contribueraient activement à son développement. Mes travaux se focalisent sur l'étude des gliomes humains et les mastocytes. Les gliomes sont les tumeurs les plus fréquentes du SNC. Les mastocytes constituent des cellules d'intérêt dans l'étude du microenvironnement inflammatoire des tumeurs. Grâce à une technique de coculture mastocytes/astrocytomes nous avons montré que les mastocytes induisent la prolifération des astrocytomes humains et n'ont pas d'effet sur les astrocytes. Cet effet prolifératif nécessite un contact direct entre les deux types cellulaires (ce qui suggère l'implication de molécules d'adhérence) et est dépendant de la sécrétion de l'IL6. Aussi avons-nous ciblé le couple CD47/SIRPα et le couple CD40/CD40L qui sont impliqués dans le contrôle de la balance prolifération/apoptose ou/et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation. L'activation du récepteur CD47 dans les astrocytomes humains favorise leur prolifération. La voie de signalisation intracellulaire implique le **dimère**  $\beta\gamma$  des protéines G, une activation consécutive de **la voie PI3K/Akt**, une surexpression de la protéine UHRF1 accompagnée d'une diminution de l'expression du GST **p16**<sup>INK4A</sup>. Il semblerait également que l'activation du récepteur CD47 induise une translocation de NF-KB et l'expression de gènes de cytokines en particulier l'IL-6 qui contribuerait à la prolifération des astrocytomes. Cette voie de signalisation n'est pas activée dans les astrocytes. En coculture l'augmentation de la prolifération des astrocytomes est accompagnée d'une **diminution** de **l'expression** de **CD47** et son **ligand SIRP**α. Ces effets sont accompagnés par une phosphorylation d'Akt et ERK. Nous avons également montré que l'activation du récepteur CD40 favorise la prolifération des astrocytomes via la voie de l'IL6.

### Role of mast cells in the development of human astrocytomas: Involvement of CD47 receptor

#### Abstract

Studies suggest that inflammatory cells play an initiating role of cancer and would contribute actively to its development. My work focused on the study of human glioma and mast cells. Gliomas are the most frequent tumors of the central nervous system (CNS). Mast cells are cells of interest in the study of Tumor inflammatory Microenvironment. Using the technique of coculture: mast cells/astrocytomas we have shown that mast cells induce the proliferation of human astrocytomas and have no effect on astrocytes. The proliferative effect requires a direct contact between the two cell types (which suggests the involvement of adhesion molecules) and is dependent on the secretion of the IL6. We also targeted the CD47/SIRPa and CD40/CD40L interactions who are involved in the control of the proliferation/apoptosis balance or / and the secretion of mediators of inflammation. Activation of the CD47 receptor in human astrocytomas enhances their proliferation. Intracellular signaling pathway involves the  $\beta\gamma$  dimer of G-protein and consecutive activation of the PI3K/Akt Pathway. Activation of CD47 induces overexpression of the UHRF1 protein, this increase of UHRF1 accompanied by a decrease in the expression of the tumor suppressor gene (p16<sup>INK4A</sup>). It would also appear that CD47 receptor activation induces a translocation of NF - kB and the expression of genes of cytokines particularly IL-6 which would contribute to the proliferation of astrocytomas. This signalling pathway is not enabled in astrocytes. In coculture, the proliferation of astrocytomas is accompanied by a decrease in CD47 expression and its ligand SIRPa. These effects are accompanied by a phosphorylation of Akt and ERK. We have also shown that activation of CD40 receptor promotes the proliferation of astrocytomas via the IL-6 dependent pathway.

## **Publications**

- E. Sick, <u>A. Boukhari</u>, T. Deramaudt, P. Rondé, B. Bucher, P. André, JP. Gies, K. Takeda. Activation of CD47 receptor causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway. Glia 2011, 59:308-19.
- K. Kolli-Bouhafs, <u>A. Boukhari</u>, A. Abusnina, E. Velot, T. Deramaudt, JP. Gies, C. Lugnier, P. Rondé. Thymoquinone reduced the migration and invasion of human U87 glioblastoma cells through FAK, ERK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation. Invest. New Drugs 2011, 10637-011-9777-3.
- M. Alhosin, A. Ibrahim, <u>A. Boukhari</u>, T. Sharif, JP. Gies, C. Auger, V.B. Schini-Kerth. Antineoplastic agent thymoquinone induces degradation of  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts. **Invest. New Drugs 2011, 10637-011-9734-1.**
- <u>A. Boukhari</u>, M. Alhosin, C. Truchot, K. Sagini, E. Sick, V. Shini-Kerth, K. Takeda, P. André, JP. Gies. Activation of CD47 receptor-induced UHRF1 overexpression is associated with silencing of tumor suppressor gene *p16<sup>INK4A</sup>* in glioblastoma cells: Role of PI3-kinase/Akt. (Soumise)
- E. Sick, <u>A. Boukhari</u>, P. André, G. Coupin, K. Takeda, JP. Gies. Mast cells induce proliferation of human astrocytoma cells but not normal astrocytes via an IL-6- dependent pathway. (Soumise)
- A. Boukhari et al. Mast cells enhance the proliferation of human astrocytomas cell lines U87 and CCF-STTG1 through the down-regulation of SIRPα and increase the level of ERK1/2 and Akt phosphorylation. (En preparation)
- **A. Boukhari** et al. Activation of CD40 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocyte via an IL-6-dependent pathway. (En preparation)
- K. Kolli-Bouhafs, A. Abusnina, <u>A. Boukhari</u>, F. Noulet, C. Auger, T. Deramaudt, C. Lugnier, JP. Gies, V. Schini-Kerth, P. Rondé. FAK negatively regulates invadopodia by inhibiting TKs-5 dependent reactive oxygen species production in B16F10 melanoma cell line. (En preparation)
- P. André, E. Sick, G. Carré, <u>A. Boukhari</u>, G. Coupin, K. Takeda, JP. Gies. A role for CD47 in the phagocytosis of Listeria monocytogenes 1 by macrophages. (En preparation)

# Table des matières

Remerciement	
Abréviations	
Listes des figures et tableaux	
Avant-propos	
Introduction	1
Les tumeurs intrâcraniennes : les gliomes	1
Les cellules gliales	2
Les gliomes	3
Classification des astrocytomes	5
Astrocytomes pilocytiques (Grade I)	5
Astrocytomes diffus de bas grades (Grade II)	5
Astrocytomes anaplasiques (Grade III)	6
Glioblastomes	7
Microenvironnement tumoral	11
Le stroma	12
La réaction inflammatoire et cancer	14
Cellules intervenant dans l'immunité anti-tumorale	18
Cellules intervenant dans la suppression de l'immunité anti-tumorale	20
Les mastocytes	25
Origine	28
Classification	29
Médiateurs mastocytaires	31
Mastocytes et tumeurs	33
Rôle néfaste des mastocytes infiltrés dans les tumeurs	36
Rôle bénéfique des mastocytes infiltrés dans les tumeurs	37
Mastocytes et système nerveux	38
Le complexe « récepteur CD47 -SIRP »	40
Le Récepteur CD47/IAP	40
SIRPα : Signal regulatory protein-α	43
Matériel et Méthodes	46
Culture cellulaire des lignées	46
Culture des astrocytomes humains	46

Temps de génération des lignées	46
Culture des astrocytes normaux humains	48
Isolement des mastocytes péritonéaux de rat	48
Isolement des macrophages péritonéaux de rat	49
Cocultures mastocytes-astrocytomes et mastocytes-astrocytes	49
Cocultures macrophages-astrocytomes	51
Étude de la prolifération cellulaire	51
Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée	51
Mesure de l'incorporation de bromo-désoxyuridine (BrdU)	52
Évaluation de la viabilité avec le test colorimétrique MTS	53
Évaluation de la viabilité par coloration au bleu trypan	54
Caractérisation de l'apoptose	56
Quantification de messagers intracellulaires	58
Mesure du calcium intracellulaire	58
Dosage de l'AMPc	59
Étude des médiateurs sécrétés	60
Caractérisation des cytokines sécrétées par les astrocytomes	60
Caractérisation des cytokines sécrétées par les mastocytes	60
Caractérisation des métalloprotéases sécrétées par les astrocytomes	61
Dosage ELISA de l'IL-6 sécrétées par les astrocytomes	61
Étude de l'expression des ARN messagers	61
Extraction des ARN messagers	61
Synthèse de l'ADN complémentaire par transcription inverse	62
Amplification de l'ADNc par PCR (Polymerase Chain Reaction)	62
Amplification de l'ADNc par PCR en temps réel	63
Étude de l'expression des protéines	66
Marquage immunocytochimique	66
Western Blot	66
Immunoprécipitation	68
Résultats	70
Influence des mastocytes sur la prolifération des astrocytomes	70
Objectifs de l'étude	70
Discussion et perspectives	70
Publication n°1	

Rôle du récepteur CD47 dans les astrocytomes	100
Objectifs de l'étude	100
Discussion et perspectives	100
Publication n°2	
Récepteur CD47 et PI3-kinase/Akt, UHRF-1 et P16 <sup>INK4A</sup> dans les astrocytomes	114
Objectifs de l'étude	114
Discussion et perspectives	115
Publication n°3	
Rôle du complexe « SIRPα-CD47 » dans les interactions	
mastocytes- astrocytomes	152
Objectifs de l'étude	152
Discussion et perspectives	152
Publication n°4	
Rôle du récepteur CD40 et de son ligand CD40L dans les astrocytomes	184
Objectifs de l'étude	184
Discussion et perspectives	184
Publication n°5	
Autres Résultats	210
Effet de la thymoquinone sur la migration et l'invasion des astrocytomes	211
Résumé	211
Publication n°6	
Effet de la thymoquinone sur la tubuline dans les cellules	
cancéreuses et les fibroblastes humains	224
Résumé	224
Publication n°7	
Discussion générale des résultats et perspectives	233
Bibliographie	242

#### Remerciement

Ce travail de thèse a été le labeur de trois années et n'aurait probablement jamais été mené à terme sans le soutien d'un grand nombre de personnes que je tiens vivement et très sincèrement à remercier.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Jean-Luc Bueb, Professeur à l'université du Luxembourg qui a accepté de participer au jury de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Claude Bertrand, Vice-Président recherche et développement des Laboratoires IPSEN, Boulogne-Billancourt, d'avoir accepté d'être parmi les rapporteurs de ce travail.

Je remercie vivement Madame Dominique Wachsmann, professeur à la faculté de pharmacie à Strasbourg, pour sa participation bienveillante à notre jury de thèse.

Je tiens également à remercier Monsieur Kenneth Takeda, Directeur de recherche à la faculté de pharmacie à Strasbourg, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Jean-Pierre Gies, professeur à la faculté de pharmacie à Strasbourg, pour m'avoir accueillir au sein de son équipe au laboratoire biophotonique et pharmacologie CNRS UMR-7213, pour avoir dirigé ce travail, pour les nombreuses discussions que nous avons eu, malgré un emploi du temps chargé, pour sa sensibilité, son égard, le respect et la sympathie dont je fus témoin, pour m'avoir montré l'importance de la partie expérimentale dans notre domaine et la bonne humeur dont il a toujours fait preuve est un élément de motivation non négligeable.

Je remercie Monsieur Philippe André et Madame Gilliane Coupin pour leur disponibilité de discussion pendant mes présentations orales et leurs remarques pertinentes pour avancer dans notre projet.

Je ne peux évidemment que remercier les membres de l'UMR 7213 avec qui j'ai partagé ces trois années, et particulièrement : Mahmoud, Noureddine, Rachid, Abdurazek, Salah, Abdulkhaleg, Fathi, Faraj, Tanveer, Rada, Kaouther, Isra, Gaelle, Hana, Anne-Marie, Jérôme, Farida, Meliki pour la bonne humeur dont ils font toujours preuve. Je remercie vivement Marlyse et Ingrid pour leur disponibilité administrative et leur gentillesse.

Je tiens à remercier mon très cher oncle Abdelkader et à mes très chers frères qui m'ont énormément aidé et à qui je témoigne mon affection et ma profonde reconnaissance.

## Je dédie ce travail à...

#### A mes très chers parents

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

## A mes très chers beaux-parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien cette étude.

#### A ma très chère femme

Quand je t'ai connu, j'ai trouvé la femme de ma vie, mon âme soeur et la lumière de mon chemin. Ma vie à tes cotés est remplie de belles surprises.

Tes sacrifices, ton soutien moral et ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

## Abréviations :

AC : Adenylate Cyclase ADN : Acide DesoxyriboNucléotide ADNc : Acide DesoxyriboNucléotide complémentaire AMPc : adénosine-3':5'-monophosphate cycliqu **ARNm :** Acide Ribonucléique messager **ATP**: Adenosine Tri-Phosphate ATCC: American Type of Culture Collection **BBB:** Blood Brain Barrier Bcl-2: B-cell CLL/lymphoma 2 **BHE:** Barrière Hémato Encéphalique **BSA:** Bovine Serum Albumin CMH: complexe majeur d'histocompatibilité **CNS:** Central Nervous System **CPA**: Cellule Présentatrice d'Antigènes DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMSO: Diméthyl sulfhoxyde **DTT:** Dithiotréitol EDTA: EthyleneDiamine-Tetraacetic Acid **EGF:** Epidermal Growth Factor ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay **EMEM:** Eagle's Minimum Essential Medium **ERK:** Extracellular signal-regulated kinases FceRI : récepteur de haute affinité pour les IgE FceRII : récepteur de faible affinité pour les IgE (CD23) FGF: Fibroblast Growth Factor GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase **GBM:** Glioblastome multiforme **GGM:** Motif Glycine-Glycine-Méthionine

**GFAP:** glial fibrillary acidic protein

GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

- Gαi : Sous unité inhibitrice de protéine G
- Gas : Sous unité stimulatrice de protéine G
- HRP: Horse-Radish Peroxydase

IAP : Integrin Associated Protein (ou CD47)

- IFN : Interféron
- Ig: Immunoglobuline
- IL: Interleukin
- IP : lodure de Propidium
- IP: Immunprécipitation
- Kb: Kilo-base
- KDa: kilo Dalton

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MCP: monocyte chemoattractant protein

**MMP:** matrix metalloproteinas

mTOR: Mammalian target of ranpamycin

NEAA: Non essential amino acid

NF-кb: Facteur nucléaire кb

NGF: Nerve Growth Factor

NHA: Normal human astrocyte

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

PFA : Paraformaldéhyde

PH : potentiel d'Hydrogène

- PGE 2: Prostaglandine 2
- PI3K : PhosphatIdylinositol-3-Kinase

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PLIC-1: protein linking IAP to cytoplasmic 1

PVDF : polyvinylidène difluorid

P14<sup>ARF</sup>: Tumor suppressor protein of 14 kDa (ARF) alternate reading fram

P16<sup>INK4A</sup>: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)

Ras: Rat sacroma viral oncogene homolog

**RCPG** : Récepteur Couplé au Protéine G

RE : Réticulum Endoplasmique

**RIA:** Radio Immuno Assay

RNase: Ribonucléase

**ROS:** reactive oxygen specie

Rpm: rotations par minut

**RPMC:** Rat peritoneal mast cell

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium

RT-PCR: Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

- **SDS-PAGE :** Electrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide en présence de SD
- SEM : erreur standard sur la moyenne
- SE7C2: Anticorps dirigé contre la protéine SIRPa
- **SHP2**: Src-homology tyrosine phosphatase
- SIRP : Signal Regulatory Protein
- **SNC :** Système Nerveux Central
- Src: Rous sarcoma protein kinase
- SVF : Sérum de Veau Fœtal
- TAE: Tris acétate EDTA
- TBST: Tris Buffered-Saline Tween

TGF: Tumor Growth Factor

- TIMP: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
- **TNF:** Tumor Necrosis Factor
- **TSP** : Thrombospondine
- UHRF1: Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domain 1
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

UV : Ultraviolet

- VVM : Motif Valine-Valine-Méthionine
- 2D3, B6H12: Anticorps anti-CD47

# Listes des figures et des tableaux :

Figure 1 :	Astrocytes d'hippocampe de souris observés en microscopie à fluorescence	3
Tableau 1:	Classification des gliomes selon l'OMS 2007	5
Tableau 2:	Taux d'incidence des tumeurs intracrâniennes primitives en	6
	fonction des types histologiques	
Figure 2 :	Aberrations génétiques impliquées dans la génèse des glioblastomes	8
Tableau 3:	Exemples d'inhibiteurs utilisés dans les traitements de glioblastomes	10
Figure 3:	Les six caractéristiques fondamentales d'une cellule cancéreuse	11
Figure 4:	La Tumeur ; un organe complexe, un organe à part entière et	13
	bnon un amas déstructuré de cellules	
Tableau 4 :	Exemples de cancers liés à l'inflammation	16
Figure 5:	Effets des cellules de l'immunité innée et acquise lors de	17
	l'inflammation associée à la cancérogenèse	
Figure 6:	Schéma simplifié reflétant le rôle des cytokines libérées par les	19
	lymphocytes T dans la régulation de l'immunité pro- et anti-	
	tumorale	
Figure 7:	Concept de l'immuno-surveillance et « immunoediting » des	21
0	Tumeurs	
Figure 8:	L'équilibre entre les cytokines et les chemokines régule le	24
	développement tumoral	
Figure 9:	Vue en microscopie électronique à transmission de la	25
	morphologie des mastocytes à l'état normal (gauche) et l'état	
	de dégranulation (droite)	
Figure10 :	Principales fonctions physiologiques des mastocytes humains	26
0	dans des conditions normales	
Tableau 5 :	Fonctions effectrices et immuno-modulatoires des mastocytes	27
Figure 11 :	, Développement et distribution tissulaire des mastocytes	29
Tableau 6:	Caractéristiques des deux phénotypes majeurs de mastocytes	30
Tableau 7:	Les principales classes de médiateurs libérés par les mastocytes	32
Figure 12 :	Infiltration des mastocytes dans les masses tumorales	34
Tableau 8:	Principaux médiateurs mastocytaires qui désorganisent la	39
	barrière hématoencéphalique	
Figure 13:	Structure du récepteur CD47 et ses ligands endogènes	41
Figure 14:	Représentation schématique de la structure des membres de la famille SIRP	43
Figure 15:	Interaction du récepteur CD47 avec SIRPα et voies de couplage	44

Figure 16 :	Observation au microscope optique des cultures cellulaire de la lignée U87 dans un milieu EMEM supplémenté avec 10%	47		
Figure 17 :	Serum de Veau roetar à 37 C sous atmosphere à 5% CO 2 Suivie de la croissance cellulaire de la lignée U87 dans un milieu EMEM supplémenté avec 10% sérum de veau foetal à 37°C sous atmosphère à 5% CO2			
Tableau 9:	Les différents temps de génération des lignées d'astrocytomes et d'astrocytes humains	48		
Figure 18 :	Modèles de coculture permettant l'étude de la prolifération et la migration des astrocytomes	50		
Figure 19 :	Etapes du test d'incorporation de thymidine tritiée	52		
Figure 20 :	Etapes du test d'incorporation de BrdU	53		
Figure 21 :	Principe du test colorimétrique MTS	54		
Figure 22:	Principe du test de viabilité cellulaire par coloration au bleu de trypan	55		
Figure 23 :	Principe de fonctionnement de la sonde F2N12S	57		
Figure 24 :	Principe du dosage du calcium intracellulaire par la sonde Fura- 2/AM	58		
Figure 25:	Représentation schématique de différentes étapes de l'amplification par PCR	63		
Tableau 10 :	Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées dans nos expériences	63		
Figure 26 :	Principe de la détection des produits de PCR par émission de fluorescence par un agent intercalent	64		
Figure 27 :	Courbe représentative des différentes phases d'une PCR en temps réel	65		
Tableau 11 :	Exemple de résultats expérimentaux	66		
Figure 28:	Principe des expériences d'immuno-précipitations	69		
Figure 29 :	Graines noires de cumin (extrait du site « santeplus »)	210		
Figure 30 :	L'effet des mastocytes sur les astrocytomes humains	234		
Figure 31 :	Représentation de différentes interactions moléculaires entre	239		
	les mastocytes et les astrocytomes et leurs voies de signalisation			
	qui contribuent au développement des astrocytomes			

#### Avant-propos

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'une meilleure compréhension du rôle des cellules inflammatoires et tout particulièrement des **mastocytes** dans le comportement des cellules cancéreuses.

Le pronostic de la maladie cancéreuse est très directement lié au caractère invasif de la tumeur primitive. Le caractère invasif est déterminé, en partie, par le génotype des cellules tumorales, mais aussi par leurs interactions avec les cellules de l'hôte qui modulent les capacités de développement de la tumeur.

Notre hypothèse de travail est basée sur le fait que la composante immunologique du microenvironnement tumoral (cellules inflammatoires et leurs médiateurs : cytokines, chimiokines...) joue un rôle déterminant dans l'évolution des cancers. Notre première approche consiste à analyser la réponse locale inflammatoire des astrocytomes, en relation avec leur progression (prolifération, migration). L'influence d'un contact **mastocytes/astrocytomes** est particulièrement observée.

Les travaux de cette thèse conjuguent des approches cellulaires (cultures cellulaires, cocultures, imagerie), de biologie moléculaire (RT-PCR, PCR, Western-blot,...), pharmacologiques (dosages intracellulaires,...) et de messagers biochimiques (immunoprécipitation, dosage de cytokines,...). Les études sont réalisées sur des lignées cellulaires humaines (astrocytes et astrocytomes) et sur un modèle de co-culture hétérologue « astrocytes ou astrocytomes humains et mastocytes péritonéaux de rats ».

L'ambition à long terme de ce projet est de déboucher sur l'identification de nouvelles cibles potentielles d'action anti-tumorale ainsi que leur utilisation dans la mise au point de nouveaux schémas thérapeutiques.

# Introduction

#### Les tumeurs intrâcraniennes : les gliomes

Les **tumeurs intracrâniennes** peuvent survenir à tout âge. Leur incidence augmente progressivement avec l'âge avec un pic autour de 25/100000 pour l'homme et 16/100000 pour la femme à 70 ans. Le risque cumulé de développer une tumeur cérébrale maligne entre 0 et 74 ans a régulièrement augmenté en passant de 0,33% pour les hommes et 0,20% pour les femmes nés en 1910 à 0,62% pour les hommes et 0,44% pour les femmes nés en 1950 (Dutertre et al., 2010). Il semblerait que cette augmentation se ralentisse depuis ces cinq dernières années. L'amélioration des pratiques médicales explique certainement en partie cette élévation du risque (meilleur diagnostic) mais des facteurs environnementaux liés au mode de vie dans notre société ne sont pas à exclure.

Les tumeurs cérébrales peuvent être **« primitives »**, c'est-à-dire qu'elles se développent à partir des cellules du cerveau (astrocytes, oligodendrocytes ou épendymocytes) ou **« secondaires »** (appelées métastases) ayant pour origine une tumeur située ailleurs dans l'organisme (poumon, sein, rein). Les métastases sont de loin les tumeurs cérébrales les plus fréquentes.

Les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes sont les **gliomes** qui représentent **plus de la moitié des tumeurs primitives,** quel que soit l'âge. Les gliomes dominent en fréquence avec une prééminence des gliomes de haut grade, suivis des méningiomes, des tumeurs de la région sellaire, des tumeurs des nerfs crâniens et des lymphomes cérébraux primitifs. Il existe de nombreux autres types histologiques beaucoup plus rarement rencontrés tels que les épendymomes, les tumeurs neurogliales (gangliogliomes) et les tumeurs germinales (Dutertre et al., 2010).

Chez les enfants **les gliomes** sont en deuxième position derrière les leucémies (cancer du sang). Chez l'adulte les tumeurs cérébrales sont plus rares, on estime qu'il y a environ 4000 nouveaux cas de gliome diagnostiqués chaque année en France et vingt mille aux Etats-Unis. A titre de comparaison, on diagnostique 40000 nouveaux cancers du sein chaque année (données publiées par le site « Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales, octobre 2011 »).

Aujourd'hui, **l'incidence** des **tumeurs cérébrales primitives** est **estimée autour de 17/100000** dans les pays développés, avec des facteurs de risque limités que sont l'âge, le sexe, l'origine ethnique, les syndromes héréditaires et l'exposition aux dérivés nitrés, aux médicaments (AINS, antiépileptiques...), aux métaux dont le plomb, aux pesticides, aux champs électromagnétiques de basses fréquences et aux fortes doses de radiations ionisantes. Il semblerait que le taux d'incidence s'accroisse dans les pays industrialisés (Baldi et al., 2010). Cependant, comme signalé ci-dessus, il faut tenir compte de meilleures techniques diagnostiques et d'un meilleur accès aux soins. La mise en évidence d'autres facteurs demeure actuellement ardue (téléphones portables par exemple...) compte tenu de la faible fréquence de ces tumeurs et des difficultés de colliger des données exhaustives. Il est maintenant admis que la progression des gliomes est imputable à des altérations géniques comme l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (p53, p16...) ou l'activation d'oncogènes (EGFR).

Le terme **gliome** englobe tous les types de tumeurs cérébrales qui ont pour origine une **cellule gliale**.

#### Les cellules gliales

Ces cellules sont les cellules de soutien qui représentent 90% des cellules du système nerveux central (SNC) et occupent 50% du volume du cerveau. Cinq fois plus nombreuses que les neurones les cellules gliales assurent aux neurones un rôle de soutien structural, métabolique et de communication (Ndubaku and de Bellard, 2008). La glie ou « colle » est composée de **microglie** et **macroglie**. La **microglie** dérive du feuillet mésodermique et représente 5-20% des cellules gliales. Elle est constituée par les macrophages résidants et assure l'immunité du SNC. Elle sécrète des molécules comme les cytokines qui interviennent dans les phénomènes inflammatoires et contrôlent la balance survie/apoptose cellulaire. Lors d'atteintes cérébrales, les cellules de la microglie augmentent considérablement à l'endroit de la lésion (Fix et al., 2007).

La **macroglie** est constituée de différents types cellulaires : les oligodendrocytes, les épendymocytes et les astrocytes. La fonction principale des oligodendrocytes est d'assurer la myélinisation des axones (Bradl and Lassmann, 2010). Les épendymocytes (ou cellules épendymaires) séparent les tissus cérébraux centraux du liquide céphalo-rachidien des ventricules.

Les astrocytes possèdent de nombreux prolongements ramifiés qui leur donnent un aspect étoilé (d'où le préfixe « astro ») *(Figure 1)*. Sur un plan morphologique on distingue les *astrocytes fibrillaires* (ou fibreux), localisés préférentiellement au niveau de la substance blanche, qui présentent de longs prolongements radiaires et des filaments intermédiaires riches en GFAP (<u>Protéine Glio-Fibrillaire Acide</u>) et les *astrocytes protoplasmiques*, localisés préférentiellement au niveau de la substance grise, qui présentent des prolongements courts, contenant peu de GFAP.

Sur le plan fonctionnel, on distingue les astrocytes de type 1 et 2. *Les astrocytes de type 1* interviennent dans l'établissement de la barrière hémato-encéphalique et *les astrocytes de type 2* jouent un rôle dans la transmission synaptique (Abbott et al., 2006, Nadkarni et al., 2008, Sofroniew and Vinters, 2010).



**Figure 1 : Astrocytes d'hippocampe de souris observés en microscopie à fluorescence.** (Extrait de Parpura V et al., 2012). Le marquage est effectué par des anticorps dirigés contre la GFAP. Les fluorochromes utilisés sont Alex 568 (vert) et Jaune de Lucifer (Rouge).

#### Les Gliomes

Le terme **gliome** englobe tous les types de tumeurs cérébrales ayant pour origine une **cellule gliale.** Ce sont les tumeurs du système nerveux central **les plus fréquentes**. Ils représentent 70% de toutes les tumeurs cérébrales primaires.

En France, **deux systèmes de classification** sont principalement utilisés pour établir le diagnostic et le grading de malignité des gliomes, la classification de l'OMS *(Organisation Mondiale de la Santé)* et celle de l'Hôpital Sainte-Anne. Ces classifications reposent sur une approche diagnostique très différente. L'OMS n'utilise que des critères histologiques et demeure basée sur le type cellulaire prédominant (oligodendroglial *versus* astrocytaire). La classification de l'Hôpital Sainte-Anne repose sur l'analyse de la structure histologique tumorale: tissu tumoral solide *versus* cellules tumorales isolées, et intègre les données cliniques et de l'imagerie (voir Figarella-Branger et al., 2008 pour revue). La classification histologique de référence pour le diagnostic et le grading histo-pronostique des gliomes est celle de l'OMS révisée en 2007. Cette classification des gliomes est basée sur le type

cellulaire prédominant (astrocytaire, oligodendrocytaire ou mixte : oligoastrocytome). Un grade de malignité (de I à IV, de bénin au plus malin) est attribué à chaque tumeur en fonction des critères suivants : densité cellulaire, atypies nucléaires, mitoses, prolifération microvasculaire et nécrose. Les **gliomes de grade I** correspondent essentiellement à l'astrocytome pilocytique, circonscrit, bénin. Ce sont les seuls gliomes bénins qui peuvent être guéris par la seule chirurgie. Ce type histologique est très rare chez l'adulte. Les **gliomes de grade II** sont des gliomes diffus de bas grade, lentement évolutifs mais dont l'évolution (sur plusieurs années) vers un gliome de grade III ou IV est inéluctable (Gilbert and Lang, 2007). Les gliomes malins, grade III ou IV, sont caractérisés par un degré d'anaplasie et de prolifération plus important. Le grade IV correspond aux gliomes les plus graves et malheureusement les plus fréquents.

La classification de l'Hôpital Sainte-Anne peut être utilisée en complément. La confrontation de **l'histologie avec l'imagerie** peut utilement contribuer à l'établissement du diagnostic et est recommandée. De même, **l'immunohistochimie** à visée diagnostique ou pronostique (p53, GFAP « Glial Fibrilary Acid Protein ») peut être réalisée en option (*Référentiel Régional du Réseau Onco-Poitou-Charente de Prise en Charge des Gliomes Intra-Craniens de l'adulte, 2010*).

La recherche en biologie moléculaire des **délétions** des chromosomes 1p et 19q est actuellement une **option** pour compléter la classification. Ces bras de chromosomes peuvent être codélétés dans la tumeur de grade II, III et dans les glioblastomes (grade IV) par l'état de méthylation du promoteur du gène MGMT (O<sup>6</sup>-méthylguanine-méthyltransférase, enzyme de réparation de l'ADN) et la mutation du gène de l'isocitrate déshydrogénase (IDH1 et 2) (Sanson et al, 2009).

Nous avons vu que selon l'OMS (WHO, World Health Organization) les gliomes sont divisés en trois classes : **les astrocytomes** qui représentent 60-70% des gliomes, **les oligodendrogliomes** qui regroupent 5-30% des gliomes et **les oligoastrocytomes mixtes (ou gliomes mixtes)** (Bauchet et al., 2007 ; Figarella-Branger et al., 2008). Les **oligodendrogliomes** et **oligoastrocytomes mixtes** sont classés en deux grades, le grade II (bas grade) et le grade III (grade anaplasique) tandis que les **astrocytomes** sont classés en quatre grades que nous allons préciser ci-dessous **(voir Tableau 1)**.

Tumeurs astrocytaires	
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire	Grade I
Astrocytome pilocytique	Grade I
Astrocytome pilocytique, variant pilomyxoide	Grade II
Astrocytome diffus	Grade II
Fibrillaire	
Protoplasmique	
Gémistocytique	
Astrocytome anaplasique	Grade III
Xanthoastrocytome pleiomorphe	Grade II
Glioblastome	Grade IV
Glioblastome à cellules géantes	Grade IV
Gliosarcome	Grade IV
Gliomatose	Grade III
Tumeurs oligodendrogliales	
Oligodendrogliome	Grade II
Oligodendrogliome anaplasique	Grade III
Tumeurs oligoastrocytaires	
Oligoastrocytome	Grade II
Oligoastrocytome anaplasique	Grade III

Tableau 1: Classification des gliomes selon l'OMS 2007 (Figarella-Branger et al., 2008)

#### Classification des principaux astrocytomes

#### <u>Astrocytomes pilocytiques : (Grade I)</u>

Ce sont des tumeurs bénignes de grade I qui sont généralement circonscrites et à croissance faible. Ils représentent moins de 5% des astrocytomes et sont fréquents chez l'enfant. Ils se développent au niveau du cervelet ou du tronc cérébral et parfois dans les hémisphères cérébraux. Il peut survenir chez l'adulte, mais moins fréquemment (Li et al., 2008).

L'astrocytome pilocytique est habituellement traité avec succès par méthode radiochirurgicale (*voir Tableau 2*).

#### Astrocytomes diffus de bas grade (grade II OMS) :

Les astrocytomes diffus représentent 10 à 15% des tumeurs gliales astrocytaires, rencontrés majoritairement chez le jeune adulte (30-40 ans). Ils se caractérisent par une croissance lente mais à degrés élevés de différenciation cellulaire. Ils diffusent vers les structures nerveuses avoisinantes, leur aspect microscopique comporte de nombreuses variantes qui peuvent rendre leur diagnostic difficile (Cavaliere et al., 2005 ; Figarella-Branger et al., 2011). La tumeur se révèle plus souvent par une crise d'épilepsie. Ils sont associés à une survie de 5

à 10 ans environ. Dans 70% des cas la phase symptomatique s'accompagne d'une progression vers l'astrocytome anaplasique (grade II). Les traitements sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie ; la radiothérapie est recommandée en début de phase symptomatique. Grâce au développement de l'imagerie et des techniques de stimulation par les électrodes la qualité et l'efficacité des excisions chirurgicale se sont sensiblement améliorées.

Type de tumeur	%	Traitement initial standard	Médiane de survie
Gliome grade I	2,3	Chirurgie	Guérison
Gliome grade II	3,7	Chirurgie Si inopérable et non évolutif : surveillance Si inopérable et évolutif : RT En cours d'évaluation : chimio par TMZ	5-10 ans
Gliome grade III	4,4	Chirurgie + RT En cours d'évaluation : Radiochimio concomitante (TMZ)	4 ans 1p/19q- : 8 ans 1p/19q+ : 2 ans
Glioblastome	20,3	Chirurgie, radiochimio concomitante (TMZ) En cours d'évaluation : Chirurgie, radiochimio concomitante (TMZ), bévacizumab.	12-16 mois

 Tableau 2: Taux d'incidence des tumeurs intracrâniennes primitives en fonction des types histologiques.

 (D'après Gilbert and Lang Neurol. Clin. 2007 modifié).

RT : Radiothérapie ; TMZ : témozolomide

#### Astrocytomes anaplasiques (grade III OMS) :

Avec les astrocytomes de grade IV (glioblastomes) ils sont appelés astrocytomes malins ou de haut grade. Les ¾ des astrocytomes sont des tumeurs de haut grade. L'âge moyen des patients est d'environ 40-50 ans et la survie est de 2 à 3 ans (le pronostic d'un patient avec un astrocytome anaplasique est meilleur qu'un patient avec un glioblastome) (Omar and Mason, 2012). Ces tumeurs ont tendance à être plus agressives par rapport à l'astrocytome pilocytique et fibrillaire. Ce sont des astrocytomes infiltrants caractérisés par de nombreuses mitoses et un haut pouvoir de différenciation. La vitesse de développement et le caractère invasif des astrocytomes anaplasiques rendent le traitement de ces tumeurs très difficile. Le pronostic est difficile à préciser avec une médiane de survie classiquement de trois ans mais avec des extrêmes variant de deux à dix ans. Le diagnostic d'un astrocytome anaplasique est

basé sur l'apparence histologique, ce qui rend le diagnostic difficile. Cependant, les progrès récents dans la compréhension de la biologie moléculaire des gliomes permettent d'identifier les principales dérégulations génétiques et moléculaires qui conduisent au développement de ces tumeurs. Le pronostic semble conditionné par le profil moléculaire de la tumeur, ainsi il serait largement amélioré en cas de délétion des bras chromosomiques 1p et 19q ou de mutation des gènes isocitrate-déhydrogénase 1 (IDH1) ou isocitrate-déhydrogénase 2 (IDH2) (Van den Bent et al., 2006 ; Yan et al., 2009). Quand il existe une amplification du gène de l'EGFR « Epidermal Growth Factor Receptor » leur évolution se rapproche de celle des glioblastomes (grade IV).

Chez la plupart des patients une résection chirurgicale large est recommandée ; le traitement complémentaire restant la radiothérapie (Hartmann et al., 2010).

Les astrocytomes anaplasiques peuvent être considérés comme une étape dans la progression tumorale entre le grade II et le glioblastome nommé, dans ce cas, glioblastome secondaire. En effet, le glioblastome peut être issu de la progression maligne d'un astrocytome de bas grade ou il peut apparaître de novo et dans ce cas il est nommé glioblastome primaire *(Figure 2)*. Les glioblastomes primaires et secondaires se différencient donc de par leur origine et de par leur caractéristiques moléculaires (Furnari et al., 2007 ; Louis, 2007)

#### Les Glioblastomes ou glioblastomes multiformes (GBM):

Ce sont des **tumeurs de grade IV**. Ils sont composés de cellules peu différenciées. Ils sont caractérisés par un polymorphisme cellulaire, des atypies nucléaires, une nécrose tumorale et une activité mitotique importante (prolifération endothéliocapillaire). Ils représentent 50-60% des gliomes et intéressent préférentiellement les patients âgés de 50-60 ans. On constate ces deux dernières décennies une augmentation croissante de l'incidence dans la population âgée de plus de 70 ans. Les glioblastomes primaires représentent la majorité des glioblastomes avec environ 90% des cas. Ceux-ci surviennent avec une incidence plus importante chez les hommes (environ 1,5-1,8) par rapport au glioblastomes secondaire ou l'incidence est relativement équivalente entre les deux sexes. Les glioblastomes secondaires sont associés à un meilleur pronostic que celui des glioblastomes primaires. Le pronostic des GBM reste extrêmement sombre, la médiane de survie est de 9 mois.
En 30 ans de réels progrès ont été accomplis tant dans l'accompagnement des malades et de leur famille avec le plan Cancer que dans la prise en charge thérapeutique. En effet, si la médiane de survie est inférieure à un an, l'espérance de vie pour les patients traités à considérablement progressé avec une survie à deux ans de 27%, à quatre ans de 12%, et à cinq ans de 10% (Stupp et al, 2009).



### Figure 2 : Aberrations génétiques impliquées dans la génèse des glioblastomes (Furnari et al., 2007).

Les glioblastomes secondaires (bleu) sont issus de la progression maligne d'un astrocytome de bas grade tandis que le glioblastome primaire (vert) apparaît de novo. Cette tumeur peut se développer à partir d'astrocytomes de grades inférieurs: un astrocytome diffus de grade II se transforme en astrocytome anaplasique (grade III) et finalement en glioblastome (grade IV) Elle représente 60% des gliomes avec un pic d'incidence qui se situe sur la tranche d'âge 65-74 ans, avec un caractère très invasif. Les études génétiques, réalisées ces dernières années, ont permis de décrire les principales anomalies récurrentes caractéristiques des gliomes : activation de certaines voies de transduction du signal avec amplification d'oncogènes, comme par exemple REGF, dérégulation du cycle cellulaire avec délétion de gènes suppresseurs de tumeurs, tels que p16, p53. Cependant ces anomalies ne sont pas spécifiques d'un type histologique donné et leur valeur pronostique est souvent controversée, Pour compléments voir les références : Kirsch and Loeffler, 2005 ; Figarella-Branger et al., 2008 ; Adamson et al., 2011.

Les glioblastomes se caractérisent souvent par des crises d'épilepsie, un déficit neurologique et une hypertension intracrânienne. La chirurgie permet, lorsqu'elle est envisageable,

d'améliorer l'état neurologique général des patients. L'amélioration symptomatique immédiate obtenue se traduit par une réduction de la pression intracrânienne et par une diminution des crises d'épilepsies. Malgré les efforts, le traitement du glioblastome multiforme reste très difficile. Le traitement standard actuel des glioblastomes repose sur l'exérèse chirurgicale suivie d'une radiothérapie combinée avec la chimiothérapie. Du fait de leur caractère infiltrant, une exérèse microscopique complète est impossible. En 2005 Stupp et coll. ont développé un schéma thérapeutique associant la radiothérapie et le témozolomide, un agent alkylant de deuxième génération. Ces essais ont objectivé de façon indiscutable le bénéfice d'une chimiothérapie en première ligne de traitement des GBM.

L'efficacité cependant limitée de cette prise en charge a justifié le développement de nouvelles approches thérapeutiques basées sur les caractéristiques biologiques et moléculaires de ces tumeurs. Plusieurs altérations des régulations cellulaires constituent des cibles privilégiées (*Figure 2*), comme la surexpression du récepteur à l'EGF, la sécrétion de PDGF, l'activation des voies de transduction PI3K/Akt, mTOR et Ras/Raf ou la sécrétion de protéases qui dégradent la matrice extracellulaire. Plusieurs agents ciblant ces voies sont actuellement en cours d'essais cliniques, avec des résultats pour le moment décevants (*pour exemple voir Tableau 3*). En revanche, le pronostic des tumeurs cérébrales pourrait bien être transformé dans les années qui viennent par l'émergence des agents antiangiogéniques, dont les premiers résultats cliniques sont prometteurs. L'enzastaurin, le cédiranib et le bévacizumab, dirigés principalement sur la voie du VEGF ont été évalués. Parmi eux seul le bévacizumab a été associé à une activité antitumorale substantielle (Chinot et al., 2010).

## Tableau 3: Exemples d'inhibiteurs utilisés dans les traitements de glioblastomes

(13<sup>e</sup> congrès de la société des sciences neuro-oncologiques, Novembre 20-23, 2008; Las Vegas, NV).

Akt	ΡΚCβ
Peritosine	• Enzastaurin (LY317615)
Angiopoietine	PLK
• Amgen 386	Protéasome
Aurora Kinase	• Bortezomib
Chromatine Kinase	Raf Kinase
EGFR	<ul> <li>Sorafenib (Bay 43-9006)</li> </ul>
• Gefitinib (ZD1839)	Src
• Erlotinib (OSI-774)	• Dasatinib
<ul> <li>Lapatinib (GW-572016)</li> </ul>	TGF-β/TGF-β2 Receptor
• AEE788	• SB-431542
• ZD6474	• AP-12009
• BIBW 2992	VEGF/VEGFR
Farnesyltransferase	Bevacizumab
• Tipifarnib (R115777)	<ul> <li>Sorafenib (Bay 43-9006)</li> </ul>
<ul> <li>Lonafarnib (SCH66336)</li> </ul>	<ul> <li>Semaxanib (SU5416)</li> </ul>
HGF	VEGF-Trap
• Amgen 102	• CT-322
HIF-1	• PTK787
Histone Deacetylase	• SU011248
Depsipeptide	• AEE788
<ul> <li>Suberoylanilide hydroxamic acid</li> </ul>	• AZD2171
HSP90 Inhibitors	• ZD6474
• IPI-504	• AMG 706
• XL888	• GW786034
• SNX-5422	• CEP-7055
• CUDC-305	PDGF
IGFR	Imatinib mesylate
Integrines	• PTK787
Cilengitide	• SU101
(EMD121974)	• SUO11248
• M200	• GW786034
mTOR	• MLN518
• Temsirolimus (CCI-779)	РІЗК
• Everolimus (RAD-001)	• BEZ225
Rapamycin (sirolimus)	РКС
• AP23573	• Tamoxifen

# Microenvironnement tumoral

La première étape de la formation des tumeurs est la transformation cellulaire impliquant l'altération des points de contrôles du cycle cellulaire, l'activation d'oncogènes et/ou la neutralisation d'anti-oncogènes. Les cellules tumorales peuvent proliférer de manière anarchique, échapper aux phénomènes d'apoptose et acquérir des propriétés invasives *(Figure 3)*. Pendant longtemps on pensait que l'évolution d'une tumeur était essentiellement régit par les cellules tumorales elles-mêmes. Actuellement cette hypothèse minimaliste a été complètement abandonnée au profit d'une hypothèse impliquant une interaction des cellules tumorales avec leur microenvironnement cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2011).



Figure 3: Les six caractéristiques fondamentales d'une cellule cancéreuse (Hanahan and Weinberg, 2011). La malignité d'une cellule tumorale reflète six capacités acquises : 1- une multiplication sans l'intervention de signaux inducteurs de prolifération. Une cellule normale ne peut proliférer en l'absence de signaux mitogènes. En effet, ces signaux de croissance sont nécessaires pour permettre aux cellules normales de passer de l'état de quiescence (phase G0) à une prolifération cellulaire active (phases G1et S du cycle cellulaire). Les cellules cancéreuses sont capables de sécréter leurs propres facteurs de croissance qui agissent de façon autocrine, réduisant ainsi leur dépendance vis-à-vis des signaux exogènes. 2- une insensibilité aux signaux antiprolifératifs. Dans les cellules normales, des signaux antiprolifératifs sont sécrétés afin de déclencher la quiescence des cellules (G0), les cellules tumorales quant-à elles échappent à ces signaux antiprolifératifs. 3- une résistance à l'apoptose. La capacité de prolifération des cellules cancéreuse est également due à leur résistance à l'apoptose. Cette propriété résulte de l'inactivation ou de la disparition de gènes clés inducteurs de l'apoptose. 4- un potentiel illimité de réplication. Les cellules tumorales perdent la faculté d'arrêter leur division et ne peuvent donc plus entrer en sénescence ce qui immortalise les cellules. 5- L'angiogenèse joue un rôle crucial dans la progression tumorale (développement un réseau vasculaire apportant les nutriments et l'oxygène nécessaire à leur survie. Ceci se fait par l'activation des voies comme le VEGF (vascular endothelial growth factor) et le FGF (fibroblast growth factor). 6- un pouvoir d'invasion et de dissémination dans les tissus. Les cellules tumorales sont capables de passer à l'intérieur d'un vaisseau sanguin afin d'être transportée dans un autre organe ou elles vont générer une seconde tumeur ou métastase.

Dans cette mutation de la recherche il a été opéré un changement de cible puisque l'environnement tumoral est devenu aussi important que la tumeur elle-même. Cette évolution conceptuelle et thérapeutique récente en oncologie peut être illustrée par l'utilisation des **antiangiogéniques**. En effet, des résultats encourageants ont été observés dans le traitement du glioblastome multiforme de l'adulte par un essai d'une association **bévacizumab** (anticorps monoclonal de type IgG1 qui se lie au VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*) et *l'irinotecan (dérivé hémisynthétique de la camptothécine et inhibiteur spécifique de l'ADN topo-isomérase I*) (Vredenburgh et al., 2007). Cependant l'utilisation de cette association chez des enfants en rechute de gliome de haut grade est malheureusement très décevante et laisse imaginer que d'autre voies angiogéniques que celles du VEGF, qu'il reste à étudier et/ou confirmer, pourraient être impliquées chez l'enfant dans ce type de tumeur (Gururangan et al., 2010). Ces résultats confirment également la nature différente des gliomes de haut grade chez l'adulte et l'enfant qui avait déjà été proposée par De Carli et al. en 2009.

La progression tumorale est un **processus multi-génique** et **multi-étape** qui dépend très largement d'influences diverses exercées par le **stroma et le microenvironnement tumoral**. Une tumeur dépourvue de stroma ne peut se développer au-delà d'un faible volume et se nécrose.

#### Le stroma

Les cellules tumorales sont souvent entourées d'une partie mésenchymateuse appelée stroma. Le stroma sert de tissu nourricier et de soutien aux cellules tumorales (Coussens and Werb, 2002). Il est composé de fibroblastes (ou myofibroblastes), de matrice extracellulaire (MEC), de cellules inflammatoires et immunocompétentes (lymphocytes, macrophages, mastocytes, cellules NK,...) et de néovaisseaux (Ruffel et al., 2010). Le stroma tumoral est le plus souvent associé à une augmentation de la population fibroblastique et à une densité de vaisseaux capillaires accrue. Les fibroblastes associés à la tumeur, généralement désignés sous le nom de **« CAF : carcinoma-associated fibroblasts »**, sont responsables de la fibrose pathologique impliquée dans le développement tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011). Les interactions tumeur-stroma sont assurées via des composants (solubles ou non) de la MEC et/ou par des facteurs de croissance produits par les cellules fibroblastiques.



Figure 4: La Tumeur ; un organe complexe, un organe à part entière et non un amas déstructuré de cellules (adapté de Joyce JA et Pollard JW, 2009)

Le microenvironnement tumoral est constitué de cellules tumorales, de cellules fibroblastiques et immunitaires (BMDC, Bone marrow-derived cells; Mastocytes; TEM, TIE2-expressing monocytes; Macrophages; MDSC, Myeloïd-derived suppressor cells; Lymphocytes; Neutrophiles; MSC, Mesenchymal stem cells; Fibrobalstes; cellules épithéliales; cellules endothéliales ...), de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de matrice extracellulaire,...

Par ailleurs, la transformation cellulaire s'accompagne de modifications précoces de l'environnement tumoral impliquant les cellules du tissu conjonctif (fibroblastes, myofibroblastes, cellules inflammatoires...), les cellules endothéliales et les composants de la matrice extra-cellulaire (MEC) *(Figure 4)*. Les cellules tumorales les plus invasives acquièrent des caractères phénotypiques mésenchymateux réalisant une **transition épithélio-mésenchymateuse**. Elles modifient ainsi leurs molécules d'adhérence, leur cytosquelette et sont capables de produire des enzymes protéolytiques comme les métalloprotéinases matricielles (MMPs) ou des cytokines qui assurent l'activation stromale. Les cytokines pouvant être libérées peuvent être des cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-6, le TNF- $\alpha$  ou certaines chimiokines) ou anti-inflammatoires (comme le TGF- $\beta$ , l'IL-10 ou l'IL-20). Les chimiokines sont des cytokines de bas poids moléculaire (8 à 12kDa) comme ENA78 (ou CXCL5), GRO- $\alpha$  (ou CXCL 1), MCP-1 (ou CCL2) et IL-8 (ou CXCL 8), qui assurent le recrutement des polynucléaires neutrophiles, monocytes, ou lymphocytes (chimiotactisme) sur le site inflammatoire. Dans le stroma et la tumeur, la **néo-angiogénèse** et la **néo-lymphangiogénèse** forment des vaisseaux sanguins et lymphatiques indispensables à la

prolifération tumorale (Holopainen et al., 2011). Ces modifications microenvironnementales de la tumeur (sécrétion de cytokines, activation cellulaire...) conditionnent la croissance des cellules tumorales, déterminent leur potentiel métastatique et, éventuellement, la localisation tissulaire des métastases (Billotet and Jouanneau , 2008). De plus, désormais il y a des évidences qui prouvent qu'au sein d'une masse tumorale se trouve un petit nombre de cellules, dites **cellules souches tumorales (CST)**, qui présentent des propriétés d'auto-renouvellement et de multi-potence (Seung Kew Yoon, 2012). Ces CST résident à proximité des cellules endothéliales dans une "niche vasculaire tumorale" et constituent un réservoir pour l'initiation et/ou le maintien des tumeurs. Même si des CST mutées permettent un développement et une progression tumorale elles 'collaborent' étroitement avec les cellules du microenvironnement tumoral (Hanahan et Coussens, 2012).

#### La réaction inflammatoire et cancer

La réaction inflammatoire est naturelle et très utile à l'organisme. Elle accompagne la réaction immunitaire, la rend plus spécifique et contribue à l'élimination de l'agent pathogène et à la réparation des tissus lésés en favorisant le renouvellement cellulaire. Cette réaction est strictement contrôlée par de nombreuses protéines de l'inflammation. Lorsque la réponse est inadaptée ou mal contrôlée, elle crée à l'inverse des lésions qui peuvent endommager le matériel génétique et favoriser la survenue d'anomalies potentiellement cancérigènes.

Rudolf Virchow (1821-1902), médecin allemand, fut le premier à observer un lien entre l'inflammation et le cancer en 1863. Il remarqua l'accumulation d'un grand nombre de leucocytes au sein des tissus néoplasiques. Il émit l'hypothèse selon laquelle certaines classes de substances irritantes provoqueraient des lésions tissulaires et une inflammation locale, et ces conditions seraient favorables à la prolifération cellulaire (Balkwill et Mantovani, 2001). Il suggéra alors que les sites d'inflammation chronique seraient à l'origine des tumeurs.

Les cellules tumorales sécrètent de nombreuses cytokines et chémokines susceptibles d'attirer les leucocytes. En effet, toutes les **masses tumorales** sont infiltrées de cellules de **l'immunité innée** (granulocytes, les cellules dendritiques, les macrophages, les éosinophiles et les mastocytes) et de **l'immunité acquise** (lymphocytes). Ces cellules infiltrées ont, elles aussi, la capacité de produire une batterie de médiateurs comme des cytokines, des espèces

Introduction 15

réactives de l'oxygène, des sérines et cystéine protéases, ou des MMP. Ces médiateurs peuvent à la fois **inhiber ou stimuler la croissance tumorale**, mais également **inhiber ou favoriser la migration** des cellules cancéreuses (Coussens et Werb, 2002).

**Paul Ehrlich** suggéra, il y a plus de 100 ans, l'existence d'un concept **d'immuno-surveillance** dans lequel les cellules immunitaires reconnaissent les cellules tumorales et provoquent une destruction de la tumeur. Ce concept a été largement validé ces dernières années grâce à des modèles murins génétiquement modifiés. Pour exemple, Shankaran et al. ont démontré en 2001 qu'une tumeur induite par un carcinogène chimique, le méthylcholantrène, prolifère beaucoup plus rapidement et est bien plus agressive dans un modèle de souris immuno-déficiente par rapport à un modèle de souris immuno-compétente (Fridman et al, 2011).

Par contre, d'autres études suggèrent que les réactions inflammatoires favorisent la croissance tumorale. Des personnes ayant des prédispositions génétiques favorisant les phénomènes inflammatoires auraient un risque plus important de développer un cancer. D'autres études démontrent avec certitude le lien entre inflammation chronique et cancer (Tableau 4). C'est par exemple le cas du cancer de l'estomac qui se développe suite à une infection bactérienne par *Helicobacter Pylori* ou du cancer col de l'utérus qui se développe suite à une infection par un papillomavirus. Dans les deux cas, les agents pathogènes persistent des années dans l'organisme et induisent une réaction inflammatoire durable. C'est également le cas de maladies auto-immunes associées par exemple à la maladie de coeliaque ou le lymphome des MALT (mucusa-associated lymphoïd tissue). Une observation identique peut être faite lors d'agressions chimiques par la fumée de cigarette par exemple et le cancer du poumon (Coussens and Werb, 2002, Mantovani et al., 2008, Sautès-Fridman et al., 2011). Le lien entre inflammation et le cancer est également renforcé par des observations qui suggèrent qu'un traitement chronique par des AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens), comme l'aspirine par exemple, ou par des COXIBS (inhibiteurs sélectifs de la COX2 : cyclooxygénase-2) diminue chez les patients concernés le risque de développer une tumeur. Ce risque est diminué de 50% dans le cas des cancers colorectaux, de 40% dans les cancers de l'estomac et du pancréas et de 20% dans les cancers du sein (Garcia-Rodriguez et al., 2001; Coussens and Werb, 2002; Koki et al., 2002; Meier et al., 2002; Gonzalez-Pérez et al., 2003). De récents travaux confortent ces observations : Rothwell et coll. montrent que la prise quotidienne d'aspirine sur le court terme, 3 à 5 ans, diminue l'incidence des cancers et la mortalité par cancers d'environ 15 %. (Rothwell et al., 2012a), que la prise quotidienne d'aspirine, même à dose faible, réduit le risque de cancers avec métastases à distance du cancer primitif, en particulier dans les cancers colorectaux (Rothwell et al., 2012b) et que la prise régulière d'aspirine à long terme, sur une vingtaine d'années, réduit le risque de cancers, particulièrement le cancer colorectal, et réduit le risque de métastases à distance (sans réduire l'extension locale des cancers) (Algra and Rothwell, 2012).

Le tableau ci-dessous liste certains cancers où le processus inflammatoire est un co-facteur de la carcinogénèse.

Condition pathologique	Néoplasme associé	Agent éthiologique
Bronchite	Cancer du poumon	Silice, asbeste, tabagisme
Cystite	Cancer de la vessie	Cathéters urinaires
Gingivite, lichen plan	Cancer des cellules squameuses	
Maladie de Crohn, colite chronique ulcérative	Cancer colorectal	
Pancréatite chronique ou héréditaire	Cancer du pancréas	Alcoolisme, mutation du chromosome 7 (trypsinogène)
Reflux gastro-oesophagien	Cancer de l'œsophage	Acide gastrique
Sialadénite	Cancer des glandes salivaires	
Thyroïdite d'Hashimoto	lymphomes du MALT ( <i>Mucosa-</i> associated lymphoid tissue)	
Inflammation cutanée	Mélanome	Ultraviolets
Cancers associés aux agents infe	<u>ctieux :</u>	
Cholangite	Cholangiosarcome, cancer du colon	<i>Opisthorchis viverrini,</i> acide billiaires
Caillots biliaires chroniques	Cancer des voies biliaires	Bactéries, caillots biliaires
Ulcère gastrique, gastrite	Cancer de l'estomac	Helicobacter pylori
Mononucléose	Lymphome B non-Hodgkinien, Lymphome de Burkitt,	Virus d'Epstein_Bar
SIDA	Lymphome non-Hodgkinien,	Virus de l'immunodéficience
	Carcinomes des cellules	humaines, virus de l'herpès
	squameuses, sarcome de Kaposi	
Ostéomyélite	Cancer de la peau	Infection bactérienne
Inflammation pelvienne,	Cancer des ovaires, du col	Gonnorrhées, chlamydiées,
Inflammation du col de l'utérus		Papillomavirus
Kystose chronique	Cancer des voies biliaires, du foie,	Schistosomiase
	du rectum	

Tableau 4 : Exemples de cancers liés à l'inflammation (d'après Coussens et Werb, 2002).

Néoplasmes associés à l'inflammation chronique :

Les cellules inflammatoires jouent un rôle indéniable sur le développement des tumeurs. Certaines cellules participent aux mécanismes de l'immunité anti-tumorale et d'autres vont abolir cette immunité et favoriser le développement tumoral *(Figure 5)*.

Introduction 17

Les **leucocytes** infiltrés dans les tumeurs représentent près de **50% de la masse tumorale**. Selon le type de leucocytes majoritairement infiltré, le **pronostic vital** serait différent, mais celui-ci dépendrait également du type de cancer et de sa localisation. Les leucocytes présents dans le stroma tumoral sont aussi bien des cellules de **l'immunité adaptative** que des cellules de **l'immunité innée**. En effet, on observe des lymphocytes T, des cellules dendritiques et plus rarement des lymphocytes B. Les effecteurs de l'immunité innée infiltrés sont des **macrophages**, des **mastocytes**, des **leucocytes polymorphonucléaires** et plus rarement des **cellules Natural Killer**. La tumeur met en œuvre de nombreux mécanismes de défenses visant à échapper à la réponse immunitaire ; les cellules tumorales se révèlent être de véritables agents subversifs des cellules de l'inflammation.



# Figure 5: Effets des cellules de l'immunité innée et acquise lors de l'inflammation associée à la cancérogenèse (de Visser et al., 2006).

Les antigènes présents dans les tissus pré-néoplasiques sont transportés dans les organes lymphoïdes secondaires par l'intermédiaire des cellules dendritiques qui y activent les cellules de l'immunité acquise (lymphocytes T et B). Parallèlement, les cellules de l'immunité innée sont activées de manière chronique et favorisent le développement tumoral par la modulation de l'expression des gènes dans les cellules pré-néoplasiques; cette action a pour effet à terme d'induire une dérégulation du cycle cellulaire et de favoriser la survie. Les cellules de l'inflammation favorisent également le remodelage des tissus et l'angiogenèse par la sécrétion de médiateurs proangiogéniques et de protéases extracellulaires. Les tissus dans lesquels ces voies de signalisation sont activées de manière chronique seraient favorables au développement d'un cancer

## Cellules intervenant dans l'immunité anti-tumorale

Le système immunitaire reconnaît les cellules tumorales comme des entités étrangères à l'organisme et déclenche une réponse complexe impliquant diverses cellules (lymphocytes, cellules dendritiques,...) et protéines spécialisées (cytokines, anticorps...). Ces différents facteurs vont parvenir à lyser la cellule cancéreuse grâce à un système de défense non spécifique, l'immunité innée, et un système de défense spécifique, l'immunité acquise. Parmi les cellules intervenant dans cette immunité anti-tumorale nous pouvons citer :

- Les cellules Natural Killer (NK) sont non spécifiques de l'antigène et sont responsables de la destruction directe des cellules tumorales. Leur activité cytotoxique dépend des récepteurs de surface de la tumeur. Elles peuvent sécréter de la perforine et de la granzyme (Platonova et al ; 2011).

- *Les cellules NKT* jouent un rôle régulateur de l'inflammation en orientant vers une réponse type Th1 ou Th2 par production rapide de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-13. Leur mécanisme d'action est proche de celui des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Ruffell et al., 2010).

- Les lymphocytes T isolés à partir de masses tumorales sont caractérisés par une réponse amoindrie aux stimuli mitogènes et antigéniques. Ils n'induisent que peu de réponses cytotoxiques et produisent peu de cytokines de type Th1 lorsqu'ils sont stimulés par l'antigène. Ces caractéristiques sont d'autant plus marquées que les patients sont à un stade avancé de la pathologie (Kiessling et al., 1996; Reichert et al., 1998; Uzzo et al., 1999). De nombreux lymphocytes sont spécifiques des antigènes des tumeurs comme l'indiquent les analyses clonales (Miescher et al., 1987) (Figure 6). Les lymphocytes Tyo sont des cellules lymphoïdes de l'immunité innée qui sécrètent de l'IFNy et détruisent diverses cellules cancéreuses (mélanone, lymphome...) (Gomes et al., 2010). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (LCT) sont notamment activés par les cellules dendritiques et sont impliqués, tout comme les NK, dans la destruction des cellules tumorales par notamment une sécrétion de perforines et de granzymes (Flinsenberg et al., 2011). Les lymphocytes T auxiliaires (CD4<sup>+</sup>-T), appelés aussi T helper (Th), jouent un rôle important dans le contrôle du développement tumoral (Hung et al., 1998). Ils sont caractérisés sur la base des cytokines qu'ils sécrètent. Les Th1, impliqués dans l'immunité cellulaire, sécrètent principalement de l'IL-2, du TNFa et de l'IFNy et sont impliqués dans la cytotoxicité cellulaire dépendante du complément ainsi que dans l'activation de la fonction cytotoxique des cellules NK, LCT et des macrophages (Szabo et al; 2000). Les Th2 produisent

majoritairement de l'IL4, IL5, IL10 et IL13 et activent les éosinophiles et les mastocytes (Zheng and Flavell, 1997) ainsi que les lymphocytes B qui vont alors sécréter des Ig impliquées dans la réponse humorale. Une autre population cellulaire pro-inflammatoire a été décrites ces dernières années, Th17, qui produit de l'IL17, IL21 et IL22 mais dont l'implication dans une activité anti-tumorale reste discutée (Ouyang et al., 2008).

- *Les lymphocytes B* sont localisés beaucoup plus rarement dans les tumeurs excepté dans les structures lymphoïdes. Leur activation provoque un relargage d'anticorps anti-antigène tumoral qui vont bloquer la progression tumoral en empêchant l'activation des récepteurs de facteurs de croissances (Dieu-Nosjean et al., 2008).



Figure 6: Schéma simplifié reflétant le rôle des cytokines libérées par les lymphocytes T dans la régulation de l'immunité pro- et anti-tumorale (Ruffell et al., 2010).

Les cellules NK, les lymphocytes T- $\gamma\delta$  et les lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup> favorisent l'immunité anti-tumorale induisant la mort cellulaire des cellules néoplasiques. Les fonctions effectrices cytotoxiques de ces cellules sont médiées par l'IFN $\gamma$  libéré par les cellules T<sub>H</sub>1 et les cellules NKT de type I, ainsi que par l'auto-production de l'IFN $\gamma$  qui conduit à la polarisation des cellules T<sub>H</sub>1. La libération de l'IL-4 et IL-13 par les cellules T<sub>H</sub>2 et les cellules NKT de type II peut orienter la polarisation des macrophages vers un phénotype M2. Ces macrophages polarisés favorisent la promotion des métastases via la libération de l'EGF, tandis que la production de TGF $\beta$  supprime directement ou indirectement la réponse immunitaire par le biais de la promotion du développement des cellules TReg. IL-17 favorise la production de l'IL-6 par les cellules tumorales. Ces deux cytokines favorisent la croissance des cellules tumorales, tandis que l'IL-21 amplifie la fonction effectrice des lymphocytes T cytotoxiques.

## Cellules intervenant dans la suppression de l'immunité anti-tumorale

Dans certaines conditions la tumeur échappe à l'action combinée des cellules immunitaires et continue de proliférer. A ma connaissance deux mécanismes d'échappement sont décrits. Le premier est **l'immunoediting**, mécanisme dans lequel la tumeur n'est plus reconnue par le système immunitaire comme étant du « non-soi » (Vesely et al., 2011 ; Schreiber et al., 2011) **(Figure 7).** Le second mécanisme est un détournement par la tumeur des réponses immunitaires : c'est **l'immuno-suppression**. Dans les deux mécanismes la tumeur va entrer dans un état d'équilibre avec le système immunitaire. Elle pourra rester sous le contrôle du système immunitaire ou bien y échapper pour proliférer (Coussens and Werb, 2002, Ruffel et al., 2010). Lorsque les réponses immunitaires sont détournées au profit de la tumeur (immuno-suppression), certaines cellules peuvent faciliter l'angiogénèse et la prolifération des cellules tumorales. Parmi les cellules à action protumorale non trouvons les macrophages, des lymphocytes T et B, des neutrophiles, des mastocytes....

- Les lymphocytes régulateurs Treq représentent une proportion de 5 à 15% des lymphocytes associés aux tumeurs (*TIL* : *Tumor-infiltrating lymphocytes*). Ils inhibent la prolifération des autres lymphocytes T spécifiques du microenvironnement tumoral par des mécanismes dépendant du contact cellulaire ou par des mécanismes dépendant de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  (Strauss et al., 2007a). Dans des conditions physiologiques, les T<sub>reg</sub> sont essentiels dans la prévention des pathologies auto-immunes (Shevach, 2000). Dans un contexte tumoral, ils sont **immunosuppresseurs** et présentent une grande variabilité de phénotype (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>hi</sup>, Foxp3<sup>+</sup>). Certaines études récentes suggèrent que les stratégies thérapeutiques (irradiation, chimiothérapie, chirurgie) auraient même tendance à induirent leur prolifération (Strauss et al., 2007b).

- Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC : Myeloid-derived suppressor cells) forment une population cellulaire hétérogène composée de cellules myéloïdes progénitrices et de cellules myéloïdes immatures. Une accumulation de cette population immature est observée dans le cas de cancer. Les MDSC ont été caractérisées la première fois chez des souris portant des tumeurs puis chez de patients atteints de cancer. Chez ces dernières, le nombre de MDSC circulant peut être augmenté de dix fois par rapport à un individu sain.



Figure 7: Concept de l'immuno-surveillance et « immunoediting » des Tumeurs (Schreiber et al., 2011). L'immunoediting se déroule en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. L'élimination correspond à une phase active où le système immunitaire reconnaît et détruit les cellules tumorales. Une phase d'équilibre dynamique entre l'action du système immunitaire et le développement tumoral.s'installe. Les lymphocytes T, l'IL-12 et IFN-y sont nécessaire pour maintenir les cellules à l'état de dormance. La pression de sélection exercée par le système immunitaire est forte et les cellules tumorales grâce à leur grande instabilité génétique peuvent acquérir des micro- (mutations génétiques et épigénétiques) ou macro-réarrangements (translocation, délétion, inversion, duplication) et d'autres variantes des cellules tumorales peuvent apparaitre : 1- par diminution de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T (CMH), 2- par l'augmentation de l'inhibition de l'apoptose (Bcl-XL; FLIP) ou 3- par l'expression de molécules de surface inhibitrices qui tuent directement les lymphocytes T cytotoxiques (PD-L1 ; FasL). De plus, les tumeurs sécrètent des facteurs inhibant les fonctions inhibitrices des cellules immunitaires (TGF-8, IL-10, VEGF, LXR-L, IDO, ganaliosides ou MICA soluble) ou recrutent des cellules régulatrices pour atténuer l'immunosuppresion (IL-4, IL-13, GM-CSF, IL-18, VEGF ou PGE2), leur permettant de se soustraire à cette sélection : c'est la phase d'échappement où la croissance des cellules tumorales n'est plus bloquée par l'immunité. (Schreiber et al., 2011 et Vesely et al., 2011).

Chez le rat portant une tumeur, les MDSC peuvent représenter 20 à 40% des splénocytes alors que ce nombre n'est que de 2 à 4% dans une rate saine (Mirza et al., 2006). Elles prolifèreraient également dans les pathologies auto-immunes (Gabrilovich et Nagaraj, 2009). Lorsqu'elles sont activées, elles présentent des propriétés **immunosuppressives** et une morphologie proche des granulocytes et des monocytes (Gabrilovich et Nagaraj, 2009). Les MDSC inhibent à la fois des réponses des cellules de l'immunité innée et les réponses des cellules de l'immunité acquise. Elles expriment de grande quantité d'arginase 1 et de iNOS impliquées dans la production de NO. Le NO inhibe notamment les fonctions des lymphocytes T ; l'expression des molécules du CMH II (Rivoltini et al., 2002 ; Harari et Liao, 2004). Certaines études suggèrent que les MDSC inhiberaient la cytotoxicité des cellules NK par rapport aux cellules tumorales et inhiberaient également leur production d'IFN $\gamma$  (Ostrand-Rosenberg et Sinha, 2009). De très nombreuses questions concernant les MDSC restent à élucider. Les mécanismes immunosuppresseurs des MDSC semblent en effet différents, selon qu'elles soient localisées dans les organes lymphoïdes secondaires ou au sein même de la tumeur, où elles peuvent se différencier en TAM (Kusmartsev et Gabrilovich, 2005).

- Les macrophages associés aux tumeurs sont désignés sous le terme de TAM (tumor-associated macrophages). Ils dérivent des monocytes circulant qui sont sélectivement attirés dans le microenvironnement tumoral par la production locale de chémokines (CCL2, CCL5, CCL7, CCL8, CXCL12) et cytokines (VEGF, PDGF, M-CSF) (Balkwill, 2004). Les TAM sembleraient s'accumuler dans les régions nécrotiques des tumeurs caractérisées par une hypoxie (Sica et al., 2008). Sous l'influence du M-CSF les monocytes recrutés se différentient en macrophages résidants dans le microenvironnement. La polarisation de type M1 (classique) oriente la réponse immunitaire vers des propriétés de type Th1. Les M1 sont des macrophages pro-inflammatoires qui participent à l'élimination de la tumeur par phagocytose après opsonisation des cellules tumorale et présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les TAM seraient des macrophages de type **M2** et leur différenciation serait sous le contrôle principal de l'IL-4, du TGF- $\beta$ , de l'IL-6 et de l'IL-10 (Mantovani et al., 2009). Les TAM ont la capacité de stimuler directement la croissance tumorale et la migration (Goswami et al., 2005). Les macrophages de type M2 produisent des quantités abondandes de cytokines immunosupressives comme l'IL-10 et des quantités faibles d'IL-12, et sont caractérisés par une faible capacité à présenter l'antigène. Les M2 inhibent de plus les réponses de type Th1. Ils participent très activement à la néo-angiogenèse par la production de facteurs pro-angiogéniques et par le remodelage de la matrice extracellulaire (Figure 8). On leur attribue également un rôle immunosupresseur qui serait lié en partie au recrutement de lymphocytes T dépourvus d'activité cytotoxique. Certaines études ont malgré tout montré que les TAM pouvaient présenter des **propriétés anti-tumorales**. Les mécanismes ne sont pas totalement élucidés, mais il semblerait que dans ces situations, ce sont les macrophages de type M1 qui sont les impliqués. Ces cellules ont une capacité à promouvoir la mort des cellules tumorales (Mantovani et al., 2009).

- *Les cellules dendritiques* joueraient un rôle primordial dans l'initiation, la programmation et la régulation des réponses immunitaires anti-tumorales (Steinman et Banchereau, 2007).

Cependant, dans la plupart des tissus cancéreux ainsi que dans les organes lymphoïdes secondaires de patients atteints de cancer, les cellules dendritiques présentent des phénotypes immatures. En effet, les nombreux TAM et surtout les MDSC infiltrées dans les tumeurs seraient à l'origine de la suppression de la vigilance des cellules dendritiques. Par la création d'un environnement immunosuppresseur *via* la sécrétion de cytokines, les TAM et les MDSC inhibent l'instruction des lymphocytes T CD4 et CD8 par les cellules dendritiques et favorisent la prolifération des T<sub>reg</sub> (Melief, 2008).

- Un autre mécanisme inhibant le contrôle du système immunitaire est la sécrétion par la tumeur elle-même de divers facteurs. Les cellules tumorales sécrètent du M-CSF qui à terme stimule la production de l'EGF (*epithelial growth factor*) par les macrophages Goswami et al. (2005). L'EGF est un puissant facteur de croissance pour la tumeur vis-à-vis de la tumeur. Du TGF $\beta$ 1 et de l'IL-10 peuvent également être sécrétés par les cellules tumorales (Fridlender et al., 2009). Le TGF $\beta$ 1 conditionne le stade de différenciation des macrophages M1, inflammatoire, en M2, immunosuppresseur ; inhibe le recrutement des neutrophiles, des lymphocytes et des cellules NK. D'autres molécules clefs qui entretiennent une action pro-tumorale sont par exemples le VEGF et le FGF qui sont angiogéniques.

L'évolution actuelle en cancérologie se dirige progressivement vers un diagnostic personnalisé et une thérapie intégratrive. Des stratégies combinatoires cibleront non seulement les cellules cancéreuses mais également les cellules du microenvironnement tumoral. Cette approche multi-cible est très novatrice et laisse entrevoir une évolution favorable du pronostic de divers cancer humain (de Palma et Hanahan, 2012 ; Hanahan et Coussens, 2012).



Figure 8: L'équilibre entre les cytokines et les chemokines régule le développement tumoral (Coussens et Werb,2002).

Les tumeurs qui produisent peu ou pas de cytokines inflammatoires ou une surabondance de cytokines anti-inflammatoires induisent des réponses inflammatoires et vasculaires limitées, et par voie de conséquence la croissance tumorale sera limitée. En revanche, la production abondante de cytokines pro-inflammatoires peut conduire à une inflammation qui potentialise l'angiogenèse et la croissance néoplasique. Par ailleurs, un déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires peut induire une infiltration de monocytes et/ou neutrophiles qui vont provoquer un effet cytotoxique qui sera défavorable à la progression tumorale. L'IL-10 est généralement sécrété par la tumeur et par les macrophages associés à la tumeur.

## Les Mastocytes

La description initiale fut faite par Von Recklinhausen en 1963 mais c'est Paul Ehrlich, en 1879, qui analysa en détail ces cellules métachromatiques. Ehrlich pensait que les granules cytoplasmiques de ces cellules correspondaient à des produits de phagocytose et baptisa ces cellules « cellules bien nourries » ou « mastzellen », devenu « mast cell » en Anglais et mastocytes en Français » *(Figure 9).* Le terme choisit « masto » dérive du grec qui signifie poitrine, et de l'allemand « mastung », qui signifie mastication (Vyas et Krishnaswamy, 2006). Ce sont des cellules ovalaires de 20-30 µm de diamètre avec un noyau central, leur cytoplasme est rempli de nombreux granules basophiles et métachromatiques (histamine, héparine).



Figure 9: Vue en microscopie électronique à transmission de la morphologie des mastocytes à l'état normal (gauche) et l'état de dégranulation (droite) (Keith et al., 2001).

Le mastocyte est connu comme étant la cellule la plus intimement liée à la notion **d'allergie** car il est susceptible de résumer à lui seul tous les aspects physiopathologiques importants de **l'hypersensibilité immédiate** (fixation d'IgE, activation par l'antigène, et dégranulation cytoplasmique, libération d'histamine, production rapide de médiateurs de l'inflammation ayant des effets délétères sur les organes cibles comme la peau, les vaisseaux ou les voies aériennes) pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique. En réalité le rôle des mastocytes est beaucoup plus large comme cela a été démontré ces dix dernières années **(Figure 10).** Le mastocyte n'est pas seulement une cellule stockant et produisant des médiateurs muno-compétente de part : **1**- sa capacité à synthétiser et libérer diverses cytokines qui régulent la réponse immunitaire ; **2**- sa capacité à s'associer avec les lymphocytes T et B, mais aussi les éosinophiles et les fibroblastes ; **3**- sa capacité de présentation de l'antigène. Le mastocyte pourrait également jouer un rôle non négligeable dans le remodelage de la matrice extracellulaire étant donné la présence au sein de ses granules de protéases neutres

(tryptase, chymase,...voir tableau 6). Les mastocytes sont donc des **acteurs de l'immunité innée** (Mekori et Metcalfe, 2000 ; Galli et al., 2005 ; Dawicki et Marshall, 2007) et **adaptative** (Galli et al., 2005 ; Gilfillan et Tkaczyk, 2006 ; Grimbaldeston et al., 2006 ; Boyce, 2007; Sayed et al., 2008). Les mastocytes ou ses produits de sécrétion sont impliqués dans : **1**- la dégradation de peptides endogènes potentiellement toxiques et de constituants de venins (Metz et al., 2006 ; Schneider et al., 2007; Piliponsky et al., 2008 ) ; **2**- la lyse d'agents pathogènes (Mekori et Metcalfe, 2000 ; Malaviya et Abraham, 2001 ; Dawicki et Marshall, 2007) **3**- la régulation du nombre, de la viabilité, du phénotype et de la fonction de cellules non immunitaires comme les fibroblastes et les cellules endothéliales **(Tableau 5).** 



Figure10 : Principales fonctions physiologiques des mastocytes humains dans des conditions normales. Les mastocytes modulent la sécrétion et la perméabilité épithéliale ; le péristaltisme et la bronchoconstriction des muscles lisses ; les fonctions endothéliales (écoulement du sang, coagulation et perméabilité vasculaire ; les fonctions immunitaires (recrutement et activation des neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes) ; les fonctions neuronales (interactions neuroimmunitaire, douleur) et des fonctions tissulaires (cicatrisation et fibrose). Les stimuli physiologiques sont mal définis et peuvent inclure des facteurs tissulaires, des facteurs de croissance, des agents infectieux, des neuropeptides, des antigènes ou des changements physicochimiques comme un changement de pH ou d'osmolarité. (D'après Bischoff., 2007)

Parallèlement à ces **propriétés effectrices**, les mastocytes sont également des acteurs important dans la **régulation « positive »** ou **« inhibitrice » de la fonction immunitaire** (Galli et al., 2008). Ces **fonctions immuno-modulatrices** peuvent s'illustrer par l'influence des mastocytes sur le recrutement, la survie, le développement et le phénotype de cellules immunitaires comme les granulocytes, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T, B, NK et NKT (Galli et al., 2008) (*Tableau 5*). Par ces propriétés effectrices et/ou immuno-modulatrices les mastocytes peuvent initier et exacerber un phénomène inflammatoire ou au contraire le diminuer.

Tableau 5 : Fonctions effectrices et immuno-modulatoires des mastocytes (d'après Galli et al., 2008).

#### **Fonctions effectrices:**

Incluent les fonctions physiologiques et pathologiques des mastocytes comme la régulation directe des **cellules non immunitaires** : cellules endothéliales vasculaires, fibroblastes, cellules nerveuses, cellules musculaires.

#### Exemples :

- Promotion de la clairance des agents pathogènes par phagocytose et/ou la sécrétion des peptides antimicrobiens,
- Dégradation de peptides endogènes potentiellement toxiques et de venin,
- Augmentation de la perméabilité vasculaire (par la libération de l'histamine),
- Stimulation de la contraction des cellules de muscle lisse bronchique (par libération de leucotriènes C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>)),
- Promotion de la synthèse de collagène par les fibroblastes (par la libération de la tryptase).

#### Fonctions immuno-modulatoires :

Incluent l'effet sur des **cellules immunitaires** (cellules dendritiques, cellules T et B, les monocytes/macrophages et les granulocytes) et l'effet sur des **cellules structurales** (cellules endothéliales vasculaires, cellules épithéliales et cellules de muscle lisse) qui modulent l'activité de cellules immunitaires.

#### Exemples des fonctions immunomodulatoires positives :

- Promotion de la migration, la maturation, la différenciation et de la fonction des cellules immunitaires par l'intermédiaire de la sécrétion de TNF, chimiokines, histamine, LTB4 et de protéases,
- Induction de l'apoptose par présentation de l'antigène aux cellules T (implication du CMH : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II) ou par liaison des IgE au récepteur FccRI,
- Promotion de la production des IgE par les cellules B (par la sécrétion de l'IL-4, IL-13 et CD40L),
- Promouvoir de l'expression de lymphopoietine (*TSLP : Thymic stromal lymphopoietin*) par les cellules épithéliales (par l'intermédiaire de sécrétion de TNF, IL-4 et IL-13),
- Promotion de recrutement de cellules immunitaires par la production de TNF et d'autres médiateurs qui augmentent l'expression de molécules d'adhérences par les cellules endothéliales vasculaires,
- Promotion de la réponse des cellules T-Helper (réponse T<sub>H</sub>2) par l'intermédiaire des effets de la prostaglandine D<sub>2</sub> sur la maturation des cellules dendritiques,
- Promotion de la production des chimiokines et cytokines par les cellules de muscle lisse (par l'intermédiaire de la sécrétion de TNF, IL-4 et IL-13).

#### Exemples des fonctions immunomodulatoires négatives :

- Suppression de la sensibilité lors de l'hypersensibilisation de contact (par l'intermédiaire de production de l'histamine induite par les UV-B)
- Suppression de la production de cytokines par les cellules T et les monocytes (par l'intermédiaire de sécrétion d'IL-10),
- Suppression de la production des cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les kératinocytes (par l'intermédiaire de sécrétion d'IL-10),
- Amélioration de la capacité des cellules dendritiques à diminuer la prolifération des cellules T et la production de cytokines (par sécrétion d'IL-10).

#### Origine

Les mastocytes sont issus de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse (lignée myéloïde) et constituent une lignée différente de celle des polynucléaires basophiles (dont la maturation est entièrement médullaire). Après un passage dans le sang, les précurseurs *(Colony-Forming Unit-mast : CFU-mast)* migrent dans les tissus où ils se différencient en mastocytes matures en fonction de leur microenvironnement (cytokines, molécules d'adhésion). Cette mastopoïèse (maturation) qui s'effectue dans un microenvironnement spécifique à chaque tissu et qui nécessite 2-3 mois est probablement une explication de l'existence de différents phénotypes mastocytaires qui différent par la nature des cytokines et protéases qu'ils contiennent.

Dans les tissus le nombre de mastocytes est relativement constant dans des conditions physiologiques ; leur nombre augmente quelque peu dans les situations inflammatoires ou dans la phase de remodelage tissulaire accompagnant la cicatrisation.

Au cours de la maturation les **progéniteurs CD34**<sup>+</sup> expriment de manière séquentielle des antigènes précoces non spécifiques : **le CD117 (c-kit, récepteur du SCF)**, le CD115 (ou récepteur du M-CSF), le CD116 (ou récepteur au GM-CSF) ; des marqueurs précoces de différenciation mastocytaire: FccRI (récepteur à haute affinité pour les IgE), la tryptase, l'histamine ; et des marqueurs tardifs de différenciation mastocytaire: chymase et héparine (Valent et Bettelheim, 1992). Le marqueur de choix pour la mise en évidence des mastocytes est la tryptase présente dans tous les mastocytes à l'exception des mastocytes de type MCC. La composante clé de la prolifération, de la différenciation et de la survie des mastocytes est le **SCF**, produit dans les tissus dans lesquels les mastocytes résident. Le SCF est l'agoniste du récepteur c-kit (ou CD 117) à activité tyrosyl-kinase. D'autres cytokines sont impliquées dans la maturation et la différenciation du mastocyte comme l'IL-3, l'IL-4, l'IL-9, l'IL-10 et le NGF (*nerve growth factor*) (Puxeddu et al., 2003). La durée de vie des mastocytes peut atteindre plusieurs dizaines d'années (Marshall, 2004).

Récemment une équipe de Toulouse vient de démontrer, dans le tissu adipeux de souris, l'existence d'une population de cellules souches hématopoïétiques similaires à celles de la moelle osseuse. Ces cellules sont capables de coloniser des organes périphériques (tissus autres que la moelle osseuse) et de s'y différencier en mastocytes matures et fonctionnels (Poglio et al., 2010). Si ces résultats sont confirmés chez l'homme ils ouvriront des perspectives thérapeutiques pour soigner les maladies immunitaires telles que l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, l'ostéoarthrite, les maladies allergiques...

## **Classification**

A l'issue de la différenciation on distingue, chez l'homme, deux types de mastocytes localisés dans des sites distincts selon leur contenu en protéases neutres *(Figure 11)* : les **mastocytes muqueux**, de type MCT, : *mast cell T*, qui ne renferment que de la tryptase et les **mastocytes séreux**, de type MCTC, qui contiennent de la tryptase, de la chymase mais aussi de la carboxypeptidase et de la cathepsine G. Une troisième population minoritaire, qui ne contient que de la chymase, a également été proposée et baptisée MCC mais leur rôle reste à élucider (Irani et Schwartz, 1990 ; Puxeddu et al., 2003). L'expression des protéases peut-être altérée par divers stimuli. Un traitement à l'IL-10 altéré chez la souris le contenu mastocytaire en protéases (Toru et al., 1998) et chez l'homme par un traitement à l'IL-4 augmente le taux de chymase dans les granules (Abraham and St John, 2010).





Les mastocytes tissulaires sont dérivés de cellules souches hématopoïétiques (HSC : Hematopoïetic stem cells) qui donnent lieu à des progéniteurs de mastocytes (MCP : mast-cell progenitors). Les MCP circulent dans le sang et pénètrent dans les tissus, où ils subissent une différenciation et une maturation pour devenir des mastocytes matures qualifiés de mastocytes résidants (connective-tissue mast cells : mastocytes séreux ; mucosal mast cells : mastocytes muqueux (D'aprés Galli et al., 2008).

Chez la souris on distingue les mastocytes séreux localisés dans les séreuses (peau) ou la cavité péritonéale et les mastocytes muqueux localisés dans les muqueuses intestinales. On peut raisonnablement admettre que les mastocytes de type MCT sont l'équivalent humains des mastocytes muqueux murins et les mastocytes MCTC ceux des mastocytes séreux.

Les différences entre ces deux classes diffèrent également par le type de granules de sécrétions qu'elles contiennent ainsi que par leurs réponses aux divers stimuli *(Tableau 6).* 

Les MC<sub>T</sub> sont localisés principalement au niveau des muqueuses, à proximité des lymphocytes T. On les qualifie de « mastocytes dépendants des lymphocytes T ». Les lymphocytes T associés sont de type Th<sub>2</sub>. Ce sont ces mastocytes qui orchestrent l'allergie et la réponse aux infections parasitaires.

Les **MC**<sub>TC</sub> sont qualifiés de « mastocytes **indépendants des lymphocytes T** ». Cependant, dans un environnement particulièrement riche en SCF, NGF, IL-4 et IL-6, les mastocytes muqueux peuvent se différencier en mastocytes séreux (Theoharides et Conti, 2004).

Classification	MC <sub>T</sub> (Associés au système immunitaire)	MC <sub>τc</sub> (Non associés au système immunitaire)
Localisation	Muqueuse du tractus Gastro-intestinal, voies respiratoires.	La sous-muqueuse du tractus gastro- intestinal et la peau.
Voie IgE	Activation dépendante et indépendante de l'IgE.	Activation dépendante et indépendante de l'IgE.
Enzymes principales	Tryptase	Tryptase, chymase, cathepsine G, carboxy- peptidase.
Métabolites de AA	$LTC_4$ , $PGD_2$ ( $\downarrow$ ).	$LTC_4$ ( $\downarrow$ ), PGD <sub>2</sub>
Principales Cytokines	IL-4 (↓), IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL- 16, TNF-α, GM-CSF, SCF, TGF-β.	IL-5 (↓), IL-6 (↓), IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNF-α, SCF.
Phénotypes pathologiques	Augmentés autour des sites d'activation des cellules T <sub>H</sub> . Augmentés dans les infections parasitaires et les allergies.	Augmentés dans les fibroses. Inchangée dans les infections parasitaires et les allergies.
	Diminués dans le SIDA et dans l'immunodéficience chronique.	Inchangée dans le SIDA et dans l'immunodéficience chronique.

Tableau 6: Caractéristic	ues des deux	phénotypes ma	ieurs de mastocv	tes (D'après	s Puxeddu et al 200	13).
		P				- / -

AA : Acide Arachidonique

#### Médiateurs mastocytaires

Les mastocytes sont une source très importante de médiateurs. Une grande quantité de médiateurs, immédiatement disponible, est stockée dans des granules plasmocytaires et libérée lors d'une stimulation cellulaire : ce sont des **médiateurs préformés.** Leur cinétique de sécrétion dépend de la voie d'activation, mais n'excède généralement pas une dizaine de minutes. D'autres médiateurs, moins spécifiques, sont synthétisés par le mastocyte après une stimulation cellulaire, il s'agit de **médiateurs néoformés**. Les cinétiques de sécrétion de ces médiateurs sont plus lentes car elles nécessitent l'intervention successive d'enzymes (**COX** : *cyclo-oxygénases*, **LOX** : *lipoxygénases*) ou une étape de transcription et de synthèse protéique (cytokines) (*Tableau 7*).

**Parmi les médiateurs préformés** on trouve l'histamine, des protéases neutres, des protéoglycannes, des hydrolases acides et des méralloprotéases. **L'histamine** est une amine vasoactive qui exerce des effets sur la perméabilité vasculaire et induit de nombreux symptômes de la réaction allergique aiguë (rougeur, oedème, etc...). **Les protéases** sont impliquées dans le remodelage tissulaire et le recrutement d'autres types cellulaires.

**Parmi les médiateurs néoformés** on trouve des **médiateurs lipidiques** (essentiellement des dérivés de l'acide arachidonique) comme : les **PGD2** : *prostaglandines D2* ; les tromboxanes ; les **LTB4** : *leucotriènes B4* et **LTD4** : *leucotriènes D4* ; le **PAF** : Platelet-activating factor ainsi que des **cytokines**. Les **médiateurs lipidiques** libérés par les mastocytes induisent généralement une bronchoconstriction, augmentent la perméabilité vasculaire et favorisent le recrutement des éosinophiles et neutrophiles. La cinétique de production rapide de ces médiateurs est essentielle à l'installation de la réponse immunitaire et au recrutement des cellules effectrices de manière précoce. Les **cytokines** libérés par les mastocytes sont pour certaines **pro-inflammatoires** (TNF-α, IL-1β) ou **anti-inflammatoires** et/ou **immuno-modulatrices** (IL-10, TGF-β). Les mastocytes sont généralement considérés comme des sources de type Th<sub>2</sub> (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) mais ils sécrètent également des cytokines de type Th<sub>2</sub> (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) mais ils sécrètent également des roytokines de type Th<sub>2</sub> (chémokines. Les mastocytes génèrent en effet des chémokines de type Th<sub>2</sub> (chémokines de type CC : CCL2, CCL3, CCL4, CCL5) et des chémokines apparentées

aux réponses Th<sub>1</sub> (chémokines de type CXC : CXCL1, CXCL2, CXCL8, 9, 10, 11) (Marshall, 2004). Ces médiateurs néo-formés participent au maintien de la réponse immunitaire.

Médiateurs	Fonctions
Produits associés aux granules:	
Histamine et sérotonine.	Augmentent la perméabilité vasculaire.
Héparine.	Favorise la fonction des chimiokines et des cytokines et l'angiogenèse.
Tryptase, chymase, carboxypeptidase et autres protéases.	Remodelage du tissu et recrutement des cellules effectrices.
TNF, VEGF et FGF2 .	Recrutent des cellules effectrices et favorisent l'angiogenèse.
Dérivés lipidiques :	
LTC4, LTB4, PGD2 et PGE2.	Recrutent des cellules effectrices, régulent la réponse immunitaire et favorisent l'angiogenèse.
Facteur d'activation plaquettaire.	Active des cellules effectrices, favorise l'angiogenèse et induit l'inflammation.
Cytokines :	
TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, GM-CSF, LIF, IFN- $\alpha$ et IFN- $\beta$	Favorisent l'inflammation
IL-12 et IFN-γ	Sécrétion des cytokines des cellules Th.
IL-10, IGF-B et VEGF	Regulent l'inflammation et l'anglogenese.
Chemiokines :	
CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 et CCL20	Recrutent des cellules effectrices: cellules dendritiques et CCL20, et régulent la réponse immunitaire.
CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10 et CXCL11	Recrutement des cellules effectrices et régulent la réponse immunitaire.
Autres :	
Les radicaux oxyde nitrique et superoxide	Bactéricides
Peptides antimicrobiens	Bactericides

Tableau 7: Les principales classes de médiateurs libérés par les mastocytes (D'après Galli et al., 2005; Pundir et Kulka, 2010)

La sécrétion des médiateurs mastocytaires ne s'accompagne **pas toujours d'une dégranulation massive** (Weller et al., 2011). En effet, les mastocytes interviennent dans de nombreux processus de régulation de la réponse immunitaire sans pour autant provoquer un choc anaphylactique. Le concept de relargage sélectif de médiateurs est apparu dès le début des années 80. Theoharides et al. (1982) ont montré que la sécrétion de sérotonine ne s'accompagne pas forcément d'une sécrétion d'histamine. De même, la sérotonine peut être relarguée en absence des métabolites de l'acide arachidonique et ces derniers en absence d'histamine (Benyon et al., 1989 ; Levi-Schaffer et Shalit, 1989 ; von Haaster et al., 1995).

Introduction 33

L'IL-1 stimule la sécrétion unique de l'IL-6 sans induire de dégranulation dans les mastocytes humains (Kandere-Grzybowska et al., 2003). Bien d'autres exemples sont recensés dans la littérature (Theoharides et al., 2007).

Les mécanismes moléculaires de **dégranulation sélective** ne sont pas tous élucidés à l'heure actuelle. La sécrétion différentielle de la sérotonine serait réalisée par le relargage du médiateur à partir de protéines de liaison sélective de la sérotonine présentes dans des vésicules contenues dans les granules de sécrétion (Tamir et al., 1982). La sécrétion sélective d'IL-6 en réponse à l'IL-1 impliquerait des vésicules de 40 à 80 nm, indépendantes des granules de sécrétions dont la taille est de 800 à 1000 nm (Kandere-Grzybowska et al., 2003). Les médiateurs seraient séquestrés par des récepteurs sélectifs, non fonctionnels exprimés à la surface de vésicules et seraient relargués en temps utiles selon le stimulus et sa signalisation intracellulaire particulière (Theoharides et al., 2007).

#### Mastocytes et tumeurs

De nombreuses études histologiques confirment que le nombre de mastocytes est augmenté dans le stroma de nombreuses tumeurs (Figure 12): angiosarcome (Demitsu et al., 2000), astrocytomes (Sharma et al., 2004), cancer du pancréas (Theoharides, 2008), cancers de l'endomètre utérin (Cinel et al., 2009), cancers du colon (Gounaris et al., 2007), tumeurs mammaires (Amini et al., 2007; Rajput et al., 2007), mésothéliomes pleuraux et cancers colorectaux (Sinnamon et al., 2008; Ali et al., 2009). Les mastocytes au sein des niches tumorales sont dégranulants et sont en étroit contact avec les cellules tumorales. Les auteurs ont suggéré que des interactions directes cellule tumorale/mastocyte peuvent exister (Demitsu et al., 2000). Il a été observé que les mastocytes sont infiltrés dans les tumeurs de manière précoce, bien souvent avant l'installation d'une prolifération néoplasique intense et avant la néoangiogenèse en réponse à de nombreux facteurs chémoattracteurs. Ils seraient recrutés dans le stroma tumoral avant l'infiltration des TAM et des TIL (Maltby et al., 2009) indiquant que les mastocytes interviennent très tôt dans le processus de carcinogenèse (Chow et al., 1988 ; Ferguson et al., 1999 ; Powell et al., 1999 ; Sharma et al., 2004). Les mastocytes auraient des capacités migratoires accrues en présence de surnageants de culture de nombreuses lignées tumorales. Cette migration n'est pas observée avec des surnageants de culture primaire et de lignées cellulaires non-tumorales, ce qui suggère l'implication de facteurs intrinsèques des tumeurs (Poole et Zetter, 1983).

Plus récemment, le SCF a été identifié comme étant l'un des facteurs clé favorisant l'accumulation des mastocytes dans le stroma tumoral (Zhang et al., 2000). **Deux mécanismes différents de recrutement** sont proposés. Les mastocytes du stroma tumoral pourraient résulter de l'attraction de mastocytes **résidants** des tissus sains périphériques. Ils pourraient par ailleurs provenir du recrutement *de novo* de progéniteurs par voie sanguine. **Ces deux mécanismes pourraient coexister** et les travaux menés dans ce cadre n'ont pas permis, pour l'heure, de statuer sur la question.



Figure 12 : Infiltration des mastocytes dans les masses tumorales. (a) cancer de la tête et du cou ; (b, c) cancer des poumons ; (d, e) cancer des ovaires ; (f) maladie de Hodgkin. Sur les coupes de tissus représentées, le marquage immunocytochimique de la tryptase révèle la localisation des mastocytes (brun) dans les tissus adjacents des niches tumorales et des vaisseaux sanguins. Une coloration au Giemsa (d) confirme la présence de mastocytes intacts par la coloration pourpre intense due aux granules de sécrétion (d'après Samoszuk et al., 2005).

Cette dernière est d'autant plus difficile à résoudre que de nombreuses cellules du stroma inflammatoire expriment des marqueurs membranaires caractéristiques des mastocytes. Les cellules myéloïdes immatures, par exemple, expriment le CD34, le récepteur CCR1 ainsi que les MMP2 et MMP9 (Kitamura et al., 2007). Chacun de ces marqueurs est exprimé par les mastocytes à différents stades de maturation. La MMP9, par exemple, est un marqueur des

progéniteurs de mastocytes ; elle n'est plus exprimée au stade avancé de maturation, sous l'effet du SCF (Tanaka et al., 1999). D'autre part, les mastocytes expriment eux aussi des marqueurs caractéristiques d'autres cellules stromales. Il apparaît donc que la question de l'origine des mastocytes dans les tumeurs est extrêmement difficile à résoudre. Une complexité supplémentaire est apportée par des observations qui suggèrent que les mastocytes présents dans les masses tumorales n'ont pas, ou n'ont plus, les caractéristiques des mastocytes des tissus sains. Andersson et al. (1976) avait observé que dans des tumeurs mammaires induites chez la souris, les mastocytes de masses tumorales ne répondent pas au composé 48/80 alors que l'injection de ce composé dans l'oreille des souris induit l'activation mastocytaire immédiate. Cette observation a été plus ou moins corroborée vingt ans plus tard : Diaconu et al. (2007) ont observé un nombre accru de mastocytes de type  $MC_{TC}$  dans les BCC : *basal cell carcinoma*. Cependant l'activité chymase serait partiellement inhibée par la présence d'inhibiteurs de chymase. Cette caractéristique a été observée dans d'autres situations pathologiques au niveau cutané comme le psoriasis ou la réaction du prick-test.

Cette accumulation de mastocytes est, dans la majorité des cas, associée à un faible pronostic vital des patients atteints de tumeurs (Khazaie et al., 2011; Takanami et al., 2000). Par exemple, dans un modèle murin de cancer du pancréas induit par l'activation de l'oncogène MYC, les mastocytes seraient la seule population de cellules inflammatoires à augmenter de manière précoce ; leur infiltration est corrélée à la prolifération rapide des cellules pancréatiques (Theoharides, 2008). Une densité particulièrement élévée de mastocytes a été observée dans les cancers de l'endomètre utérin, dans lesquels ils favoriseraient l'invasion du myomètre (Cinel et al., 2009). La plupart des cancers du colon se développent à partir de polypes adénomateux. Gouranis et al. (2007) ont montré que les mastocytes induisent la progression des polypes du stade bénin au stade pré-néoplasiqe. Cependant des résultats contraires sont observés dans certaines tumeurs mammaires (Dabiri et al., 2004) ou l'infiltration des mastocytes serait bénéfique pour le pronostic vital (Amini et al., 2007; Rajput et al., 2007). Le nombre de mastocytes présents au sein des masses tumorales serait d'autant plus élevé que le grade de malignité est bas. Cette observation recoupe les études menées sur les patients atteints de cancer du foie et certains cas de mésothéliomes pleuraux et de cancers colorectaux (Sinnamon et al., 2008 ; Ali et al., 2009).

Selon le tissu, le type de tumeur, le grade de la tumeur et le microenvironnement la réactivité mastocytaire est différente. Aussi, il n'est pas aisé de statuer sur le caractère bénéfique ou néfaste de l'infiltration des mastocytes dans les tumeurs.

## Rôle néfaste des Mastocytes infiltrés dans les tumeurs

Des études épidémiologiques révèlent que les mastocytes influencent le pronostic vital des patients atteints de cancer. L'infiltration des mastocytes est soit bénéfique, soit néfaste, selon les types de cancers considérés et leur stade d'avancement. Cette dualité est très bien illustrée par le rôle potentiel des différents médiateurs mastocytaires. Coussens et al. (1999) suggèrent que les mastocytes présents à des stades tumoraux précoces initient l'angiogenèse en faveur de la progression tumorale. À des stades de cancérisation plus avancés, ce seraient les cellules tumorales elles-mêmes qui prendraient le relais pour assurer la néoangiogenèse. D'autres études confirment le fait que les mastocytes sont essentiels au développement de cette vascularisation anarchique. Les tumeurs induites chez des animaux de type W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup>, déficients en mastocytes, présentent les caractéristiques d'un tissu hypoxique (Soucek et al., 2007). Les mastocytes peuvent favoriser le développement tumoral de différentes manières : 1- par sécrétion de VEGF qui va stimuler l'angiogénèse et permettre l'apport de nutriments à la tumeur (Boesiger et al., 1998 ; Grutzkau et al., 1998 ; Nienartowicz et al., 2006; Ozdemir, 2006); 2- par sécrétion d'IL-8 qui possède des chémotactiques les cellules tumorales propriétés envers peut induire une angiogénèse tumorale (Bailey et al., 2007; Powell and Mousa, 2007). L'IL-8 (tout comme les autres facteurs sécrétés par les mastocytes : VEGF, bFGF, l'héparine, l'histamine, l'angiopoïétine-1, le TNF- $\alpha$ , protéases) est un facteur pro-angiogénique ; **3-** par **l'EGF** : Epidermal Growth Factor, le FGF: Fibroblast Growth factor, le PDGF: Platelet-Growth Factor, le SCF et NGF, le MIF : Macrophage Inhibitory Factor qui est un relais entre l'inflammation et le cancer (Bucala and Donnely, 2007); 4- par le TGF-β1 : Transforming Growth Factor beta-1 qui peut réguler l'influence du microenvironnement sur le développement tumoral (Stover et al., 2007); 5- par l'histamine qui par activation des récepteurs H<sub>1</sub> stimule la prolifération tumorale et induit une action immuno-suppressive par activation des récepteurs H<sub>2</sub> (Jutel et al., 2001). La terfénadine, antagoniste H<sub>1</sub>, induirait l'arrêt du cycle cellulaire des cellules tumorales en phase G0/G1 et l'apoptose (Liu et al., 2003). La ranitidine, antagoniste des récepteurs H<sub>2</sub>, est utilisée en traitement adjuvant aux

Introduction 37

thérapies anti-cancéreuses pour contrecarrer les effets secondaires gastriques (vomissements) qu'elles induisent. Des études montrent que le traitement par la ranitidine augmente la durée de vie des patients atteints de cancers colorectaux (Nielsen et al., 2002). Chez la souris, elle n'a que peu d'effets anti-prolifératifs sur des cellules de mélanomes alors que la cimétidine (autre antagoniste H<sub>2</sub>) est plus efficace (Theoharides et Conti, 2004); 6- les métalloprotéinases qui désorganise l'épithélium du stroma tumoral et permet l'invasion tout particulièrement dans le cas d'adénocarcinome mammaire (Almholt and Johnsen, 2003). Les mastocytes sont des sources importantes de protéases qui favorisent le remodelage de la matrice extracellulaire. Ce processus favorise non seulement la fuite des cellules tumorales et les métastases, mais il favorise également le relargage de facteurs de croissance séquestrés dans les mailles de la matrice extracellulaire comme le SCF et le FGF-2. Ceci induit la prolifération et la migration des cellules endothéliales et de ce fait stimule l'angiogenèse et la croissance tumorale (Maltby et al., 2009). Les mastocytes peuvent également perturber la barrière hémato-encéphalique et favoriser les métastases des tumeurs cérébrales (Esposito et al., 2002); 7- par exacerbation des phénomènes d'immunosuppression en réponse à l'infiltration stimulée par le SCF sécrété par les tumeurs (Huang et al., 2008).

## Rôle bénéfique des Mastocytes infiltrés dans les tumeurs

L'accumulation des mastocytes dans les sites tumoraux pourrait également favoriser la **régression** tumorale. Les mastocytes périvasculaires d'adénocarcinome mammaire sécrètent des cytokines et d'autres enzymes protéolytiques qui pourraient être néfastes pour les cellules tumorales. En effet, la tryptase libérée pourrait stimuler les récepteurs PAR-1 et -2, (activés par la thrombine et la trypsine) et induire une inflammation excessive néfaste pour la tumeur (D'Andrea et al., 2001). Les cytokines comme l'IL-4 peuvent conduire à l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires (Gooch et al., 1998). Le TNF- $\alpha$  pourrait également induire une apoptose des cellules tumorales de façon directe (Theoharides and Conti, 2004). Les proteoglycanes à héparan sulfate libérés par les mastocytes peuvent inhiber la liaison de l'héparine à la surface cellulaire et donc inhiber la néovascularisation (Fannon et al., 2003). Les cellules tumorales sécrètent des polyamines oxydées qui inhibent la stimulation (dégranulation) mastocytaire et potentialisent l'effet bénéfique des mastocytes (Theoharides and Conti, 2004). Les cellules tumorales sécrètent des

glycoprotéines comme le sulfate de chondroïtine, l'héparan sulfate et des glycosaminoglycanes sulfatés qui s'accumulent particulièrement dans les tumeurs des glandes mammaires et les lésions métastasiques (Hinrichs et al., 1999). Ces macromolécules permettent l'interaction des cellules cancéreuses avec d'autres cellules ou avec la matrice extracellulaire et de ce fait les « neutralisent ». Le sulfate de chondroïtine soluble sécrété par les mastocytes peut piéger ces glycoprotéines des cellules tumorale et diminuer ainsi leur capacité migratoire. En effet l'administration de sulfate de chondroïtine inhibe la migration des cellules cancéreuses de l'ovaire ((Hinrichs et al., 1999 ; Kokenyesi 2001). D'autre part, l'acidité, induite par la production accrue de peroxydes dans les masses tumorales, inhiberait la dégranulation massive, mais augmenterait la production d'IL-4. Le NO généré par certains vaisseaux inhiberait également, tout comme les polyamines oxydées produits par la tumeur, la dégranulation (Theoharides and Conti, 2004).

## Mastocytes et système nerveux

Les mastocytes sont localisés aux terminaisons nerveuses de différents comme les poumons, la peau, les intestins et le système nerveux central. Cellules nerveuses et mastocytes sécrètent des médiateurs et peuvent donc une communication entre les deux types cellulaires. Les mastocytes peuvent moduler l'activité neuronale par sécrétion d'histamine, de sérotonine ou de tryptase ; les cellules nerveuses peuvent activer les mastocytes par exocytose de CGRP : Calcitonin gene-related peptide, de SP : Substance P, et d'ET-1 : Endothéline-1 (Welle, 1997). L'homéostasie au niveau intestinal est maintenu grâce à une coopération entre les mastocytes et les cellules nerveuses qui assure la régulation des flux ioniques, la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales, la perméabilité et la motilité intestinale (Van et al., 2007). Cette coopération mastocytes-neurones est également à l'origine de phénomènes immunosuppressifs impliquant l'IL-10, l'IL-4, le TNF- $\alpha$ , l'histamine, le PAF : Platelet-Activating Factor, la PGE2 : Prostaglandine E2 (Hart et al., 2000). Les mastocytes libèrent outres les facteurs de croissances et médiateurs inflammatoires, des peptides vaso-actifs dont certains désorganisent la barrière hématoencéphalique. Il s'agit notamment de la bradykinine, le CRH : Coticotropin-releasing hormone, la PGD<sub>2</sub> : prostaglandine  $D_2$ , la NT : neurotensine, la SP : substance P, la tryptase, l'IL-6, l'IL-8, le VIP : Vasoactive Intestinal Peptide et le VEGF (tableau 8). Des neuropeptides, comme la SP (Ali et al., 1986), la NT (Carraway et al., 1982) et le NGF : nerve growth factor (Bienenstock et al., 1987 ; Tal and Liberman, 1997), libérés lors d'états de stress (De Simone et al. 1990), peuvent stimuler les mastocytes. Des peptides, comme la NT (Souazé et al. 2006), ou d'autres molécules libérées par les cellules tumorale, comme l'adrénoméduline (libérée par des cellules de carcinomes pulmonaire (Yoshida et al. 2001)), peuvent également stimuler les mastocytes.

Les mastocytes sont indéniablement impliqués dans la régulation de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique et dans la promotion tumorale. De ce fait, les mastocytes du SNC sont des cibles potentielles intéressantes pour la régulation du développement tumoral des gliomes.

 Tableau 8: Principaux médiateurs mastocytaires qui désorganisent la barrière hématoencéphalique

 (Theoharides et al., 2008)

Bradykinine
CRH : Corticotropin-Releasing Hormone
Endorphine
Endothéline
Histamine
IL-8
Neurotensine
NO : Oxyde nitrique
PGD <sub>2</sub> : Prostaglandine D <sub>2</sub>
SP : Substance P
TNF : Tumor Necrosis Factor
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIP: Vasoactive Intestinal Peptide
Ucn: Urocortin

Les études sur le rôle des mastocytes dans le développement tumoral restent contradictoires et ne permettent pas de statuer sur le rôle néfaste ou bénéfique des mastocytes. Cependant, les études indiquent clairement que le mastocyte joue un rôle clé dans le processus de cancérogenèse. L'évaluation des bénéfices/risques de l'infiltration précoce des mastocytes au sein des tumeurs apparaît donc essentielle à la compréhension du processus de cancérogénèse. Le présent travail a consisté à déterminer l'effet des mastocytes sur la croissance des astrocytomes, tumeurs cérébrales les plus fréquentes, pour lesquelles les thérapies conventionnelles n'apportent que peu d'issues favorables pour la survie des patients atteints.

# Complexe « CD47 – SIRP »

Le récepteur CD47 ou integrin-associated protein (IAP) interagit avec différentes intégrines :  $\alpha_v\beta_3$  (cellules endothéliales, mélanomes),  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (plaquettes),  $\alpha_2\beta_1$  (muscle lisse) et  $\alpha_4\beta_1$ . Le récepteur CD47/IAP interagit également avec deux ligands une protéine transmembranaire, SIRP (signal regulatory protein ou SHPS-1) et une protéine extracellulaire, la thrombospondine, libérée après activation par les plaquettes, macrophages et fibroblastes. Le récepteur CD47 contrôle les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire et de ce fait est impliqué dans les phénomènes de migration, de prolifération cellulaire et d'apoptose. De façon intéressante, la glycoprotéine SIRP $\alpha$  est faiblement exprimée par plusieurs types de cancers (*Cancer de cellules hépatiques, cancer du cerveau, glioblastomes*) (*Wang et al., 2008*). L'augmentation de l'expression de SIRP $\alpha$  réduit la croissance et la migration tumorale (*Chen et al., 2004 ; Li et al., 1999 ; Ruhul et al., 2002*). L'interaction SIRP $\alpha$ /CD47 régule la transmigration tissulaire des neutrophiles (*Chin et al., 2009*). Ce résultat conforte l'hypothèse d'un rôle majeur de la signalisation dépendante du CD47 dans le développement des astrocytomes. La compréhension de la régulation de l'expression du CD47, de SIRPs et des intégrines est la substance de notre projet.

#### Le récepteur CD47/IAP

Le récepteur CD47 ou IAP (integrin-associated protein) est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire de 50 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Ce récepteur est composé de cinq segments transmembranaires. Son extrémité N-terminale, extracellulaire, comporte un domaine de type Immunoglobulin-like lgV hautement glycosylé (Brown and Frazier, 2001). Quatre isoformes du CD47 ont été caractérisées à ce jour. Ces isoformes, issus d'un épissage alternatif, diffèrent par la longueur de l'extrémité C-terminale qui varie entre 3 et 36 résidus amino-acyls (Reinhold et al., 1995). Le CD47 est impliqué dans des interactions cellule-cellule par liaison avec les glycoprotéines transmembranaires de la famille SIRP (signal-regulatory protein) (Vernon-Wilson et al., 2000). Le CD47 est par ailleurs impliqué dans des interactions cellule-matrice extracellulaire par liaison avec les glycoprotéines de la famille des thrombospondines, dont cinq membres ont été caractérisés (Adams and Lawler, 2004). Le domaine C-terminal des thrombospondines contient deux exemplaires du motif Val-Val-Met (VVM), séquences

peptidiques indispensables à la liaison des thrombospondines avec le CD47, ainsi qu'un motif de liaison aux intégrines (RGD) (Gao and Frazier, 1994) *(Figure 13).* 



*Figure 13: Structure du récepteur CD47 et ses ligands endogènes. HBD: heparin-binding domain; PC: collagen-binding domain; CBD: C-terminal cell binding domain ; MEC : matrice extracellulaire.* 

Le CD47 intervient dans divers effets physiopathologiques. Il stimule l'activation plaquettaire (Dorahy et al., 1997; Chung et al., 1999) ainsi que la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (Yabkowitz et al., 1993). En coopération avec les intégrines, il permet l'activation des polynucléaires neutrophiles par la matrice extracellulaire (Lindberg et al., 1996) et stimule la synthèse de cytokines au niveau des monocytes (Hermann et al., 1999). Ces effets suggèrent une propriété pro-inflammatoire du CD47. Cependant, des propriétés anti-inflammatoires lui sont attribuées car il inhibe la synthèse de cytokines par les macrophages et les cellules dendritiques (Armant et al., 1999; Avice et al., 2000), mais cette fonction ne nécessite pas la présence des intégrines, tout comme cela semble être le cas pour les interactions cellule-cellule modulées par le couple CD47/SIRP. Ceci a soulevé la possibilité que le CD47 pouvait engendrer des réponses cellulaires n'impliquant pas les intégrines, ce qui a été documenté par la mise en évidence de l'apoptose caspase-indépendante induite par le CD47 au niveau des cellules de lymphomes B (Mateo et al.,

Introduction 42

1999), ou par la démonstration d'une sensibilité accrue aux infections bactériennes pour les souris CD47-/- (Lindberg et al., 1996).

L'étude du rôle physiopathologique du CD47 se heurte cependant à un problème majeur qui est l'absence d'antagonistes connus. D'autre part, la signalisation intracellulaire de ce récepteur est très peu documentée à l'heure actuelle. Brown et Frazier (2001) ont proposé que le récepteur CD47, composé de 5 segments transmembranaires, pourrait en s'associant aux intégrines (2 segments transmembranaires) mimer un récepteur à 7 hélices classiquement couplé aux protéines G.

Les protéines G hétérotrimériques sont des acteurs majeurs de la signalisation intracellulaire. Elles sont composées de 3 sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Leurs sous-unités  $\alpha$  ont une masse de 39 à 52 kD. Les sous-unités  $\beta$  (36 kD) et  $\gamma$  (7 à 8 kD) forment un dimère considéré comme fonctionnellement indissociable. Les protéines G trimériques sont localisées principalement sur la face interne de la membrane plasmique où elles sont associées par isoprenylation ou myristylation de  $\alpha$  et  $\gamma$ . Les premières protéines G caractérisées ont été les protéines Gs, stimulant l'adénylate cyclase (AC), et les protéines Gi, inhibant cette enzyme. Puis leur caractère trimérique à été découvert, suivi de l'identification d'isoformes de chaque sous-unité. 20 sous-unités  $\alpha$ , 5  $\beta$  et 13  $\gamma$  ont été caractérisées à ce jour. Il existe donc potentiellement une multitude de trimères  $\alpha\beta\gamma$  mais la portée et les conséquences de ces associations n'ont pas encore été évaluées. La famille Gs comprend les protéines dont les sous-unités  $\alpha$  sont  $\alpha$ s et  $\alpha$ olf qui stimulent l'AC. Alors que la protéine  $\alpha$ s est présente dans la plupart des tissus,  $\alpha$  olf est localisée principalement au niveau de l'epithélium olfactif et à faible taux dans le cerveau. La famille Gi comprend les protéines dont les sous-unités α sont  $\alpha$ i1,  $\alpha$ i2,  $\alpha$ i3,  $\alpha$ o1,  $\alpha$ o2 et  $\alpha$ z, ainsi que les transducines de la rétine,  $\alpha$ t1, dans les cellules en cônes, et at2, dans les cellules en bâtonnets, et la gustducine agust dans les cellules gustatives. La famille Gq comprend les protéines dont les sous-unités  $\alpha$  sont  $\alpha q$  et  $\alpha 11$ , largement réparties, ainsi que  $\alpha 14$  et  $\alpha 15$ , exprimées surtout dans les cellules hématopoïétiques, et a16. Les sous-unités a de cette famille stimulent les phospholipases C $\beta$ . La famille G12 comprend les protéines dont les sous-unités  $\alpha$  sont  $\alpha$ 12, largement réparties, et α13, exprimées surtout dans les cellules gustatives.

La présence d'une sous-unité  $\alpha$  confère la possibilité de couplage à un ou plusieurs effecteurs, mais s'y ajoutent encore les couplages potentiels assurés par les dimères  $\beta\gamma$ . En

pratique, l'intervention d'une protéine G trimérique initie toujours plusieurs voies de signalisation (Landry et al., 2006).

# SIRPα : Signal regulatory protein α

Les protéines **SIRP** $\alpha$  (également appelées : SHPS-1, SIRPA, p84 ou BIT) appartiennent à la famille des immunoglobulines qui comportent trois domaines immunoglobuline-like à l'extrémité extracellulaire N-terminale et un domaine ITIM à l'extrémité intracellulaire (Matozaki et al., 2009). Cette famille comporte également deux autres membres : **SIRP-** $\beta$ 1 (connu sous le terme SIRP- $\beta$  ou CD172b) et **SIRP-** $\gamma$  (connu sous le terme SIRP- $\beta$ 2 ou CD172g) (*Figure 14*). Les protéines SIRP $\alpha$  et SIRP- $\beta$ 1 ont été révélées chez l'Homme, la souris et le rat tandis que la protéine SIRP- $\gamma$  a été uniquement caractérisée chez l'Homme. Ces protéines transmembranaires se différencient par leur couplage intracellulaire (Matozaki et al., 2009). Les protéines SIRP- $\beta$ 1 sont caractérisées par une extrémité cytoplasmique courte couplée, par l'intermédiaire d'une lysine transmembranaire, à une protéine adaptatrice, DAP-12, qui contient un domaine **ITAM** : *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif.* Les protéines SIRP- $\gamma$  malgré la présence d'une extrémité cytoplasmique courte ne se couple pas à la protéine adaptatrice DAP-12 et la voie de signalisation reste à élucider.



Figure 14: Représentation schématique de la structure des membres de la famille SIRP (Matozaki et al., 2009). Le récepteur CD47 interagit avec SIRP- $\alpha$  et SIRP- $\gamma$  mais pas avec avec SIRP- $\beta$ 1. Y : indique le site de phosphorylation de la tyrosine, + : indique le résidu lysine chargés positivement dans la région transmembranaire de la SIRP $\beta$ ).
Les récepteurs CD47 sont des ligands qui se fixent aux extrémités extracellulaires de SIRP- $\alpha$  avec une très bonne affinité et de SIRP- $\gamma$  avec une affinité moindre (Brooke et al., 2004). Une interaction de SIRP- $\beta$ 1 avec le récepteur CD47 n'a pas été démontré à ce jour (Dietrich et al., 2000 ; Seiffert et al., 2001 ; Hayashi et al., 2004 ; Liu et al., 2005). SIRP- $\gamma$  est notamment exprimé dans les cellules T et NK ou il jouerait un rôle de co-stimulateur de récepteurs de ces cellules (Brooke et al., 2004 ; Piccio et al, 2005) ; les voies de signalisation restent, là encore, à élucider.

L'activation de SIRP- $\alpha$  par le récepteur CD47 se traduit par une autophosphorylation de SIRP- $\alpha$  sur des résidus tyrosyls. Ces résidus phosphorylés sont des points d'ancrage pour des tyrosines phosphatases à domaines SH2 : *Src Homogy-2 (SH2)-domain-containing protein tyrosine phosphatases (PTP), SHP-1 et SHP-2*. Après liaison par leur domaines SH2, les PTP-1 et -2 sont activées et initient des réponses cellulaires diverses (*Figure 15*).



Figure 15: Interaction du récepteur CD47 avec SIRPα et voies de couplage (Matozaki et al,2009).

a: SIRPα est une protéine transmembranaire qui contient trois domaines de type Ig dans sa région extracellulaire et deux sites de phosphorylation de tyrosine dans la partie cytoplasmique. L'interaction entre SIRPα et CD47 pourrait déclencher une signalisation intracellulaire de façon bidirectionnelle; b: les résidus tyrosyls phosphorylés de la protéine SIRPα se couplent aux protéines tyrosine phosphatases cytosoliques, SHP-1 et SHP-2. SHP-1 est principalement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et régule négativement les différentes fonctions des cellules. SHP-2 est une protéine ubiquitaire qui régule la fonction des petites protéines G, notamment Ras et Rho, contribuant ainsi à un rôle de stimulation des fonctions cellulaires.

Les SHP-1 sont exprimées dans les cellules hématopoïétiques ainsi que dans les cellules épithéliales et inhibent des fonctions cellulaires diverses (Neel et al., 2003). Par contre les SHP-2, exprimées dans divers types cellulaires, activent des fonctions cellulaires. Les SHP-2 activent des petites protéines G comme *Ras* qui stimulent la prolifération cellulaire ou *Rho* qui active la migration cellulaire (Neel et al., 2003). SIRPα se couple également à des molécules adaptatrices cytosoliques comme la SKAP55hom/R : *Src Kinase-Associated Protein of 55 kDa Homology* ou la FYB/SLAP-130 : *Fyn-binding protein/SLP-76-associated phosphoprotein of 130 kDa* ainsi que la tyrosine kinase PYK2 (Timms et al., 1999). L'implication physiologique de ces voies de couplage reste à élucider.

Nous allons approfondir les mécanismes de couplage du récepteur CD47. Ces études de signalisation seront menées sur des astrocytes et des astrocytomes. Parallèlement nous allons étudier l'expression du complexe CD47-SIRPs-intégrines sous l'influence des modifications du microenvironnement tumoral. En effet, le stroma entourant la tumeur est extrêmement important pour la croissance des cellules tumorales et diverses expériences suggèrent que les processus inflammatoires locaux contribuent au développement de la malignité. Les mastocytes, cellules clé de l'immunité et de l'inflammation, sont parmi les premières cellules à être recrutées dans le processus de carcinogénèse, comme le confirme l'infiltration massive de mastocytes dans diverses tumeurs. Nos résultats effectués sur un modèle de coculture astrocytome/mastocytes montrent que les mastocytes stimulent la migration des astrocytomes et l'expression de la protéine transmembranaire SIRPa. Sur la base de ces observations, nous nous concentrerons sur l'étude des interactions mastocytes/astrocytomes et tout particulièrement sur le complexe CD47-SIRPs-intégrines mis en jeu lors de ces interactions.

# Matériel et Méthodes

# Les cultures cellulaires des lignées

# Culture des astrocytomes humains (1321N1, SW-1783, U373, CCF-STTG1, U87) :

Pour nos études nous utilisons des astrocytomes de lignée apparentées aux différents grades de gliomes selon la classification WHO 2007.

Les **lignées 1321N1 (grade II), SW-1783 (grade III), U373 (grade III) et CCF-STTG1 (grade IV),** proviennent de l'ECACC (*European Collection of Cell Culture ;* Salisbury, UK). Les **lignées U87** apparentées au **grade IV**, grade le plus malin selon la classification WHO 2007, proviennent de l'ATCC (*American Type Culture Collection ;* Rockville, IN, USA).

Les lignées cellulaires U87 et U373 sont cultivées en milieu EMEM (Minimum Essential Medium Eagle ; Lonza, Bâle, Suisse). Les lignées 1321N1 sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's modified eagle's Medium, Lonza, Verviers, Belgique). Les lignées CCF-STTG1 sont cultivées en milieu RPMI (Roswell Park Institute Medium, GIBCO) et les lignées SW-1783 sont cultivées en milieu L-15 (Medium Leibovitz, Sigma, Saint-Louis, USA). Tous les milieux de cultures sont supplémentés de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (56°C pendant 30 min), de 2 mM de L-glutamine, de 100 µg/mL de gentamycine, de 100 UI/mL de pénicilline et de 50 µg/mL de streptomycine. Les composés ajoutés aux milieux proviennent tous de la société Lonza. Le passage des cellules est effectué tous les trois à quatre jours. À ce stade, lorsqu'elles atteignent 90% de confluence, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS (Phosphate Buffered Saline : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,3) puis détachées par un traitement à la trypsine (0,25% trypsine/0,53 mM EDTA ; Lonza, Verviers, Belgique) pendant 3 min à 37°C. L'action enzymatique de la trypsine est neutralisée par l'addition de milieu EMEM contenant 10% de SVF. La suspension cellulaire est alors ensemencée selon un ratio de 1 : 3 à 1 : 5 selon les recommandations des fournisseurs.

Les cellules sont toutes cultivées dans un incubateur à  $37^{\circ}$ C sous atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> et saturée en vapeur d'eau excepté la lignée SW-1783 qui est cultivée dans une étuve à  $37^{\circ}$ C.

# Temps de génération des lignées d'astrocytomes

Nous avons déterminé les temps de génération des lignées d'astrocytomes humains (U87, CCF-STTG1, U373 et SW-1783) en cultivant les cellules dans des boites T25 (Nunc, Roskilde,

Danemark) à raison de 5.10<sup>5</sup> cellules/boite, et chaque jour, les cellules sont trypsinées, comme indiqué ci-dessus, et comptées pendant 4 jours.

Pour calculer le temps de génération (TG) qui correspond au temps nécessaire au doublement de la population exprimé en minutes ou en heures. On défini le nombre de division (n) par :

# G = t/n

La vitesse spécifique de la croissance est  $\mu$ . Elle correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe ln N = f(t)

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

N1= nombre de cellules au temps t1N2 = nombre de cellules au temps t2

Or  $TG = (1/\mu) x \ln N / N_0$ ; avec  $N = 2N_0$ 

```
soitTG = (1/\mu) \times \ln 2 \rightarrow TD = \ln 2/\mu
```



Figure 16 : Observation au microscope optique des cultures cellulaire de la lignée U87 dans un milieu EMEM supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal à 37°C sous atmosphère à 5% CO<sub>2.</sub>



Figure 17 : Suivie de la croissance cellulaire de la lignée U87 dans un milieu EMEM supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal à 37°C sous atmosphère à 5% CO₂.

Tableau 9: Les différents temps de génération des lignées d'astrocytomeset d'astrocyteshumains.

Lignées	Temps de génération G (jours)		
Astrocytes	2,10		
U373 (Grade III)	0,85		
SW-1783 (Grade III)	1,15		
U87 (Grade IV)	1,3		
CCF-STTG1(Grade IV)	1,26		

Nous observons que les temps de génération (TG) sont presque identiques pour les trois lignées U87, CCF-STTG1 et SW-1783 (1,15 à 1,3j) excepté la lignée U373 qui présente un TGplus rapide (0,85j). Ces données confortent nos temps de repiquages effectués tous les 3-4 jours.

# Culture des astrocytes normaux humains

Les astrocytes normaux humains ou *normal human astrocytes* (NHA) sont issus de cultures primaires commercialisées par la société Lonza. Ces cellules sont cultivées dans un milieu EMEM identique au milieu utilisé pour les lignées d'astrocytomes U87 et U373. Le passage des cellules est effectué lorsqu'elles atteignent 90% de confluence. Le ratio de démultiplication est de 1 : 3. Le milieu est remplacé tous les trois à quatre jours.

Les astrocytes normaux humains sont utilisés strictement entre le premier et le quatrième passage selon les recommandations du fournisseur.

# Isolement des mastocytes péritonéaux de rat

Les mastocytes péritonéaux sont isolés à partir de rats mâles de la souche Wistar (300 à 500 g) de l'élevage Janvier, *France*. Les rats sont sacrifiés par décapitation. Toutes les étapes d'isolation et de purification des mastocytes sont réalisées à température ambiante. Les mastocytes sont récoltés par lavage péritonéal avec 12 mL d'une solution saline physiologique (tampon HEPES : *acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazine éthane sulfonique)* contenant 137 mMNaCl, 2,7 mMKCl, 0,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,6 mM glucose, 0,1% BSA, 10 mM HEPES ajustée à pH = 7,4. La cavité péritonéale est massée doucement pendant 2 à 3 min. Le liquide de lavage est récupéré après ouverture de la cavité péritonéale et centrifugé à 180 x *g* pendant 3 min. Le culot cellulaire est remis en suspension dans le tampon HEPES et déposé sur un gradient de BSA (30% et 40% m/v dans le PBS) et

centrifugé à 250 x g pendant 10 min. Les mastocytes collectés dans le culot sont remis en suspension dans le tampon HEPES. La viabilité et la pureté des mastocytes sont évaluées respectivement par marquage au bleu de Trypan (0,2% m/v dans le PBS) et au bleu de toluidine (0,05% m/v dans le PBS) ; elles sont toutes deux supérieures à 97%.

# Isolement des macrophages péritonéaux de rat

Les macrophages péritonéaux de rat sont isolés à partir des rats mâles de la souche Wistar (220 à 240 g) de l'élevage Depré, France. Les macrophages sont récoltés trois jours après une injection péritonéale de 15 mL d'une solution de thioglycolate à 3% (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les rats sont sacrifiés par décapitation. Toutes les étapes d'isolation et de purification des macrophages sont réalisées à température ambiante. Les macrophages sont récoltés par lavage péritonéal avec 40mL de tampon phosphate salin froid (PBS, invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les macrophages prélevés sont alors cultivés dans un milieu de culture modifié 199 HEPES contenant des sels d'Earles (Invitrogen), L-Glutamine, 11mM glucose et 25mM HEPES (Sigma, St Louis, Mo, United States) et supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (56°C pendant 30 min) (FCS, Eurobio, Les Ilis, France), 100 UI/mL de pénicilline, 10 µg/mL de streptomycine (Gibco, Plailey, Scotland) et 250 µg/mL d'amphotéricine B (Eurobio, Les Ulis, France). Les macrophages sont cultivés pendant 4 heures dans un incubateur à 37°C sous atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> saturée en vapeur d'eau. Après incubation les cellules non adhérentes sont éliminées avec un lavage au PBS. Après le lavage le pourcentage des macrophages adhérents est de 98%, ceci est apprécié par une analyse morphologique après coloration au wright-giemsa.

# Réalisation des Cocultures

# Cocultures mastocytes-astrocytomes et mastocytes-astrocytes

Les lignées cellulaires U87, U373 ou NHA sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 1 x  $10^5$  cellules par puits dans le milieu EMEM contenant 1% de SVF. Les lignées 1321N1 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 1 x  $10^5$  cellules par puits dans le milieu DMEM contenant 1% de SVF. Les lignées CCF-STTG1 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 1 x  $10^5$  cellules par puits dans le milieu RPMI contenant 1% de SVF. Les lignées SW-1783 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 1 x  $10^5$  cellules par puits dans le milieu RPMI contenant 1% de SVF. Les lignées fans des plaques de 24 puits à raison de 1 x  $10^5$  cellules par puits dans le milieu RPMI contenant 1% de SVF. Les lignées SW-1783 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 1 x  $10^5$  cellules par puits dans le milieu RPMI contenant 1% de SVF. Les lignées SW-1783 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 1 x  $10^5$  cellules par puits dans le milieu L-15 contenant 1% de SVF.

Après 24 h d'incubation, le milieu est aspiré et remplacé par du milieu de culture correspondant à la lignée concernée (EMEM, DMEM, RPMI ou L-15) dépourvu de sérum. Les mastocytes, isolés en conditions stériles, sont déposés dans les puits à raison de 2,5 x  $10^4$  ou 5 x  $10^4$  mastocytes par puits, soit un ratio mastocyte/astrocyte ou astrocytome de 1 : 4 ou 1 : 2. Cette configuration de culture autorise les contacts entre les deux types cellulaires.

Une seconde configuration n'autorisant pas les contacts entre les deux types cellulaires est également étudiée (Fig. 18). Dans ce cas, les mastocytes sont déposés dans des inserts de puits de culture Transwell<sup>®</sup> (*Corning Incorporated Life Sciences*, Lowell, MA, USA) dont la membrane en polycarbonate présente un diamètre de pores de 0,4 µm. Dans ces conditions les médiateurs sécrétés par les deux types cellulaires circulent librement dans les puits mais la taille des pores exclut toute migration et tout contact cellulaire.

La migration des astrocytomes U87 et U373 est étudiée en présence de mastocytes par un système de Transwell<sup>®</sup> dont les pores de la membrane en polycarbonate sont d'un diamètre de 8 µm. Cette taille de pores autorise le passage d'une cellule. Dans ces conditions, les mastocytes sont déposés au fond des puits et les astrocytomes sont déposés dans les inserts de culture (Fig. 18). Le potentiel chimiotactique des mastocytes est ainsi évalué par quantification des astrocytomes ayant migré au fond du puits de culture.



Figure 18 : Modèles de coculture permettant l'étude de la prolifération et la migration des astrocytomes Le modèle de gauche autorise le contact direct entre les deux types cellulaires.
Le modèle du milieu (insert avec membrane de diamètre de pore 0,4µm) n'autorise pas le contact direct entre les deux types cellulaires.
Le modèle de droite (insert avec membrane de diamètre de pore 8µm) permet d'étudier la migration des astrocytomes humains.

#### Cocultures macrophages-astrocytomes et mastocytes-astrocytes

Des cocultures sont réalisées avec les macrophages et les lignées U87 et CCF-STTG1 dans des conditions expérimentales identiques à celles énoncées ci-dessus.

# Etudes de la prolifération cellulaire

# Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée

Ce test de prolifération cellulaire est basé sur l'incorporation de la base azotée thymidine au sein de l'ADN lors de la division cellulaire. L'incorporation du nucléotide radiomarqué permet de quantifier la prolifération cellulaire, proportionnelle à la radioactivité contenue dans l'échantillon.

Les cellules U87 et U373 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 1 x  $10^5$  cellules/puits dans le milieu EMEM contenant 1% de SVF. Après 24 h d'incubation, le milieu est remplacé par de l'EMEM dépourvu de sérum et les cellules sont traitées pendant 24 ou 48 h dans un volume final de 500 µL. La thymidine tritiée (0,5 µCi/puits, *New England Nuclear, Boston, MA*) est incubée pendant les six dernières heures des différents temps de traitement.

Le milieu est aspiré et les puits sont rincés deux fois avec du PBS froid. 500  $\mu$ L d'acide trichloroacétique froid (TCA, 10% m/v dans l'eau) sont déposés dans les puits pendant 10 min sur la glace. Un second ajout de TCA est réalisé pendant 10 min à température ambiante. Les puits sont vidés et les cellules sont lysées pendant une nuit dans 250  $\mu$ L de NaOH à 1 N. 250  $\mu$ L de HCl à 3 N sont additionnés à la soude pour neutraliser la solution. Une prise d'échantillon de 300  $\mu$ L est alors déposée dans des fioles de comptage auxquelles sont ajoutés 3 mL de liquide scintillant et la radioactivité est dosée sur un compteur à rayonnements  $\beta$ .



Figure 19 : Etapes du test d'incorporation de thymidine tritiée

# Mesure de l'incorporation de bromo-désoxyuridine (BrdU)

Le test *CellProliferation ELISA BrdU* (*Roche Applied Science*, Indianapolis, IN, USA) est basé sur un principe identique à l'incorporation de thymine tritiée. Il présente l'avantage d'être colorimétrique et non radioactif. Le protocole correspond à un marquage immunocytochimique. Après fixation et perméabilisation des cellules, un anticorps dirigé contre la BrdU est ajouté dans les puits. Cet anticorps, couplé à une peroxydase, permet la transformation du substrat triméthyl-benzine en composé coloré (bleu) (Fig. 20).

Les cellules U87, U373 et NHA sont ensemencées dans des plaques de 96 puits dans le milieu EMEM à 1% de SVF à raison de 5 x  $10^3$  cellules/puits. Les lignées 1321N1 sont ensemencées dans des plaques de 96 puits dans le milieu DMEM contenant 1% de SVF à raison de 5 x  $10^3$  cellules/puits.Les lignées CCF-STTG1 sont ensemencées dans des plaques de 96 puits dans le milieu RPMI contenant 1% de SVF à raison de 5 x  $10^3$  cellules/puits. Les lignées SW-1783 sont ensemencées dans des plaques de 96 puits dans le milieu L-15 contenant 1% de SVF à raison de 5 x  $10^3$  cellules/puits. Après 24 h d'incubation, le milieu est aspiré, remplacé par du milieu approprié (EMEM, DMEM, RPMI ou L15) dépourvu de sérum et les cellules sont traitées pendant 24 ou 48 h dans un volume final de 100  $\mu$ L. La BrdU (10  $\mu$ M) est ajoutée dans les puits et incubée les 18 dernières heures des différents temps d'incubation. Le milieu de culture est aspiré et la solution de fixation et de perméabilisation (100  $\mu$ L) est ajoutée dans les puits pendant 30 min à température ambiante. Les puits sont vidés et l'anticorps anti-BrdU est incubé 90 min à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés trois fois avec la solution de rinçage et le substrat est ajouté et incubé à température ambiante pendant 30 min à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1 N directement dans le puit. La densité optique est mesurée à  $\lambda = 492$  nm.



Figure 20 : Etapes du test d'incorporation de BrdU

# Évaluation de la viabilité avec le test colorimétrique MTS

Le test de viabilité *CellTiter 96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay, MTS* (Promega, Madison, WI, USA) est une méthode colorimétrique permettant d'évaluer la prolifération cellulaire ou la cytotoxicité. Cette méthode se base sur la réduction d'un sel de tétrazolium [3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium] en un produit soluble dans le milieu de culture et coloré, le formazan (Fig. 21). La conversion

est effectuée grâce au NADH ou grâce au NADPH produits par les déshydrogénases de la cellule en présence d'un agent réducteur, le méthosulfate de phénazine. La réduction du MTS s'effectue donc uniquement dans les cellules dont le métabolisme énergétique est intègre. Ce test n'est donc pas à proprement parler un test de prolifération ou de viabilité, mais un test reflétant l'activité métabolique de la cellule. Bien qu'étant corrélé la plupart du temps à la prolifération cellulaire, l'activité métabolique n'en est pas forcément le reflet. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de ce test dans le présent travail a été systématiquement validée parallèlement au moins une fois par l'incorporation de thymidine tritiée ou par la BrdU.

Les cellules (5 x  $10^3$ /puits en plaque de 96 puits ou 1 x  $10^5$ /puits en plaque de 24 puits) sont ensemencées dans le milieu approprié *(cf incorporation de BrdU)* supplémenté de 1% de SVF. Après 24 h d'incubation à 37°C, les puits sont vidés et les cellules sont traitées dans le milieu approprié (EMEM, DMEM, RPMI ou L15) dépourvu de sérum. Après 24 ou 48 h d'incubation, le MTS est ajouté dans les puits à raison d'une partie pour cinq parties de milieu de culture. La densité optique est ensuite évaluée après 2 h d'incubation à 37°C ( $\lambda$  = 492 nm).



Figure 21 : Principe du test colorimétrique MTS

# Évaluation de la viabilité cellulaire par coloration au bleu Trypan

Nous procédons à une numération cellulaire des cellules vivantes par utilisation de bleu trypan. La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des cellules mortes (Fig. 22). Elle utilise le bleu de trypan qui a tendance à entrer dans les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule en question entraîne un mécanisme

d'exclusion qui va éjecter cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera translucide au microscope, au contraire une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et deviendra bleue. Une autre explication réside dans le fait que chez une cellule vivante, la membrane intacte empêche l'entrée de la coloration dans le cytoplasme, alors qu'au contraire chez une cellule morte, la membrane lésée laisse passer le colorant ce qui aboutit à la coloration de la cellule en bleu.Cependant, cette molécule est toxique, elle finit par tuer les cellules qui deviennent alors toutes bleues. C'est la raison pour laquelle il convient d'effectuer les comptages rapidement.

Pour le comptage on prélève 250 µL de suspension cellulaire à laquelle on ajoute 250 µL de solution de bleu trypan à 0,4% (rapport 1 :1) (Lonza, *Walkersville, MD USA*). On incube 2-3 minutes à température ambiante et on procède à un comptage grâce à un hématimètre (ou hémocytomètre) type Neubauer. Le pourcentage de cellules viables est estimé selon la formule :



% de viabilité = <u>(Nombre total de cellules - Nombre de cellules colorées)</u> x 100 Nombre total de cellules

Figure 22: Principe du test de viabilité cellulaire par coloration au bleu de trypan.

# Caractérisation de l'Apoptose

On distingue deux catégories de mort cellulaire : la mort cellulaire programmée (ou apoptose) caractérisée par une participation active de la cellule, et la mort cellulaire par nécrose ou mort cellulaire passive.

L'apoptose se caractérise sur le plan de la morphologie cellulaire par une diminution de la taille de la cellule ainsi que par un arrondissement. La chromatine se condense et l'ADN se fragmente. La perte de l'asymétrie de la membrane plasmique est également une caractéristique fondamentale de l'apoptose. Elle se traduit par l'externalisation des phosphatidylsérines, normalement localisée sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Ce signal favorise la phagocytose de la cellule apoptotique (Gozuacik et Kimchi, 2004 ; Bredesen, 2007).

L'apoptose a été évaluée à l'aide d'une sonde fluorescente ratiométrique (sonde F2N12S) synthétisée dans notre laboratoire par le Dr Andrey S. Klychenko (Shynkar et al., 2007). Cette méthode est une alternative intéressante au test de détection classique de l'apoptose *via* l'annexine V/ iodure de propidium. En effet, lors de l'apoptose, les phosphatidylsérines composant du feuillet membranaire interne sont exposées sur le feuillet externe de la membrane phospholipidique. L'annexine V se lie aux phosphatidylsérines et, couplée à un fluorophore, permet la quantification du nombre de cellules apoptotiques parmi une population cellulaire (Vermes et al., 1995). Cependant, cette liaison nécessite de forte concentration en calcium extracellulaire (plus de 2,5 mM). D'autre part, un problème se pose lorsque l'on travaille avec des cellules adhérentes. En effet, l'étape de traitement par la trypsine nécessaire pour décoller les cellules engendre très souvent de faux positifs (Van Engeland et al., 1998).

Nous avons donc opté pour la technique de la sonde ratiométrique F2N12S. Cette sonde dérive d'un noyau 3-hydroxyflavone. Les dérivés de cette nature présentent une propriété singulière : à l'état excité, ils peuvent être sujet à un transfert de proton intramoléculaire. À une longueur d'onde d'excitation donnée, la molécule va donc émettre des photons dont la longueur d'onde diffère, l'une correspond à l'état excité de la sonde et l'une correspond à l'état excité ayant subi le transfert de proton intramoléculaire. Lorsque le nombre de cellules apoptotiques augmente, l'intensité de fluorescence correspondant à la sonde excitée

normale augmente alors que l'intensité de fluorescence de la forme tautomère reste inchangée (Fig. 23).

Les cellules (5 x 10<sup>5</sup>) sont ensemencées dans des plaques de 6 puits (TPP, *Suisse*) dans le milieu EMEM supplémenté de 1% de SVF. Après 24 h d'incubation, les cellules sont traitées dans le milieu dépourvu de sérum et incubées 24 ou 48 h à 37°C. Le milieu de culture est ensuite éliminé et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS avant l'addition de trypsine (3 min, 37°C). L'action enzymatique de la trypsine est ensuite neutralisée par le milieu EMEM supplémenté de 10% de SVF. Les cellules sont récoltées, centrifugées 5 min à 180 x *g* puis le culot est repris dans l'HBSS dépourvu de rouge phénol de manière à obtenir une suspension cellulaire de 1 x 10<sup>6</sup> cellules/mL. La suspension cellulaire est alors déposée dans une cuvette et la sonde est additionnée à la suspension de manière à obtenir une concentration finale de 0,1  $\mu$ M avec 0,1% de DMSO (*diméthylsulfoxide, Sigma, Saint Louis, USA*) maximum. La sonde est incubée 7 min à température ambiante et les spectres de fluorescences sont enregistrés à température ambiante sur un spectrofluorimètre FluoroMax-3 (Jobin Yvon Horiba). La longueur d'onde d'excitation est de  $\lambda$  = 400 nm et le spectre de fluorescence émise est mesuré entre 415 nm et 700 nm. Les spectres ont été corrigés par la fluorescence du solvant seul (HBSS) et corrigés pour les variations d'intensité de la lampe.



Figure 23 : Principe de fonctionnement de la sonde F2N12S (modifié de Alexander et al.,2009) Les spectres d'émission de fluorescence caractéristiques d'une cellule normaleet d'une cellule apoptotique sont représentés respectivement en noire et en rouge. En microscopie à fluorescence les cellules normales apparaissent en bleu-vert et les cellules apoptotiques en jaune-rouge.

# Quantification de messagers intracellulaires :

### Mesure du calcium intracellulaire

Le calcium intracellulaire est mesuré à l'aide de la sonde Fura-2/AM sur un spectrofluorimètre Hitachi F-2000.

Les cellules sont mises en suspension dans le tampon HEPES à une densité de 1 x 10<sup>6</sup> cellules/mL. Elles sont incubées avec 1  $\mu$ M de Fura-2/AM (Calbiochem, San Diego, CA, USA) pendant 15 min (mastocytes) ou 45 min (astrocytomes) à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du tampon HEPES et remises en suspension dans ce même tampon à la densité de 1 x 10<sup>6</sup> cellules/mL. La suspension cellulaire est déposée dans une cuvette de quartz de 1 cm. Les cellules sont agitées de manière constante dans la cuvette à l'aide d'un barreau magnétique. Les cellules sont stimulées et excitées pendant 1 s de manière séquentielle à 340 nm et à 380 nm. Ces longueurs d'onde correspondent aux  $\lambda_{ex}$  de la sonde liée au calcium (340 nm) et de la sonde libre (380 nm). L'émission de fluorescence est enregistrée à température ambiante à  $\lambda = 510$  nm. Les concentrations de Ca<sup>2+</sup> sont calculées selon la méthode décrite par Lynch et al. (1994).



*Figure 24 : Principe du dosage du calcium intracellulaire par la sonde Fura-2/AM.* La sonde FURA-2 sous forme acétoxyméthylester pénètre dans la cellule et est activée par les estérases cellulaires.

#### Dosage de l'AMPc

L'activité adenylate-cyclase est évaluée par dosage radioimmunologique de l'AMPc, produit de la dégration enzymatique de l'ATP.

Les cellules sont ensemencées en plaques de 24 puits à raison de 1 x  $10^5$  cellules/puits dans le milieu EMEM supplémenté de 1% de SVF. Après 24 h d'incubation à 37°C, les cellules sont rincées pendant 10 min à 37°C par un volume de 500 µL de tampon de lavage (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 6,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajusté à pH = 7,2). Les cellules sont ensuite incubées 10 min à 37°C dans un volume de 500 µL de tampon d'incubation (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% BSA, 10 mM HEPES, ajusté à pH = 7,4). Enfin, les cellules sont stimulées pendant 20 min après une pré-incubation de 10 min dans le tampon d'incubation supplémenté de 0,5 mM d'IBMX (isobutylmethylxanthine), inhibiteur non-sélectif des phosphodiestérases. Il convient en effet d'inhiber ces enzymes qui hydrolysent rapidement l'AMPc en AMP 5'.

La réaction est arrêtée par l'addition de 500  $\mu$ L d'HCl à 0,2 N à 4°C. Les étapes suivantes sont toutes réalisées sur la glace à 4°C. Les cellules sont ensuite soniquées directement dans la plaque. La suspension cellulaire est transférée dans des tubes de 1,5 mL. Les puits sont lavés avec 500  $\mu$ L d'HCl à 0,1 N et ce volume est ajouté à la suspension cellulaire. Les tubes sont centrifugés à 14 000 x *g* pendant 15 min à 4°C. 30  $\mu$ L de KOH à 3,93 N sont ajoutés à 150  $\mu$ L de surnageant. 150  $\mu$ L de cette solution sont ensuite ajoutés sur un culot d'anhydride succinique (100  $\mu$ L à 61,5 mg/mL m/v dans le dioxane). Après la succinylation des échantillons et de l'<sup>125</sup>I-AMPc, les échantillons sont dilués en cascade au demi dans un tampon citrate (0,1 M, pH = 6,3). L'anticorps et l'<sup>125</sup>I-AMPc sont alors ajoutés aux échantillons et ces derniers sont incubés 24 h à 4°C. 1 mL d'une solution de charbon végétal à 2 mg/mL dans un tampon phosphate (pH = 6,3) est ajouté dans les tubes contenant les échantillons et incubé 15 min. Les tubes sont vortexés toutes les 5 min puis centrifugés pendant 10 min à 1 000 x *g* à 4°C. Le surnageant est alors aspiré et la radioactivité mesurée sur un compteur à rayonnements  $\gamma$ .

# Etude des médiateurs sécrétés :

# Caractérisation des cytokines sécrétées par les astrocytomes

La détection des cytokines sécrétées en coculture a été réalisée à l'aide du système *RayBio<sup>®</sup>Human Cytokine AntibodyArray 3* (Raybiotech, Norcross, GA, USA). Ce système, dont le principe est similaire aux tests ELISA, permet la détection simultanée de plusieurs dizaines de cytokines.

Les cocultures astrocytomes/mastocytes (2 : 1) sont réalisées en plaque de 24 puits dans un volume final de 1 mL. Après 24 h d'incubation à 37°C, le milieu de culture est prélevé et centrifugé à 180 x *g* pendant 5 min. Les surnageants de deux puits de culture représentant des conditions identiques sont alors combinés afin d'accroître le volume d'échantillon. 1,6 mL de milieu de culture est ainsi déposé sur les membranes de nitrocellulose couvertes en spots avec les anticorps spécifiques des cytokines d'intérêt. Selon les recommandations du fabricant, il convient de bloquer préalablement les sites de liaison non spécifiques pendant 30 min à température ambiante sous agitation. Les membranes recouvertes de milieu de culture conditionné sont incubées pendant une nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite rincées et un cocktail d'anticorps biotinylés anti-cytokine est ajouté et incubé pendant 1 h à température ambiante. Après rinçage, la streptavidine couplée à l'HRP (*horse radish peroxydase*) est déposée sur les membranes et incubée pendant 2 h à température ambiante. Après rinçage final, la détection est réalisée d'après les recommandations du fabricant par exposition aux rayons X. Les films sont numérisés à l'aide du dispositif Genegenius (Syngene, Bangalore, Inde).

# Caractérisation des cytokines sécrétées par les mastocytes

La détection des cytokines sécrétées par les mastocytes a été réalisée à l'aide du système *RayBio<sup>®</sup> Rat Cytokine AntibodyArray 1* (Raybiotech).

Les mastocytes (5 x  $10^5/mL$ ) sont mis en suspension dans le milieu EMEM et stimulés pendant 6 h à 37°C. La suspension cellulaire est centrifugée 3 min à 180 x *g* et le surnageant est déposé sur les membranes couvertes d'anticorps anti-cytokines. Les étapes suivantes sont réalisées selon les instructions décrites par le fabricant.

# Caractérisation des métalloprotéases sécrétées par les astrocytomes

La détection des métalloprotéases sécrétées en coculture a été réalisée à l'aide du système *RayBio<sup>®</sup>Human Metalloproteinases AntibodyArray 1* (Raybiotech). Les cocultures astrocytomes/mastocytes (2 : 1) sont réalisées en plaque de 24 puits dans un volume final de 1 mL. Le protocole est en tout point identique aux protocoles de détection des cytokines en coculture.

# Dosage ELISA de l'IL-6 sécrétées par les astrocytomes

Les cocultures astrocytomes/mastocytes (2 : 1) sont réalisées en plaque de 24 puits dans un volume final de 1 mL. Le milieu de culture est prélevé après 24 h d'incubation à 37°C puis centrifugé à 180 x *g* pendant 5 min à température ambiante. 100  $\mu$ L d'échantillon sont déposés dans des plaques de 96 puits *RayBio<sup>®</sup>Human IL-6 ELISA Kit* (Raybiotech). Une gamme d'IL-6 humaine recombinante est réalisée et une prise d'essai de 100  $\mu$ L est déposée dans les puits (0 à 1000 pg/mL). La plaque est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C. Les puits sont ensuite rincés et les anticorps biotinylés anti-IL-6 sont incubés pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Après rinçage, une solution de streptavidine couplée à l'HRP est ajoutée dans chaque puits pendant 45 min sous agitation. Les puits sont ensuite rincés et le substrat de l'HRP, la triméthyl-benzine, est incubé pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière et sous agitation. La réaction est arrêtée par ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et la densité optique est mesurée immédiatement à  $\lambda = 450$  nm. Les résultats sont exprimés en pg/mL d'IL-6.

# Etude de l'expression des ARN messagers :

### **Extraction des ARN messagers**

Les cellules sont ensemencées en plaque de 6 puits. À 75% de confluence, les cellules sont traitées pendant 3 à 6 h. Le milieu est éliminé et la couche cellulaire est rincée avec du PBS. 1 mL de réactif TriReagent<sup>®</sup> (Sigma) est déposé dans les puit, aspiré et refoulé une dizaine de fois puis incubé 5 min à température ambiante dans le puit. Le réactif est alors transféré dans des tubes de 1,5 mL préalablement autoclavés. Après ajout de 250 µL de chloroforme,

les tubes sont agités vigoureusement et incubés 5 min à température ambiante. Pendant cette incubation, les tubes sont agités vigoureusement toutes les minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C. 80% de la phase aqueuse supérieure sont transférés dans un tube de 1,5 mL et l'ARN est précipité par l'addition de 500  $\mu$ L d'isopropanol. Les tubes sont agités et la solution est incubée 5 min à température ambiante. Les tubes sont centrifugés à 12 000 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots sont lavés dans 1 mL d'éthanol à 75% dans l'eau traitée au DEPC (diéthyl-pyrocarbonate). Les tubes sont vortexés puis centrifugés à 4°C pendant 5 min à 7 500 x g. Le surnageant est éliminé et les culots sont séchés à l'air. Ils sont repris dans 25  $\mu$ L d'eau DEPC. La concentration en ARN des solutions est déterminée par dosage spectrophotométriqueà $\lambda$  = 260 nm.

# Synthèse d'ADN complémentaire par la transcription inverse

Les ARN sont transcrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit *SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, Paisley, UK). 500 ng d'ARN sont pré-incubés pendant 5 min à 65°C en présence de 2,5  $\mu$ M d'oligonucléotides (dT)<sub>20</sub> et de 0,5 mM de désoxynucléotide-triphosphates (dNTP) dans un volume final de 10  $\mu$ L. Les tubes sont déposés sur la glace et le mélange réactionnel, composé de 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, de 10 mM de DTT, de 200 U de SuperScript<sup>TM</sup> III transcriptase inverse et de tampon de réaction (1x), est ajouté pour un volume final de 20  $\mu$ L. La synthèse d'ADNc est réalisée à 50°C pendant 50 min, puis l'enzyme est inactivée à 85°C pendant 5 min.

### Amplification de l'ADNc par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les ADNc (1 µL) sont amplifiés dans un milieu réactionnel de 20 µL contenant 200 µM de dNTP, 0,5 µM d'amorces (sens et anti-sens, voir tableau 10), de tampon de réaction (1x) et 0.02 U/µl d'ADN polymérase Phusion (Finnzymes, Espoo, Finland). Les ADNc ont également été amplifiés de manière alternative à l'aide du kit *GoTaq*<sup>®</sup>*Green Master Mix* (Promega) selon les instructions du fabricant. L'amplification comprend 30 à 40 cycles de 30 s de dénaturation à 98°C, de 30 s d'hybridation à température conditionnée par les amorces spécifiques et de 30 s d'élongation à 72°C (*GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems,* Carlsbad, CA, USA).



Figure 25: Représentation schématique de différentes étapes de l'amplification par PCR.

Les produits de PCR sont analysés sur un gel d'agarose à 2% m/v dans le TEA (40 mM Tris, 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA, pH = 8) contenant 1  $\mu$ g/mL de bromure d'éthidium (150 V, 35 min). Les gels sont numérisés à l'aide de l'appareil GeneGenius sous illumination UV.

	Amorces sens	Tm	Amorces antisens
CD47	5'CCTATATCCTCGCTGTGGTT3'	57°C	5'ACTTTTCTTGTTTCTTCTCC-3'
SIRPα	5'GGGTCAGCACCACCTTGGCT3'	62°C	5'GGCGGGTGAGGAGGAGCTGCAGGTGAT3'
CD40	5'CACAGCATGATCGAAACATACAAC 3'	57°C	5'TGCCTGCCTGTTGCACAACC 3'
UHRF1	5'GGG GCT ATG AGG ATGATGTG-3'	60°C	5'TCT TGC CAC CCT TGA CAT T-3'
IL-6	5'TCAATGAGGAGACTTGCCTG3'	60°C	5'GATGAGTTGTCATGTCCTGC3'
IL-7	5'CTGGGTGAAGCCCAACCA3'	60°C	5'TTCAGTGTTCTTTAGTGCCCATCA3'
MCP-1	5'ATGCAATCAATGCCCCAGTC3'	57°C	5'TGCAGATTCTTGGGTTGTGG3'
GAPDH	5'TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT3'		5'CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC3'

Tableau 10 : Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées dans nos expériences

# Amplification génique in vitro (PCR) en temps réel

Les ADNc (1  $\mu$ L) sont amplifiés dans un milieu réactionnel de 25  $\mu$ L contenant 12,5  $\mu$ L de iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>R</sup> Green supermix composé de SYBR Green I, iTaq DNA polymerase, 200  $\mu$ M de dNTP, 6mM MgCl<sub>2</sub> (*Bi-Rad*, Hercules, *USA*); 0,5  $\mu$ M d'amorces (sens et anti-sens, voir tableau 10). L'amplification comprend 40 à 50 cycles de 30 s de dénaturation à 95°C, de 30 s d'hybridation à température (T<sub>m</sub>) conditionnée par les amorces spécifiques (elle est en rapport avec les bases AT et GC) et enfin 1 min d'élongation à 55°C (MyiQ<sup>TM</sup> Signal Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA). La PCR en temps réel est une application de la PCR. Elle permet de suivre en continu (en temps réel) le processus d'amplification par PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo-formés. L'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR green-I) et les sondes fluorescentes (Poitras and Houde, 2002). Durant la dénaturation, le SYBR Green-I libre exhibe peu de fluorescence, à la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence détectée à 530 nm lors de l'excitation à 483 nm. Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel. (Figure 25).



Figure 26 : Principe de la détection des produits de PCR par émission de fluorescence par un agent intercalent (SYBR green-I.) (D'après Poitras and Houde, 2002)

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme « seuil du cycle » ou « threshold cycle » **(Ct)**, il apparaît en début de phase exponentielle.

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases

distinctes (Figure27): 1- *Phase de bruit de fond :* La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond ; 2-*Phase exponentielle* : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle ; 3-Phase de saturation (plateau) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitant.

Pour déterminer le taux d'expression d'un gène cible il faut :

- La normalisation par rapport au contrôle endogène (GAPDH par exemple) : Ct gène cible – Ct contrôle endogène =  $\Delta$ Ct
- La normalisation par rapport au controle :

$$\Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{control}} = \Delta \Delta Ct$$

• La détermination de la variation du nombre de copie du gène cible :  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 





Prenons, pour illustration, l'exemple de la comparaison du taux d'expression des ARNm de UHRF1 après traitement des cellules par l'agoniste 4N1 du récepteur CD47. Après extraction des ARNm (voir paragraphe : extraction des ARNm), et la synthèse de l'ADNc (voir paragraphe : transcription inverse), la transcription des gènes cibles (UHRF1) se fait par PCR en temps réel en utilisant les amorces sens et anti sens des ARNm de UHRF1 (tableau 11). L'amplification de l'ADNc est suivie en temps réel par quantification de la fluorescence émise par SYBR green-I (*Bio-Rad, USA*). A la fin de la réaction, les différentes valeurs de **Ct** sont déterminées (*Cf tableau ci-dessous*). Nous pouvons observer que le taux d'expression des

ARNm de UHRF1 après traitement avec 100µM de 4N1 est augmenté de 5 fois par rapport au control.

	Threshold Cycle (Ct)		(B) - (A)		
	<b>(A)</b> GAPDH	<b>(B)</b> UHRF1	ΔCt	ΔΔCt	Ratio = $2 - \Delta \Delta Ct$
Contrôle	29,09	14,33	- 14,76	0	1
50 (μM)	28,71	13,99	- 14,76	- 0,04	1,34
100 (µM)	29,78	12,60	- 17,18	- 2,42	5,30

#### Tableau 11 : Exemple de résultats expérimentaux.

# Etude de l'expression des protéines :

#### Marquage immunocytochimique

Les astrocytomes U87 et CCF-STTG1 sont ensemencées ( $1 \times 10^{5}$ ) dans des « lab-tech » (plaques contenant quatre puits, *Nunc, NY, USA*) à raison de 2.10<sup>4</sup> cellules/puits dans un milieu EMEM (U87) ou RPMI (CCF-STTG1) supplémenté de 1% de SVF. Après 24 h d'incubation à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> le milieu de culture est aspiré et les cellules sont fixées par 4% de paraformaldéhyde/PBS pendant 10 à 30 min à 4°C. Après trois rinçages de 5 min au PBS, les sites de liaison non spécifique sont bloqués par une solution de BSA à 2% m/v dans le PBS pendant 1 h à température ambiante sous agitation. L'anticorps primaire est incubé généralement à la concentration de 10 µg/mL pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Après trois rinçages de 5 min au PBS, l'anticorps secondaire est incubé généralement à une concentration de 1 µg/mL pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Les lamelles sont montées sur des lames porte-objets après rinçage au PBS, scellées avec du vernis et observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Nikon Diaphot) ou un microscope confocal (Biorad 1024, laser Kr/Ar, excitation 488 nm, émission 522 et 585 nm; Nikon Eclipse TE300). L'analyse des images issues des coupes (z-stacks) ainsi que la co-localisation des protéines a été réalisée à l'aide du logiciel Image J (NIH).

#### **Western Blot**

#### **Extraction des protéines**

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 6 puits. À 75% de confluence, les cellules sont traitées puis lavées deux fois avec du PBS froid sur la glace. Elles sont ensuite grattées dans un volume de 200 µL de tampon de lyse (*M-PER<sup>®</sup>MammalianProtein Extraction* 

*Reagent, Pierce Biotechnology*, Rockford, IL, USA) contenant des inhibiteurs de protéases (*Halt<sup>TM</sup>ProteaseInhibitor Cocktail Kit, Pierce Biotechnology*) et de phosphatases (*Halt<sup>TM</sup> Phosphatase Inhibitor Cocktail, Pierce Biotechnology*). Les cellules sont incubées 5 min à température ambiante dans ce tampon sous agitation. Les surnageants contenant les protéines d'intérêt sont récupérés après centrifugation à 14 000 x *g* pendant 10 min à 4°C. Les protéines sont dosées à l'aide du kit BCA (*Pierce Biotechnology*). Ce dernier est basé sur la méthode de biuret : en milieu alcalin, les protéines réagissent avec les ions Cu<sup>2+</sup> et produisent des ions Cu<sup>+</sup>. L'interaction des ions Cu<sup>+</sup> avec l'acide bicinchoninique est détectée par spectrophotométrie. La solution de travail est constituée de 50 volumes de réactif A (solution de carbonate de sodium, bicarbonate de sodium ; acide bicinchoninique et tartrate de sodium 0,2 N dans NaOH) pour 1 volume de réactif B (sulfate de cuivre à 4%). 25 µL d'échantillons (dilués au 1/5), de standards (gamme de BSA de 0 à 2 mg/mL) sont déposés dans une plaque de 96 puits. 200 µL de la solution de travail sont ajoutés et la plaque est incubée 30 min à 37°C. La densité optique est mesurée à  $\lambda = 562$  nm.

# Electrophorèse SDS-PAGE

Le système utilisé pour le western blot comprend deux modes successifs de migration électrophorétique : une isotachophorèse sur un gel de concentration (*stacking gel à 4% d'acrylamide dans un tampon* C (0,5 M Tris-HCl, pH=6,8) puis une électrophorèse de zone monophasique sur un gel de séparation (*resolving gel à 10% d'acrylamide dans un tampon B* (1,5 M Tris-HCl, pH=8,8).

La séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire est réalisée par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence d'un détergent anionique, le dodécylsulfate de sodium (SDS à 20%) de 10 % de persulfate d'ammonium et de TEMED (tétra-méthyléthylènediamine, 1µL/mL). Ce détergent dénature les protéines et masque les charges des acides aminés la composant. Ainsi, lors de la migration sous un courant continu, le seul critère de séparation est leur poids moléculaire.

Les échantillons protéiques sont ajustés à la même concentration et dilués au demi dans le tampon de charge (*Laemmli sample buffer*, Biorad, Hercules, CA, USA) supplémenté de 50 mM de DTT. Ils sont dénaturés 5 min à 100°C et déposés sur gel de polyacrylamide précoulé*Criterion Tris-HCl 10% resolving gel* (Biorad) dans le système de cuve Criterion<sup>™</sup> avec les marqueurs de poids moléculaires *Precision Plus Protein Standards, All Blue* (Biorad). La cuve est remplie de tampon de migration (0,1% SDS m/v, 25 mM Tris, 200 mM glycine, pH = 8,3) et mise sous une tension de 160 V pendant 15 min puis 180 V pendant 45 min.

# Electro-transfert des protéines

Après la migration, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham<sup>TM</sup>Hybond<sup>TM</sup>-ECL, *GE Healthcare*, Waukesha, WI, USA) à l'aide du système Criterion<sup>TM</sup> dans un tampon de transfert (15% méthanol, 25 mM Tris, 200 mM glycine, pH = 8,3). La cuve est mise sous une tension de 100 V pendant 40 min à 4°C ; le tampon de transfert est brassé par agitation.

### Immunodétection des protéines

La membrane de nitrocellulose est incubée 1 h à température ambiante sous agitation dans le lait (5% *Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk*, Biorad) pour saturer les sites de liaison non spécifique des anticorps. La poudre de lait est reconstituée dans le TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, Tween-20 0,05% v/v, pH = 7,6). La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire dilué dans 5% lait/TBS-T pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Après trois lavages de 5 min dans le TBS-T, la membrane est incubée 1 h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire couplé à la HRP. Après trois lavages de 5 min avec le TBS-T, les protéines sont révélées par chimioluminescence à l'aide du kit *Immun-Star<sup>TM</sup> HRP* (Biorad) sur des films *Kodak BioMax Light-1* (Sigma). Les films (Kodak) sont numérisés à l'aide du système GeneGenius (Syngene).

# **Immunoprécipitation**

Cette technique permet la séparation analytique des antigènes cibles à partir du lysat brut de cellules en combinant l'immunoprécipitation avec le système SDS-PAGE/immunomarquage. Elle permet donc de détecter les antigènes et de déterminer le poids moléculaire relatif par comparaison avec les marqueurs de taille.

Les cellules cultivées dans des flacons de culture d'une surface de 80 cm<sup>2</sup> sont lavées deux fois avec du PBS (Phosphate Buffer Saline : [pH : 7.3] 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et stimulées par l'agoniste 4N1 ( $1.10^{-4}$ M) pendant 10 min à 37°C. Les cellules sont ensuite traitées par 600 µl d'un tampon d'immunoprécipitation (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris, pH = 8,0) supplémenté d'inhibiteurs de phosphatases (10 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> et 5 mM de pyrophosphate de sodium) et de

protéases [Roche]. Les cellules sont ensuite placées sur la glace pendant 30 min ; après incubation, le lysat cellulaire est transféré dans des tubes Eppendorfsde 1,5 mL et centrifugé à 4 °C pendant 10 min à 14 000 x g. Le surnageant est prélevé et transféré dans des tubes Eppendorfsde 1,5mL. Les concentrations de protéines des échantillons sont déterminées par le kit de BSA (*Bio-Rad*).

Les extraits protéiques sont ajustés à une concentration de 500 µg pour un volume de 400 µL. Ces extraits sont incubés avec l'anticorps anti-CD47 (2D3 ou B6H12) à 1,5 µg/mL pendant 3 h à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C sur agitateur rotatif. Les complexes immuns sont ensuite précipités par des billes de type protéine G-sépharose (*GE Healthcare*) durant une nuit sous rotation à 4°C. Les billes sont alors lavées quatre fois par centrifugation pendant 1 min à 4°C à 3000 x g dans un tampon RIPA froid (1 % Triton X-100, 0,5 % désoxycholate de sodium, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,1% SDS, pH = 7,5). En parallèle, les échantillons pour Western Blot sont préparés avec 20 µg d'extraits protéiques auxquels on ajoute le tampon de Laemmli (BioRad) et le DTT (50 mM). Les échantillons sont dénaturés dans un bain-marie à 100 °C pendant 5 min. Des contrôles négatifs sont réalisés en utilisant des anticorps de souris (*Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, CA, USA) pour les immunoprécipitations. Les étapes suivantes consistent en l'électrophorèse suivie de l'électro-transfert puis de la révélation immunologique des protéines, étapes décrites précédemment.



Figure 28: Principe des expériences d'immuno-précipitations.

# Résultats

# Publication 1

# Influence des mastocytes sur la prolifération des astrocytomes

# Publication n°1 (en révision):

Mast cells induce proliferation of human astrocytoma cells but not normal astrocytes via IL-6- dependent pathway

### **Objectifs de l'étude:**

Cette étude est basée sur les divers travaux publiés qui démontrent un lien entre l'inflammation et les cancers. Nous nous intéressons tout particulièrement aux mastocytes, qui sont des cellules clé de l'inflammation. Les mastocytes sont infiltrés dans divers types de cancers de manière précoce, avant l'infiltration des lymphocytes ou des macrophages. Selon la majorité des études épidémiologiques, la présence des mastocytes au sein des tumeurs serait favorable au développement des cancers mais ceci est encore sujet à controverses.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet des mastocytes sur la prolifération et la migration des astrocytomes humains. Nous observerons également l'effet des mastocytes sur les astrocytes normaux humains. Nous approcherons les mécanismes mis en jeu lors de l'interaction mastocytes-astrocytomes.

### **Discussion et Perspectives:**

Ces travaux montrent que les mastocytes stimulent la prolifération des cellules de la lignée U87 et CCF-STTG1 (grade IV). Cette prolifération induite par les mastocytes est dépendante du contact entre les mastocytes et la cellule tumorale. La prolifération des astrocytes normaux et des astrocytomes de la lignée U373 et SW-1783 (Grade III) n'est pas modifiée en présence de mastocytes. Ces résultats suggèrent que les cellules U87 et CCF-STTG1 expriment une/des protéine(s) membranaire(s) qui serait (ent) impliquée(s) dans l'interaction avec les mastocytes. Cette/ces protéine(s) ne serait (ent) pas (ou peu) exprimée(s) par les astrocytes normaux et les cellules U373 et SW-1783. La signalisation intracellulaire de cette protéine pourrait également être finement régulée dans les cellules normales et dérégulée dans les cellules tumorales. Cette explication pourrait satisfaire les différences observées entre les cellules U87, CCF-STTG1 et les astrocytes. Elle ne satisfait cependant pas totalement la question du défaut de réactivité

**Résultats** 71

grade tumoral pourrait également être un facteur à considérer dans cet effet car les cellules U87 et CCF-STTG1 appartiennent au grade IV (WHO) alors que les cellules U373 et SW-1783 appartiennent au grade III. Une réponse à cette question ne pourra être obtenue sans l'élargissement du panel des lignées d'astrocytomes étudiées en coculture.

Les résultats de *cytokine antibody array* indiquent que les mastocytes induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules U87 et CCF-STGG1 : IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , GM-CSF : *Granulocyte Marophage Colony Stimulating Factor*, MCP-1 : *Monocyte Chemotactic Protein-1* et anti-inflammatoires : IL-7, IL-10, IL-15. De manière intéressante, les cellules U373 et SW-1783 ne sécrètent pas de cytokines en présence de mastocytes. La principale cytokine sécrétée par les cellules U87 et CCF-STGG-1 est l'IL-6. Cette cytokine pro-inflammatoire est mitogène pour les astrocytomes. Un antagoniste de l'IL-6 inhibe la prolifération des astrocytomes induite par les mastocytes. Ces résultats confirment que les mastocyte au sein d'un cercle vicieux d'entretien de la réaction inflammatoire néfaste pour le patient. Le ou les mécanisme(s) d'action induisant la sécrétion des cytokines dans les astrocytomes en présence de mastocytes de grade III et IV en coculture reste à élucider. La différence de comportement des cellules de grade III et IV en coculture reste à éclaircir. II conviendra ensuite de caractériser cette voie de signalisation dans les cellules normales afin de mesurer l'ampleur et la pertinence des conséquences physiopathologiques d'une dysfonction.

Nos résultats montrent également que les mastocytes ont la capacité d'induire la migration des astrocytomes de grade III (U373) et de grade IV (U87, CCF-STGG-1). La sécrétion basale de médiateurs mastocytaires serait suffisante pour induire ce phénomène de chimiotactisme. L'identification des médiateurs impliqués ainsi que leurs mécanismes d'action fera l'objet de plus amples investigations futures.

1	Mast cells induce proliferation of human astrocytoma cells but not normal astrocytes via an
2	IL-6-dependent pathway
3	
4 5 6 7	Emilie Sick <sup>*</sup> , Abdelaziz Boukhari, Philippe André, Gilliane Coupin, Kenneth Takeda, Jean-Pierre Gies
8	Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie,
9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24	*Corresponding author: Dr. E. Sick, CNRS, UMR 7213, Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 rte du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch, France.
25 26 27 28	E-mail address: emilie.sick@unistra.fr
<ol> <li>29</li> <li>30</li> <li>31</li> <li>32</li> <li>33</li> <li>34</li> <li>35</li> <li>36</li> <li>37</li> <li>38</li> <li>39</li> <li>40</li> <li>41</li> <li>42</li> <li>43</li> <li>44</li> <li>45</li> <li>46</li> </ol>	Running title: Mast cells induce astrocytoma cell proliferation Abbreviations: ECM, extracellular matrix; VEGF, vascular endothelial growth factor; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase; RPMC, rat peritoneal mast cells; NHA, normal human astrocytes; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium); mAb, monoclonal antibody.
47	
## 48 Abstract

49

50 The tumour microenvironment contributes to cancer development. Among tumour-infiltrating 51 leukocytes, mast cells accumulate precociously and abundantly at sites of tumour growth but it is 52 still not clear how mast cells interact with tumours. Using a co-culture model, we show that mast 53 cells enhance the proliferation of human U87 and CCF-STTG1 astrocytoma cells and that this 54 effect requires cell-to-cell contact. Unlike U87 cells, growth of U373 cells, SW1783 cells and 55 normal human astrocytes was not modified by the presence of mast cells. U87 and CCF-STTG1 56 cells secreted several pro-inflammatory cytokines in the presence of mast cells, in particular IL-6. 57 Secreted cytokines may be, at least in part, responsible for U87 and CCF-STTG1 proliferation, 58 since cytokine secretion by U373 and SW1783 was not increased in co-culture. Migration of U87 59 and U373 cells and secretion of metalloproteinases were increased in the presence of mast cells. 60 Taken together, our data indicate that mast cells stimulate cytokine secretion from U87 and CCF-61 STTG1 astrocytoma cells, thereby likely contributing to tumour aggressiveness by enhancing both 62 proliferation and migration. 63 64

65

66 Key words: tumour microenvironment; cytokines; inflammation; migration; proliferation

## 67 Introduction

68

It is now widely accepted that tumours are heterogeneous cellular entities whose growth is dependent upon reciprocal interactions between genetically altered initiating cells and their dynamic microenvironment. Indeed, cancers contain cells of multiple lineages whose interactions with each other, the extracellular matrix (ECM) and soluble molecules in their vicinity favour cell proliferation and migration, differentiation and ECM metabolism, while simultaneously restricting cell death. The tumour microenvironment includes activated and/or recruited fibroblasts, cells that line blood and lymphatic vessels and inflammatory cells (63).

It also has been long held that a relationship exists between inflammation and cancer. 76 77 Indeed, in 1863, Virchow hypothesized that the origin of cancer was at sites of chronic 78 inflammation (5). Subsequently, multiple clinical and experimental studies have reported that 79 innate immune cells like granulocytes, macrophages and mast cells play a promoting role during 80 cancer development (11). Chronic inflammatory conditions predispose humans to certain cancers, 81 with notably, patients having chronic Helicobacter pylori infection exhibiting a 75% increased 82 risk for gastric cancer. Moreover, most current data support the notion that tumour-infiltrating 83 leukocytes do not exert normal immunoprotective mechanisms that lead to eradication of the 84 evolving cancer. Instead, excessively and chronically produced pro-inflammatory mediators are 85 thought to contribute to tumour promotion and progression (31, 63).

86 Among tumour-infiltrating leukocytes, mast cells abundantly accumulate at sites of tumour 87 growth in response to numerous chemoattractants. Mast cells are tissue dwelling cells that play a 88 pivotal role in allergic reactions and take part in other pathophysiological conditions such as 89 innate and acquired immunity, autoimmune diseases, inflammation, wound healing and fibrosis 90 (6, 21). Mast cells present in the brain are of the serosal type, like those found intraperitoneally. 91 Many clinical studies show that mast cell infiltration is correlated with angiogenesis (33) and poor 92 prognosis in several types of cancer, including colon cancer (19), hepatocellular carcinoma (46), 93 Hodgkin's lymphoma (41), pancreatic cancer (60), melanoma (20), endometrial carcinoma (10) 94 and astrocytoma (9, 51). Mast cells are infiltrated in almost all cases of subependymal giant-cell 95 astrocytoma, both in the perivascular areas and between tumoural cells where an admixture with T-cells has been reported (9, 51). However, mast cell infiltration has also been associated with 96 97 favourable prognosis in some invasive breast cancers (4, 49), as well as in some cases of pleural 98 mesothelioma (2) and colorectal cancer (56). Thus, even if prognosis associated with mast cell 99 infiltration remains controversial in clinical studies, a common feature is that mast cells are 100 present during the early steps of tumourigenesis, before other tumour-associated leukocytes like 101 macrophages and lymphocytes. This indicates that mast cells may play a crucial role in tumour

102 promotion. A dual role of mast cells in tumourigenesis may be explained by their differential 103 location. Mast cells originate from the bone marrow and undergo their final differentiation under 104 the influence of locally produced growth factors. Thus, the tumour microenvironment may well 105 alter the phenotypic behaviour of mast cells, their granule contents and also the secretory process 106 (59). Indeed, activated mast cells release multiple mediators that can either stimulate cancer 107 growth or, on the contrary, inhibit cancer progression. Mast cells stimulate angiogenesis via 108 secreted heparin-like molecules, vascular endothelial growth factor (VEGF) and IL-8 (7, 57). 109 Histamine, a major mast cell mediator, triggers mitogenesis, vasodilatation and 110 immunosuppression. In addition, the use of ranitidine, a histamine H2 receptor antagonist, as 111 adjuvant therapy, prolongs the survival of colorectal cancer patients. Mast cells are also rich in 112 metalloproteinases (MMPs) that represent the majority of proteolytic components necessary for 113 tumour invasiveness. In contrast, it is known that cytokines secreted by mast cells like IL-4 or 114 TNF- $\alpha$  induce tumour cell death (59). These differences do not allow to clearly determine the 115 benefits or disadvantages of the presence of mast cells in the tumour microenvironment or to 116 define the underlying signalling mechanisms. Thus, using a co-culture model, we sought to 117 analyze how mast cells influence the growth and migration of human astrocytoma cells that 118 represent the most frequent and morbid brain cancer type.

Here, we show for the first time that mast cells enhance the proliferation of U87 and CCF-STTG1 cells. This effect required that mast cells be in close contact with U87 and CCF-STTG1 cells, and was associated with increased secretion of several pro-inflammatory cytokines, in particular IL-6. The presence of mast cells increased migration of astrocytoma cells and secretion of metalloproteinases, in particular MMP-3. Our results are consistent with mast cells promoting glioma development and malignant progression in the brain.

- 125
- 126
- 127

- 128 Materials and methods
- 129

## 130 Cell culture

131 Human U87 astrocytoma (ATCC, Rockville, IN, USA), human U373 astrocytoma (ECACC, 132 Salisbury, UK) and normal human astrocytes (Lonza, Basel, Switzerland) were maintained in 133 EMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 µg/mL gentamycin, 100 UI/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. Human SW1783 astrocytoma 134 (ATCC) and CCF-STTG1 astrocytoma (ATCC) were maintained in Leibovitz medium L-15 and 135 136 RPMI 1640 respectively, containing the same supplements as for EMEM. Culture medium and supplements were from Lonza. Primary cultures of normal human astrocytes were used for 137 138 experiments between the first and the fourth passage. Cells were grown at 37°C in a humidified 139 incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air.

140

# 141 Isolation and purification of mature peritoneal mast cells

142 Male Wistar rats (300-500 g) were anesthetised before bleeding. 10 mL sterile HEPES buffer (137 143 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, 144 10 mM HEPES and NaOH to pH 7.4) supplemented with 0.1% BSA were injected 145 intraperitoneally, as previously described (52). Peritoneal fluid was collected after gentle abdominal 146 massage and centrifuged for 3 min at 180x g. The pellet of mixed peritoneal cells was resuspended 147 in the same buffer and mast cells were purified by centrifugation for 10 min at 220x g on a 148 discontinuous BSA gradient (30% and 40%, w/v). The pellet was then resuspended and mast 149 cells were examined under a light microscope for viability (>95%) and purity (>97%) using 150 Trypan blue and toluidine blue respectively. Rats were raised in the licensed animal house 151 facilities in the Faculty of Pharmacy. Experiments using rats were done in licensed rooms under 152 supervision by authorized personnel and were in accordance with Institutional policies (N° D-67-153 218-26, Direction Départementale des Services Vétérinaires du Bas-Rhin).

154

# 155 Quantification of mast cell exocytosis

Purified mast cells  $(2x10^4 \text{ cells/assay})$  were pre-incubated for 5 min at 37°C before challenge with compound 48/80 (1 µg/mL) for 10 min at 37°C. Reactions were stopped by adding ice-cold buffer. Exocytosis of mast cells was quantified by determining the amount of secreted histamine by spectrofluorimetry, as previously described (53). Values for stimulated histamine release in the supernatant were expressed as a percentage of the total cellular histamine content obtained after cell lysis (supernatant/(supernatant+pellet) x100) and were corrected for the basal release of histamine (similarly calculated) that occurred in the absence of any stimulus. Basal histamine 163 release from control non-stimulated cells was less than 5% of total content.

164

# 165 Cell proliferation assay in co-culture

U87, U373, SW1783, CCF-STTG1 cells and normal human astrocytes  $(1 \times 10^5)$  were plated in 24-166 167 well plates in EMEM supplemented with 1% FBS and were grown for 24 h. Rat peritoneal mast 168 cells (RPMC) were added  $(2.5 \times 10^4 \text{ or } 5 \times 10^4)$  in a final volume of 1 mL serum-free medium and 169 incubated for 24 and 48 h at 37°C. Experiments where cell types were separated were done using 170 Transwell<sup>®</sup> inserts (Corning Inc. Life Sciences, Lowell, MA, USA) having a membrane pore size 171 of 0.4 µm, with mast cells seeded in the insert and astrocytoma in the bottom of the well. In some 172 experiments, mast cells were activated by compound 48/80 (1 µg/mL). Cell proliferation was 173 assessed using a colorimetric MTS-based assay (CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell 174 Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. 175 Since the MTS test is a metabolic assay, all data were confirmed by  $[^{3}H]$ -thymidine incorporation 176 as described in the following section. 177

# 178 [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation

U87 and U373 cells  $(1x10^5)$  were plated in 24-well plates in EMEM supplemented with 1% FBS 179 and were grown for 24 h. Rat peritoneal mast cells (RPMC) were added  $(2.5 \times 10^4)$  or  $5 \times 10^4$ ) in 180 181 a final volume of 1 mL serum-free EMEM and incubated for 24 and 48 h at 37°C. Astrocytoma cell 182 proliferation was assessed by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation, as previously described (54). Briefly, 183  $[{}^{3}H]$ -thymidine (0.5 µCi/well) was added for the last 6 h incubation. The medium was then 184 discarded and the cells were rinsed twice with ice cold PBS. 10% TCA was then added for 10 min 185 on ice, discarded and fresh TCA was incubated for 10 min at room temperature. TCA-insoluble 186 material was then incubated with 1 N NaOH. Plates were allowed to stand overnight at room 187 temperature. Samples were then neutralised with 2 N HCl, loaded in scintillation liquid and the 188 tritium content was determined by scintillation counting.

189

# 190 Assay of cytokine secretion and matrix metalloproteinases in co-culture

191 Co-cultures were established as described above. Cell culture medium was collected after 24 h 192 and centrifuged for 3 min at 180x g. Cell-free supernatants were incubated overnight at 4°C on 193 membrane array assays coated with either immobilized, anti-cytokine mAbs (RayBio<sup>®</sup> Human 194 Cytokine Antibody Array, RayBiotech, Norcross, GA, USA) or anti-metalloproteinase mAbs 195 (RayBio<sup>®</sup> Human Matrix Metalloproteinase Antibody Array, Raybiotech). Determination of 196 secreted cytokines and matrix metalloproteinases was done according to the manufacturer's 197 instructions. Image J software (NIH freeware) was used for densitometric analysis. Human IL-6 levels in cell-free supernatants of co-cultures were also assessed using an ELISA kit (RayBio<sup>®</sup>
Human IL-6, RayBiotech) according to the manufacturer's instructions.

200

# 201 Migration assay

Migration was assessed using 24-well plates having Transwell<sup>®</sup> inserts with a membrane pore size of 8  $\mu$ m. U87 and U373 cells (1x10<sup>5</sup>) were plated on the inserts in 1 mL EMEM supplemented with 1% FBS and were grown for 24 h at 37°C. Mast cells (2.5x10<sup>4</sup> or 5x10<sup>4</sup>) were then plated in a final volume of 1 mL serum-free EMEM in the bottom wells. After 24 and 48 h at 37°C, astrocytoma cells that migrated to the bottom well were quantified by the MTS assay (Promega).

208 Statistical analysis

Results are presented as mean±s.e.m. from at least 3 independent experiments. Statistical analysis

was done using ANOVA. Significant differences are represented throughout as \*p<0.05.

211

- 212 **Results**
- 213

214 Co-cultured mast cells enhance the proliferation of U87 and CCF-STTG1 cells, but not U373 and

215 SW1783 cells or normal human astrocytes

216 As shown in Fig. 1A, after 24 h, U87 cell growth assessed by MTS was increased by 25% in the 217 presence of  $2.5 \times 10^4$  mast cells (ratio 1/4) and by 50% in the presence of  $5 \times 10^4$  mast cells (ratio 218 1/2). In confirmation, when assessed by  $[^{3}H]$ -thymidine incorporation under the same conditions. 219 the presence of mast cells (ratio 1/4 and 1/2) increased U87 cell growth by 20% and 40% 220 respectively (Fig. 1B). After 48 h, U87 cell growth increased by 47±5% in the presence of 2.5x10<sup>4</sup> 221 mast cells, similar to the increase (55 $\pm$ 6%) obtained after 24 h in the presence of 5x10<sup>4</sup> mast cells 222 (not shown). No proliferation of mast cells alone was observed, as assessed by [<sup>3</sup>H]-thymidine 223 uptake and by MTS after 24 h and 48 h (not shown), in agreement with the well-known lack of 224 proliferation of mature mast cells in vivo. To further confirm that proliferation observed in co-225 culture was due to astrocytoma cells but not mast cells, mast cells were pretreated with 226 mitomycin-C (10  $\mu$ g/mL), an anti-mitotic agent, for 1 h before co-culture experiments. We found 227 that U87 cell growth was similar to that observed when mast cells were left untreated, indicating 228 that the observed increase in proliferation in co-culture is solely due to astrocytoma cells and that 229 mast cells are not stimulated to proliferate when in contact with astrocytoma (not shown).

230 These results show that the effect of mast cells on U87 growth is rapid with an almost 231 maximal effect being obtained after 24 h. When mast cells were activated by compound 48/80, 232 their stimulatory effect on U87 cell growth was not modified. CCF-STTG1 cell growth assessed 233 by MTS was also increased by 50% in the presence of mast cells after 24 h (Fig. 1C). In contrast, 234 U373 cell growth assessed by MTS was not altered in the presence of mast cells activated by 235 compound 48/80 or not after 24 h (Fig. 1D) or 48 h (not shown). This absence of effect of mast 236 cells on U373 cell growth was confirmed by [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake (Fig. 1E). SW1783 growth 237 was also unchanged in the presence of mast cells after 24 h (Fig. 1F). Similarly, normal human 238 astrocyte (NHA) growth was unchanged in the presence of resting or activated mast cells after 24 239 h (Fig. 1G) or 48 h (not shown).

- Mast cell activation by 0.1-1  $\mu$ g/mL compound 48/80 as classically used in many *in vitro* studies (39, 42, 48) was verified by measuring secreted histamine. A maximal secretory response amounting to 60.3 ± 3.5% of total histamine content was obtained (Fig. 1H).
- 243

# 244 Cell-to-cell contact is required for mast cell-induced astrocytoma growth

To investigate whether direct cell-to-cell contact is required for astrocytoma growth, mast cells were separated from astrocytoma by a Transwell insert (0.4  $\mu$ m membrane pore diameter). Under these conditions, after 24 h, resting and compound 48/80-activated mast cells no longer stimulated
U87 cell growth assessed by MTS (Fig. 2A). Similarly, U373 cell growth was not modified when
co-cultured with resting or activated mast cells separated by the 0.4 μm porous membrane (Fig.

250 2B). The growth of both U87 and U373 cells was also unchanged after 48 h co-culture with mast

cells in these conditions (not shown). [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake experiments confirmed the absence
of effect of mast cells on U87 and U373 cell growth. Similarly, the growth of NHA, CCF-STTG1
and SW1783 cells was unchanged by the presence of mast cells under these conditions (not
shown).

255

# Pro-inflammatory cytokines are secreted by U87 and CCF-STTG1 cells in the presence of mast cells but not by U373 or SW1783 cells

258 Cytokine production in co-cultures where mast cells were in direct contact with astrocytoma was 259 assessed using an array assay kit. After 24 h, conditioned culture media from co-cultures were 260 incubated on membranes coated with mAbs directed against human cytokines. The secretion of 261 several pro-inflammatory cytokines from U87 and CCF-STTG1 cells was significantly increased 262 in the presence of mast cells (Fig. 3). Notably, strong increases in the secretion of IL-6 and IL-7 263 were observed for both U87 and CCF-STTG1 cells. Secretion of granulocyte-macrophage-colony 264 stimulating factor (GM-CSF) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was also 265 augmented for U87 cells. IL-8 was also increased but to a lesser extent for both U87 and CCF-266 STTG1 cells. To verify mAb specificity towards human cytokines, conditioned media from rat 267 mast cells alone were assessed using the same array assay. No cross reactivity for rat cytokines 268 was observed except for epithelial growth factor (EGF), but this cytokine was not increased in co-269 culture conditions. Surprisingly, cytokine secretion was not increased from U373 or SW1783 cells 270 in the presence of mast cells (Fig. 3). However, this lack of stimulation is consistent with the 271 absence of an increase in U373 and SW1783 cell growth in the presence of mast cells. The profile 272 of basal cytokine secretion from U87 and U373 cells cultured in the absence of mast cells was 273 also different. Indeed, U87 cells basally secreted IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, EGF, growth-related 274 oncogene (GRO) and GROa, whereas for U373 cells, MCP-1 and IL-8 to a lesser extent were the 275 only cytokines basally detected.

We verified the increase in IL-6 secretion from U87 cells in co-culture with mast cells by ELISA (Fig. 4). Basal IL-6 secretion from U87 cells in the absence of mast cells was 757±212 pg/mL and increased 5-fold to 3927±747 pg/mL in the presence of mast cells (ratio 1/2). Basal IL-6 secretion from U373 cells was 112±49 pg/mL and was not significantly different (302±278 pg/mL) in the presence of mast cells. Again, IL-6 was undetectable in media conditioned by rat mast cells alone. These results agree with the data obtained using the cytokine array assay. Moreover, since it was previously shown that IL-6 stimulates autocrine growth of U87 cells (17), these results are consistent with a key role for IL-6 in mast cell-associated proliferation of U87 cells.

285

# 286 Mast cells stimulate the migration of astrocytoma cells

287 Mast cells release a variety of proteases including metalloproteinases and tryptase that could 288 enhance cell migration and the formation of metastasis by disrupting the surrounding tissues. The 289 influence of mast cells on U87 and U373 cell migration was assessed using Transwell® inserts 290 with a membrane pore size of 8 µm. Mast cells (ratio 1/2) enhanced migration of U87 and U373 291 cells by 70% and by 90% respectively after 24 h (Fig. 5A, B). Again, no significant differences 292 were observed when mast cells were previously activated by compound 48/80. These data suggest 293 that mast cells secrete chemoattractants necessary and sufficient to induce astrocytoma cell 294 migration. Interestingly, U373 cell migration was increased by the presence of mast cells even if 295 U373 cell proliferation and cytokine secretion were insensitive to mast cells in co-culture.

296 Matrix metalloproteinases play a central role in the invasive process of astrocytoma (12). 297 The secretion of MMPs from astrocytoma in the presence of  $5 \times 10^4$  mast cells (ratio 1/2) was 298 assessed similarly as for cytokines using an array assay. As illustrated in Fig. 6, the presence of 299 mast cells increased the secretion of MMP-3, TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-4 from U87 cells after 300 24 h. Thus, in experiments where U87 cells migrating through the 8  $\mu$ m pores of the Transwell 301 insert come into direct contact with mast cells, it can subsequently be expected that secretion of 302 MMPs and TIMPs will be upregulated, thereby sustaining migration. By contrast, for U373 cells, 303 only TIMP-1 and TIMP-2 secretion increased in the presence of mast cells. A difference in basal 304 secretion of MMP between U87 and U373 cells was also detected, with U87 cells basally 305 secreting MMP-3, unlike U373 cells.

- 306
- 307

## 308 Discussion

309 In this study, we investigated the influence of mast cells on astrocytoma cell behaviour in 310 vitro, thus aiming to clarify the role of mast cells in brain tumour development. Serosal (or 311 connective-tissue) mast cells are resident in the brain where they enter during development via 312 penetrating blood vessels with which they remain associated (45, 55). Like lymphoblasts, mast 313 cells can move through normal brain in the absence of inflammation (55). Perivascular mast cells 314 are also located in the meninges and in the brain parenchyma where they concentrate in the 315 thalamus, hypothalamus and hippocampal regions (14, 15, 45). They can potentially mediate 316 neurotransmission, neurite outgrowth, and neuronal survival in the brain (55). Mast cells have also 317 been identified in the forebrain of several species (38). Mast cells have been implicated in several brain pathologies including multiple sclerosis (47, 61), Alzheimer's disease (34) and 318 319 neurofibromatosis type 1 (18, 27). They are critical in the regulation of blood-brain barrier 320 permeability, disruption of which precedes clinical or pathological signs of multiple sclerosis (61) 321 and probably also brain metastases (62).

322 The precocious infiltration of mast cells in several types of tumours has been described, 323 including astrocytoma (9, 51), but the functional significance for this excess presence of mast cells 324 remains unclear. To our knowledge, our data demonstrate for the first time that mast cells can 325 directly enhance astrocytoma cell proliferation. We found that mature serosal-type mast cells stimulated U87 and CCF-STTG1 cell growth when direct cell-to-cell contact was allowed. In 326 327 contrast, growth of U373, SW1783 cells and normal human astrocytes was unaffected in the 328 presence of mast cells. A few previous studies describe the *in vitro* effects of mast cells on cancer 329 cells. In a co-culture assay, the human mast cell line HMC-1 stimulated thymidine uptake in 330 Hodgkin and Reed-Sternberg cell lines (40). This same mast cell line was also shown to promote 331 tumour colony formation and proliferation of a lymphoplasmacytic lymphoma in co-culture (64). 332 Very recently, human cord blood-derived mast cells were shown to enhance the proliferation of 333 human and mouse non-small cell lung cancer cells in co-culture (58). It should however be noted 334 that such derived human mast cell lines have some well-known drawbacks because they exhibit 335 features that are characteristic of immature mast cells, mucosal mast cells or leukaemic mast cells.

A dependence on cell-to-cell contact was previously described in other heterologous coculture studies. Indeed, direct contact of human airway smooth muscle cells (ASMC) with mast cells enhanced the production of eotaxin from ASMC (32). Similarly, it was reported that rat peritoneal mast cells increase the expression of E-selectin by HUVEC and that this effect depends on the contact between mast cells and HUVEC (65). In co-cultures of rat peritoneal mast cells and human aortic endothelial cells, activation of mast cells was accompanied by increased expression of ET-1 mRNA in endothelial cells (37). Mast cells also enhanced contraction of three343 dimensional collagen lattices by fibroblasts by cell-cell interactions (66). It should be furthermore 344 noted that heterologous co-cultures employing rat peritoneal mast cells have been widely 345 validated as models for the investigation of serosal mast cell functions, in particular to study their 346 proliferative actions on fibroblasts from mouse or human lung (16, 28-30, 50). Mast cells used in 347 these co-culture studies were usually in ratios of 1/1 to 1/5, similar to the ratios used here (1/2 and 348 1/4). Taken together, these reports using heterologous co-cultures strongly indicate that the 349 influence of serosal-type, mature peritoneal mast cells from rat on different types of human cells 350 can be unambiguously studied.

We found that U373, SW1783 cells and normal astrocytes do not have increased growth in the presence of mast cells, unlike U87 and CCF-STTG1 cells, suggesting that U87 and CCF-STTG1 cells may express a yet unidentified specific cell surface marker that permits interaction with mast cells. This marker might not be present in normal astrocytes or might be expressed only at low levels and its expression may be enhanced during the cancerogenesis process.

No significant differences were found for U87 cell proliferation when mast cells were previously activated or not in co-culture by compound 48/80, even if the concentration used was sufficient to induce histamine release. Those data are in part consistent with previous reports indicating that mast cell mediators released by 48/80 have divergent effects on fibroblast behaviour. Indeed, it was found that tryptase stimulated fibroblast proliferation, whereas histamine was without effect and TNF- $\alpha$  was anti-mitotic (1).

362 We observed that U87 and CCF-STTG1 cells secreted several cytokines in co-culture 363 when mast cells were in direct contact, unlike U373 or SW1783 cells. These cytokines are mainly 364 pro-inflammatory mediators that sustain astrocytoma growth and can potentially recruit other 365 inflammatory cells. In particular, IL-6 secretion levels from U87 and CCF-STTG1 cells were 366 strongly increased in the presence of mast cells. IL-6 is a potent, pleiotropic, inflammatory 367 cytokine that mediates a plethora of physiological functions (23, 24, 44). IL-6 is an essential factor 368 for T- and B-cell development and functions. It also takes part in the regulation of the acute-phase 369 response in the liver, regulates fever, cachexia and loss of muscle mass. High circulating levels of 370 IL-6 have been linked to insulin resistance and obesity (24). IL-6 signals downstream to STAT3, 371 which is in turn, activated in diverse cancers. Indeed, many cancers are IL-6-dependent, including 372 multiple myeloma, hepatocellular carcinoma, colon, ovarian, breast, renal and prostate cancers 373 (44). In U87 cells, IL-6 was identified as an autocrine growth factor (17). GM-CSF secretion from 374 U87 cells also increased in the presence of mast cells. This cytokine was originally identified as 375 factor controlling proliferation, maturation and functional activity of granulocytes, macrophages 376 and their precursors. GM-CSF is now thought to have a much broader spectrum of activities, 377 being produced by fibroblasts, keratinocytes and endothelial cells. It stimulates the growth of

378 fibroblast precursor cells and keratinocytes, and stimulates endothelial cell proliferation and 379 migration, thereby potentially promoting angiogenesis. Moreover, GM-CSF overexpression was 380 reported in non-hematopoietic human tumour cells, suggesting a potential role of this factor in 381 tumour growth and invasion. Consistently, GM-CSF is expressed in glioma cells in culture and 382 stimulates proliferation and migration via an autocrine signalling pathway (43). Furthermore, U87 383 and CCF-STTG1 cells secreted IL-7 in co-culture. This cytokine was not secreted when U87 or 384 CCF-STTG1 cells were cultured alone, as found previously (22), even if its receptor IL-7R $\alpha$  is 385 expressed. IL-7 is required for the development of T cells and for their persistence in the 386 periphery (35), but may also have a promoting role in the development of solid epithelial tumours 387 (3). However, its direct role on astrocytoma has not yet been assessed. MCP-1 was also secreted by U87 cells in co-culture. This cytokine is expressed in human astrocytoma in vitro and in vivo 388 389 (13). MCP-1 attracts monocytes and macrophages, indicating that mast cells might trigger 390 astrocytoma-induced recruitment of other inflammatory cells. MCP-1 was also one of the few 391 cytokines basally secreted by U373 cells. This suggests that even if U373 cell growth was not 392 affected by the presence of mast cells, U373 cells may have a basal tendency to recruit 393 inflammatory cells into their microenvironment.

394 Finally, we observed that mast cells increase the migration of both U87 and U373 cells. 395 This stimulatory effect was similar whether mast cells were activated or not by compound 48/80, 396 suggesting that mast cells basally secrete chemoattractant factors responsible for astrocytoma 397 migration. In addition, we found that mast cells enhanced the secretion of MMP-3, TIMP-1, 398 TIMP-2 and TIMP-4 from U87 cells in co-culture whereas, only TIMP-1 and TIMP-2 secretion 399 from U373 cells was increased. MMP-3/stromelysin-1 expression has been shown to account for 400 the invasive properties of human astrocytoma cell lines. Compared to the gelatinases MMP-2 and 401 MMP-9, MMP-3 expression is highly correlated to glioma tumourigenicity and invasiveness in 402 vivo (36). The central nervous system has an extracellular matrix enriched in proteoglycans and 403 MMP-3 is one of the few MMPs that readily degrades proteoglycan core proteins. Thus, MMP-3-404 dependent degradation of the hyaluronic acid-rich ECM of the brain might be a key factor leading 405 to glioma cell migration and invasion. Interestingly, many TIMPs were also secreted in our co-406 culture experiments. TIMPs can block the activity of MMPs and may thus be important in 407 regulating glioma cell invasion. On the other hand, paradoxically, increased TIMP expression is 408 associated with poor prognosis and TIMPs also have growth stimulatory and anti-apoptotic effects 409 (25). For example, TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-4 exert anti-apoptotic effects by inducing the 410 expression of Bcl-2 and MAPK activities (25). Moreover, TIMP-1 and TIMP-2 are directly 411 mitogenic for keratinocytes, fibroblasts, lung adenocarcinoma and melanoma cells (8). On the 412 contrary, TIMP-3 was reported to induce apoptosis, particularly of primary glioma cell cultures

and U87 cells (26). The TIMPs identified here as being increased in astrocytoma cells in coculture with mast cells are all described as being anti-apoptotic or mitogenic, thus potentially
contributing to the stimulatory effect of mast cells particularly on U87 cell growth.

416 In conclusion, we show for the first time that mast cells stimulate U87 and CCF-STTG1 417 astrocytoma cell growth but do not affect normal astrocytes. This effect was dependent on cell-to-418 cell contact and was accompanied by the secretion of several pro-inflammatory cytokines and 419 growth factors, in particular IL-6. Secretion of these growth factors from U373 or SW1783 cells 420 did not occur in the presence of mast cells, thus likely explaining the absence of stimulated cell 421 growth. Mast cells also enhanced the migration of both U87 and U373 cells and stimulated the 422 expression and secretion of metalloproteinases, in particular MMP-3, involved in glioma invasion. 423 These results point to precocious infiltration of mast cells as being critical in conditioning the 424 tumour microenvironment. Taken together, our in vitro data are consistent with mast cells playing 425 key roles in promoting astrocytoma cell proliferation and migration, thereby enhancing malignant 426 progression of glioma in the brain.

427

*Acknowledgements.* This work was in part supported by the CNRS and the Ligue Contre le Cancer
(grant to JPG, from the Comité du Haut-Rhin). ES was recipient of a Fellowship from the
Ministère de la Recherche.

431

*Author contributions.* E. Sick, J.P. Gies and K. Takeda designed experiments and obtained
funding; E. Sick, A Boukhari, P. André and G. Coupin did experiments; E. Sick, A. Boukhari and
J.P. Gies analysed data; E. Sick and K. Takeda wrote the paper.

435

## 436 **References**

- 437 1. Albrecht M, Frungieri MB, Kunz L, Rämsch, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A.
  438 Divergent effects of the major mast cell products histamine, tryptase and TNF-alpha on
  439 human fibroblast behaviour. *Cell Mol Life Sci* 62: 2867-2876, 2005.
- Ali G, Boldrini L, Lucchi M, Mussi A, Corsi V, Fontanini G. Tryptase mast cells in
  malignant pleural mesotheliomas as an independent favourable prognostic factor. *J Thorac Oncol* 4: 348-354, 2009.
- 443 3. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 receptor (IL-7R)
  444 signalling complex in human solid tumors. *Histol Pathol* 18: 911-923, 2003.
- 445 4. Amini R, Aaltonen K, Nevanlinna H, Carvalho R, Salonen L, Heikkilä P, Blomqvist C.
  446 Mast cells and eosinophils in invasive breast carcinoma. *BMC Cancer* 7: 165, 2007.
- 447 5. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 357: 539-545,

448 2001.

- 6. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of
  human and murine data. *Nat Rev Immunol* 7: 93-104, 2007.
- 7. Boesiger J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF, Galli
  SJ. Mast cells secrete vascular permeability factor and exhibit enhanced release after
  immunoglobulin E-dependent upregulation of Fce receptor I expression. *J Exp Med* 188:
  1135-1145, 1998.
- 455 8. Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HRC. Novel functions of TIMPs in cell signalling.
  456 *Cancer Metastasis Rev* 25: 99-113, 2006.
- 457 9. Chow CW, Klung GL, Lewis EA. Subependymal giant-cell astrocytoma in children. An
  458 unusual discrepancy between histological and clinical features. *J Neurosurg* 68: 880-883,
  459 1988.
- 460 10. Cinel L, Aban M, Basturk M, Arpaci R, Dilek S, Camdeviren H. The association of mast
- 461 cell density with myometrial invasion in endometrial carcinoma: a preliminary report. *Pathol*462 *Res Pract* 205: 255-258, 2009.
- 463 11. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867, 2002.
- 464 12. Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. J
   465 Neurooncol 70: 217-228, 2004.
- 466 13. Desbaillets I, Tada M, de Tribolet N, Diserens A, Hamou M, Van Meir EG. Human
  467 astrocytomas and glioblastomas express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in
  468 vivo and in vitro. *Int J Cancer* 58: 240-247, 1994.
- 469 14. Ferguson M, Dalve-Endres AM, McRee RC, Langlais PJ. Increased mast cell
  470 degranulation within thalamus in early pre-lesion stages of an experimental model of
  471 Wernicke's encephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 773-783, 1999.
- 472 15. Florenzano F, Bentivoglio M. Degranulation, density, and distribution of mast cells in the rat
  473 thalamus: a light electron microscopic study in basal conditions and after
  474 intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *J Comp Neurol* 424: 651-669,
  475 2000.
- 476 16. Garbuzenko E, Berkman N, Puxeddu I, Kramer M, Nagler A, Levi-Schaffer F. Mast cells
  477 induce activation of human lung fibroblasts in vitro. *Exp Lung Res* 30: 705-721, 2004.
- 478 17. Goswami S, Gupta A, Sharma SK. Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in
  479 human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J Neurochem* 71: 1837-1845, 1998.
- 480 18. Gottfried ON, Viskochil DH, Couldwell WT. Neurofibromatosis Type 1 and tumorigenesis:
  481 molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurosurg Focus* 28: E8, 2010.
- 482 19. Gounaris E, Erdman SE, Restaino C, Gurish MF, Friend DS, Gounari F, Lee DM,

- Zhang G, Glickman JN, Shin K, Rao VP, Poutahidis T, Weissleder R, McNagny KM,
  Khazaie K. Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development.
- 485 *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19977-19982, 2007.
- 486 20. Grimbalderson MA, Pearce AL, Robertson BO, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Association
  487 between melanoma and dermal mast cell prevalence in sun-unexposed skin. *Br J Dermatol*488 150: 895-903, 2004.
- 489 21. Gurish MF, Austen KF. The diverse roles of mast cells. J Exp Med 194: 1-5, 2001.
- 490 22. Hao C, Parney IF, Roa WH, Turner J, Petruk KC, Ramsay DA. Cytokine and cytokine
- 491 receptor mRNA expression in human glioblastomas: evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine
  492 dysregulation. *Acta Neuropathol* 103: 171-178, 2002.
- 493 23. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer.
  494 *Eur J Cancer* 41: 2502-2512, 2005.
- 495 24. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer. *Cancer* 110:
  496 1911-1928, 2007.
- 497 25. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in
  498 cancer. *Oncogene* 21: 2245-2252, 2002.
- Lamfers ML, Gianni D, Tung CH, Idema S, Schagen FH, Carette JE, Quax PH, Van
  Beusechem VW, Vandertop WP, Dirven CM, Chiocca EA, Gerritsen WR. Tissue
  inhibitor of metalloproteinase-3 expression from an oncolytic adenovirus inhibits matrix
  metalloproteinase activity in vivo without affecting antitumor efficacy in malignant glioma. *Cancer Res* 65: 9398-9405, 2005.
- 504 27. Le LQ, Panada LF. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type 1: connecting the
   505 GAPs. *Oncogene* 26: 4609-4616, 2007.
- 506 28. Levi-Schaffer F, Segal V, Shalit M. Effects of interleukins on connective tissue type mast
   507 cells co-cultured with fibroblasts. *Immunology* 72: 174-180, 1991.
- 508 29. Levi-Schaffer F, Segal V, Baram D, Mekori YA. Effect of coculture of rodent mast cells
  509 with murine chronic graft-versus-host disease (cGVHD)-derived fibroblasts. J Allergy Clin
  510 Immunol 89: 501-509, 1992.
- 511 30. Levi-Schaffer F, Rubinchik E. Activated mast cells are fibrogenic for 3T3 fibroblasts. J
   512 Invest Dermatol 104: 999-1003, 1995.
- 513 31. Lin W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and
   514 cancer. *J Clin Invest* 117: 1175-1183, 2007.
- 515 32. Liu L, Yang J, Huang Y. Human airway smooth muscle cells express eotaxin in response to
   516 signalling following mast cell contact. *Respiration* 73: 227-235, 2005.
- 517 33. Maltby S, Khazaie K, McNagny KM. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue

- 518 remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta* 1796: 19-26, 2009.
- 519 34. Maslinska D, Laure-Kamionowska M, Maslinski KT, Gujski M, Maslinski S. Distribution
- 520 of tryptase-containing mast cells and metallothionein reactive astrocytes in human brains with 521 amyloid deposits. *Inflamm Res* 56: 17-18, 2007.
- 522 35. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev* 523 *Immunol* 7: 144-154, 2007.
- 36. Mercapide J, Lopez de Cocco R, Castresana JS, Klein-Szanto AJP. Stromelysin-1/matrix
   metalloproteinase-3 (MMP-3) expression accounts for invasive properties of human
   astrocytoma cell lines. *Int J Cancer* 106: 676-682, 2003.
- 37. Metsärinne KP, Vehmaan-Kreula P, Kovanen PT, Saijonmaa O, Baumann M, Wang Y,
   Nyman T, Fyhrquist FY, Eklund KK. Activated mast cells increase the level of endothelin-
- 1 mRNA in cocultured endothelial cells and degrade the secreted peptide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 268-273, 2002.
- 38. Michaloudi HC, Papadopoulos GC. Mast cells in the sheep, hedgehog and rat forebrain. J
   Anat 195: 577-586, 1999.
- 533 39. Miller LA, Cochrane DE, Carraway RE, Feldberg RS. Blockage of mast cell histamine
  534 secretion in response to neurotensin by SR 48692, a nonpeptide antagonist of the neurotensin
  535 brain receptor. *Br J Pharmacol* 114: 1466-1470, 1995.
- 40. Molin D, Fischer M, Xiang Z, Larsson U, Harvima I, Venge K, Nilsson K, Sundström C,
  Enblad G, Nilsson G. Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant
  CD30L-positive cells in Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 114: 616-623, 2001.
- 41. Molin D, Edström A, Glimelius I, Glimelius B, Nilsson G, Sundström C, Enblad G. Mast
  cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 119:
  122-124, 2002.
- 42. Mousli M, Bronner C, Bueb JL, Tschirhart E, Gies JP, Landry Y. Activation of rat
  peritoneal mast cells by substance P and mastoparan. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 329-335,
  1989.
- 545 43. Mueller MM, Herold-Mende CC, Riede D, Lange M, Steiner HH, Fusering NE.
  546 Autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte
  547 macrophage colony-stimulating factor in human gliomas with tumor progression. *Am J*548 *Pathol* 55: 1557-1567, 1999.
- 549 44. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity,
  550 inflammation and cancer. *Trends Mol Med* 14: 109-119, 2008.
- 45. Pang X, Letourneau R, Rozniecki JJ, Wang L, Theoharides TC. Definitive
   characterization of rat hypothalamic mast cells. *Neuroscience* 73: 889-902, 1996.

- 46. Peng S, Deng H, Yang J, Xie P, Li C, Li H, Feng D. Significance and relationship between
  infiltrating inflammatory cell and tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma tissues. *World J Gastroenterol* 11: 6521-6524, 2005.
- 47. Powell HC, Garrett RS, Brett FM, Chiang CS, Chen E, Masliah E, Campbell IL.
  Response of glia, mast cells and the blood brain barrier, in transgenic mice expressing
  interleukin-3 in astrocytes, an experimental model for CNS demyelination. *Brain Pathol* 9:
  219-235, 1999.
- 48. Price MM, Kapitonov D, Allegood J, Milstien S, Oskeritzian CA, Spiegel S. Sphingosine1-phosphate induces development of functionally mature chymase-expressing human mast
  cells from hematopoietic progenitors. *FASEB J* 23: 3506-3515, 2009.
- 49. Rajput AB, Turbin DA, Cheang M, Voduc DK, Leung S, Gelmon KA, Gilks C,
  Huntsman DG. Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable
  prognosis: a study of 4,444 cases. *Breast Cancer Res Treat* 107: 249-257, 2007.
- 566 50. Rubinchik E, Norris A, Levi-Schaffer F. Modulations of histamine release from mast cells
  567 by interleukin-2 is affected by nedocromil sodium. *Int J Immunopharmacol* 17: 563-570,
  568 1995.
- 569 51. Sharma MC, Ralte AM, Gaekwad S, Santosch V, Shankar SK, Sarkar C. Subependymal
   570 giant cell astrocytoma a clinicopathological study of 23 cases with special emphasis on
   571 histogenesis. *Pathol Oncol Res* 10: 219-224, 2004.
- 572 52. Sick E, Niederhoffer N, Takeda K, Landry Y, Gies JP. Activation of CD47 receptors
  573 causes histamine release from mast cells. *Cell Mol Life Sci* 66: 1271-1282, 2009.
- 574 53. Sick E, Brehin S, André P, Coupin G, Landry Y, Takeda K, Gies JP. Advanced glycation
  575 end products (AGEs) activate mast cells. *Br J Pharmacol* 161: 442-455, 2010.
- 576 54. Sick E, Boukhari A, Deramaudt T, Rondé P, Bucher B, André P, Gies JP, Takeda K.
  577 Activation of CD47 causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via
  578 an Akt-dependent pathway. *Glia* 59: 308-319, 2011.
- 579 55. Silver R, Silverman AJ, Vitkovic L, Lederhendler II. Mast cell in the brain: evidence and
  functional significance. *Trends Neurosci* 19: 25-31, 1996.
- 581 56. Sinnamon MJ, Carter KJ, Sims LP, Lafleur B, Fingleton B, Matrisian LM. A protective
   role of mast cells in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 29: 880-886, 2008.
- 583 57. Starkey JR, Crowle PK, Taubenberger S. Mast-cell-deficient W/W<sup>V</sup> mice exhibit
   584 decreased rate of tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 42: 48-52, 1988.
- 585 58. Stoyanov E, Uddin M, Mankuta D, Dubinett SM, Levi-Schaffer F. Mast cells and
  586 histamine enhance the proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*587 doi:10.1016/j.lungcan.2011.05.029, 2011.

- 588 59. Theoharides TC, Conti P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol*589 25: 235-241, 2004.
- 590 60. Theoharides TC. Mast cells and pancreatic cancer. *N Engl J Med* 358: 1860-1861, 2008.
- 591 61. Theoharides TC, Kempuraj D, Kourelis T, Manola A. Human mast cells stimulate
   592 activated T cells: implications for multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1144: 74-82, 2008.
- 593 62. Theoharides TC, Rozniecki JJ, Sahagian G, Jocobson S, Kempuraj D, Conti P,
  594 Kalogeromitros D. Impact of stress and mast cells on brain metastases. *J Neuroimmunol*595 205: 1-7, 2008.
- 596 63. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev* 597 *Pathol Mech Dis* 1: 119-150, 2006.
- 598 64. Tournilhac O, Santos DD, Xu L, Kutok J, Tai YT, Le Gouill S, Catley L, Hunter Z,
  599 Branagan AR, Boyce JA, Munshi N, Anderson KC, Treon SP. Mast cells in
  600 Waldenstrom's macroglobulinemia support lymphoplasmacytic cell growth through
  601 CD154/CD40 signaling. Ann Oncol 17: 1275-1282, 2006.
- 602 65. van Haaster CM, Derhaag JG, Engels W, Lemmens PJ, Gijsen AP, Hornstra G, van der
  603 Vusse GJ, Duijvestijn AM. Mast cell-mediated induction of ICAM-1, VCAM-1 and E604 selectin in endothelial cells in vitro: constitutive release of inducing mediators but no effect of
  605 degranulation. *Pflügers Arch* 435: 137-144, 1997.
- 606 66. Yamamoto T, Hartmann K, Eckes B, Krieg T. Mast cells enhance contraction of three607 dimensional collagen lattices by fibroblasts by cell-cell interaction: role of stem cell factor/c608 kit. *Immunology* 99: 435-439, 2000.

623		
624		
625		
626		

628 629

630 Figure 1. Effects of rat peritoneal mast cells (RPMC) on growth of U87 cells (A, B), CCF-STTG1 631 (C), U373 cells (D, E), SW1783 (F) and NHA (G) proliferation. Astrocytoma or astrocytes  $(1x10^5)$  were co-cultured in the presence of  $2.5x10^4$  RMPC (ratio RPMC/astrocytes 1/4) or in the 632 633 presence of  $5 \times 10^4$  RMPC (ratio 1/2). Mast cells were activated by compound 48/80 (1 µg/mL) or 634 left untreated. Proliferation was assessed by MTS (A, C, D, F, G) and by [<sup>3</sup>H]-thymidine 635 incorporation (B, E) after 24 h incubation at 37°C. Data are mean±sem of 5 independent 636 experiments (\*p<0.05). Compound 48/80-stimulated histamine exocytosis in RPMC (H). Cells 637 were pre-incubated for 5 min at 37°C and then stimulated with the indicated 48/80 concentrations 638 for 10 min at 37°C. Data are mean±sem of 4 independent experiments.

639

Figure 2. Effects of RMPC on growth of U87 cells (A) and U373 cells (B) when separated by a porous membrane (Transwell insert,  $0.4\mu$ m pore diameter). Mast cells were seeded in the insert and astrocytoma cells at the bottom of the well in ratios 1/4 or 1/2. Mast cells were activated by compound 48/80 (1 µg/mL) or left untreated. Proliferation was assessed by MTS after 24 h incubation at 37°C. Data are mean±sem of 4 independent experiments.

Figure 3. Effects of RMPC on cytokine secretion from U87, U373, CCF-STTG1 and SW1783 cells. Astrocytoma cells  $(1x10^5)$  were incubated with or without  $5x10^4$  RMPC for 24 h at 37°C. Cytokines from conditioned culture medium were assessed using an array assay with the human cytokine-specific mAbs shown in the table (Pos: positive control; Neg: negative control). Blots were quantified following manufacturer's instructions and represented for U87 and CCF-STTG1 cells. The data are representative of 3 independent experiments (\*p<0.05).

653

Figure 4. Effects of RPMC on IL-6 secretion from U87 and U373 cells. Astrocytoma  $(1x10^{5})$ were incubated with or without  $5x10^{4}$  RPMC for 24 h at 37°C. IL-6 levels from conditioned culture medium were quantified using an ELISA kit. Data are mean±sem of 3 independent experiments (\*p<0.05).

658

Figure 5. Effects of RPMC on migration of U87 cells (A) and U373 cells (B). Mast cells (ratio
 1/4 or 1/2) were plated at the bottom of the well and astrocytoma in the Transwell<sup>®</sup> insert having a
 membrane pore size of 8 μm. Mast cells were activated by compound 48/80 (1 μg/mL) or not.
 After 24 h incubation at 37°C, astrocytoma cells that migrated to the bottom well were quantified

- by MTS assay. Data are mean±sem of 3 independent experiments (\*p<0.05).
- 663

**Figure 6.** Effects of RMPC on secretion of MMPs and TIMPs from U87 and U373 cells. Astrocytoma cells  $(1x10^5)$  were incubated with or without  $5x10^4$  RMPC for 24 h at 37°C. Conditioned culture media were assessed using an array assay with the human MMP-specific and TIMP-specific mAbs shown in the table (Pos: positive control; Neg: negative control). Blots were quantified following manufacturer's instructions and represented for both cell lines. The data are representative of 3 independent experiments (\*p<0.05).

- 670
- 671
- 672
- 673
- 674





Figure 2.





Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	$GRO\alpha$	I-309	IL-1α	IL-1β
Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	$GRO\alpha$	1-309	IL-1α	IL-1β
Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	$GRO\alpha$	I-309	IL-1α	IL-1β
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IFN-γ
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IFN-γ
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1
$TNF-\alpha$	TNF-β	EGF	IGF-I	Angiogenin	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF	Leptin	Neg	Pos







Figure 5.









# Publication 2

# Rôle du récepteur CD47 dans les astrocytomes

# Publication n°2:

# Activation of CD47 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway

## **Objectifs de l'étude:**

Le récepteur CD47/IAP est la seule protéine clairement couplée aux protéines G qui n'appartient pas au groupe des récepteurs à 7 hélices ou RCPG. Les fonctions du récepteur CD47 dans les cellules cancéreuses sont controversées. En effet, l'activation du CD47 stimulerait l'adhérence et la propagation des cellules de mélanomes (Gao et al., 1996; Barazi et al., 2002), des cellules épithéliales de l'intestin (Broom et al., 2009), ainsi que la prolifération des cellules cancéreuses du sein (Congote et Temmel, 2004). Le récepteur CD47 jouerait également un rôle protecteur dans les cellules thyroïdiennes normales et cancéreuses lors de l'apoptose induite par les céramides ou les agents anti-cancéreux (Rath et al., 2006a ; 2006b). Le récepteur CD47 induirait au contraire l'apoptose des cellules de lymphomes B et des lymphomes T (Mateo et al., 1999 ; Manna et Frazier, 2003). Face à ces études contradictoires, l'objectif de la présente étude fut de déterminer le rôle du CD47 dans les tumeurs gliales.

Les objectifs de ce travail étaient d'une part d'étudier l'effet de l'activation du récepteur CD47 dans les astrocytomes et d'autre part de mettre en lumière des voies de signalisation intracellulaires impliquées.

## **Discussion et Perspectives:**

Dans cette étude nous montrons que l'activation du récepteur CD47/IAP par l'agoniste 4N1 induit la prolifération des astrocytomes des lignées U87 et U373. L'activation du CD47 n'a pas d'effet sur la prolifération des astrocytes normaux. Le taux d'expression du récepteur CD47 est similaire dans les trois lignées. Un anticorps bloquant dirigé contre le CD47 (B6H12) inhibe la prolifération des lignées U87 et U373 (non stimulées par l'agoniste 4N1) et est sans effet sur les astrocytes. Ce résultat suggère que le récepteur CD47 est constitutivement

activé dans les astrocytomes. Nous mettons en évidence un couplage original du CD47 avec la voie du dimère  $\beta\gamma$  des protéines G dans les astrocytomes et les astrocytes. L'activation du récepteur CD47 implique les protéines PI3K/Akt dans les astrocytomes. Cette voie n'est pas activée dans les astrocytes normaux et serait responsable de l'effet prolifératif du CD47 dans les cellules tumorales étudiées. Dans la littérature, très peu d'études comparent les taux d'expression du récepteur CD47 entre des cellules du statut normal versus cancéreux. Nos résultats indiquent qu'il n'y aurait pas de différence d'expression entre les astrocytes normaux et les astrocytomes. La signalisation intracellulaire du CD47 ainsi que l'intervention de protéines régulatrices serait donc déterminantes dans l'effet fonctionnel du CD47 selon le type cellulaire et/ou son statut cancéreux ou normal. L'intervention de PLIC-1, régulateur des protéines G récemment décrit, est une possibilité à envisager dans les astrocytes normaux. D'autre part, l'activation de ce récepteur largement impliqué dans l'adhérence cellulaire via son couplage aux intégrines pourrait avoir une issue différente sur des cellules adhérentes par rapport aux cellules classiquement circulantes (lymphocytes, par exemple). Cette question intéressante pourrait être étudiée en forçant l'adhérence des lymphocytes et en les plaçant dans un contexte proche de la situation physiologique de la diapédèse.

GLIA 59:308-319 (2011)



# Activation of CD47 Receptors Causes Proliferation of Human Astrocytoma but Not Normal Astrocytes via an Akt-Dependent Pathway

EMILIE SICK,<sup>1,2\*</sup> ABDELAZIZ BOUKHARI,<sup>1,2</sup> THÉRÈSE DERAMAUDT,<sup>1,2</sup> PHILIPPE RONDÉ,<sup>1,2</sup> BERNARD BUCHER,<sup>1,2</sup> PHILIPPE ANDRÉ,<sup>1,2</sup> JEAN-PIERRE GIES,<sup>1,2</sup> AND KENNETH TAKEDA<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 rte du Rhin, Illkirch, France <sup>2</sup>CNRS, UMR 7213, Pharmacologie et Biophotonique, 74 rte du Rhin, Illkirch, France

#### KEY WORDS

*HLIA* 

astrocytic glioma; integrin-associated protein; G-protein; PLIC-1

#### ABSTRACT

CD47 is a membrane receptor that plays pivotal roles in many pathophysiological processes, including infection, inflammation, cell spreading, proliferation, and apoptosis. We show that activation of CD47 increases proliferation of human U87 and U373 astrocytoma cells but not normal astrocytes. CD47 function-blocking antibodies inhibit proliferation of untreated U87 and U373 cells but not normal astrocytes, suggesting that CD47 may be constitutively activated in astrocytoma. CD47 expression levels were similar in our three cell types. CD47 couples to G-proteins in astrocytes and astrocytoma and especially to the GBy dimer. Downstream signaling following CD47 activation involves GBy dimer-dependent activation of the PI3K/Akt pathway in astrocytoma cells but not in normal astrocytes. This pathway is known to be deregulated in astrocytoma, leading to cell proliferation and enhanced survival signals. Putative PLIC-1 interaction with CD47 in astrocytoma cells but not astrocytes may contribute to the proliferative effect observed upon activation of CD47. Our data indicate that CD47 receptors have a stimulatory role in cell proliferation and demonstrate for the first time that CD47 signals via the PI3K/Akt pathway in cancerous cells but not normal cells. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

## INTRODUCTION

CD47 is a ubiquitous 50-kDa membrane receptor that belongs to the immunoglobulin superfamily. This receptor was also termed IAP (integrin-associated protein) because it co-purifies and interacts with integrins. To date,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha \nu \beta 3$ , and  $\alpha IIb\beta 3$  integrins have been shown to associate with CD47 (Brown and Frazier, 2001; Chung et al., 1997; Gao et al., 1996; Lindberg et al., 1993). CD47 has a single IgV-like domain that is responsible for its association with integrins, five membranespanning segments and a short cytoplasmic C-terminal tail (Brown and Frazier, 2001).

CD47 is implicated in many physiopathological processes. CD47 mediates cell-to-cell communication and bidirectional signaling by interacting with the signal regulatory protein (SIRP) family. SIRPs are transmembrane proteins that contain three immunoglobulin-like

©2010 Wiley-Liss, Inc.

domains in their extracellular region and putative tyrosine phosphorylation sites in their cytoplasmic regions. Among the three members of the SIRP family, only SIRP $\alpha$  and SIRP $\gamma$  are ligands for CD47 whereas a natural ligand for SIRP $\beta$ 1 remains unknown (Matozaki et al., 2009). The best characterized function of the CD47-SIRP $\alpha$  signaling complex *in vivo* is the prevention of phagocytosis of red blood cells or platelets by macrophages (Oldenborg et al., 2000; Yamao et al., 2002). SIRP $\alpha$ , through its interaction with CD47, was also shown to regulate the immune system (Alblas et al., 2005; Latour et al., 2001; Piccio et al., 2005) and central nervous system functions (Lee et al., 2000; Miyashita et al., 2004; Murata et al., 2006).

CD47 also mediates cell-extracellular matrix interactions via thrombospondins (TSPs). TSP-1, the prototypic member of this family is a major component of platelet a-granules released upon platelet activation and is also a cell adhesion molecule (Adams and Lawler, 2004). CD47 ligation by TSP-1 was shown to mediate various biological effects including vascular smooth muscle cell proliferation and migration (Lymn et al., 2002), inhibition of NO-driven vascular responses (Isenberg et al., 2008), platelet activation and spreading (Chung et al., 1997), infection (Lindberg et al., 1996) and inflammation (Armant et al., 1999; Hermann et al., 1999). The role of CD47 on cancerous cells remains controversial. Indeed, CD47 activation stimulates adhesion and spreading of melanoma cells (Barazi et al., 2002; Gao et al., 1996) and intestinal epithelial cells (Broom et al., 2009), as well as proliferation of breast cancer cells (Congote and Temmel, 2004). In contrast, CD47 was shown to induce the apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells (Mateo et al., 1999) and T cells by caspase-independent mechanisms (Manna and Frazier, 2003).

Given that CD47 may influence the proliferation of various cell types, our objective in the present study was

Received 16 November 2009; Accepted 1 October 2010

DOI 10.1002/glia.21102

Published online 1 December 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary. com).

Grant sponsors: CNRS, Ligue Contre le Cancer (to J.P.G. from the Comité du Haut-Rhin), and Ministère de la Recherche (fellowship to E.S.).

<sup>\*</sup>Correspondence to: E. Sick, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213-Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, 74 rte du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch, France. E-mail: esick@pharma.u-strasbg.fr

to analyze the effect of CD47 activation on astrocytoma cells, which represent the most frequent and morbid brain cancer type. Here, we show for the first time that activation of CD47 with peptide 4N1 stimulated the proliferation of U87 and U373 cells but not normal human astrocytes (NHA), CD47 function-blocking monoclonal antibodies (mAbs) induced the inhibition of astrocytoma cell proliferation but not normal human astrocytes. This decreased cell growth was neither associated with cell death nor senescence. CD47 expression level was similar between the three cell types but its intracellular signaling was different. Our results indicate that CD47 is functionally coupled to heterotrimeric G proteins, especially to the  $G\beta\gamma$  dimer. CD47-mediated proliferation was dependent on PI3K/Akt activation in astrocytoma cells whereas this pathway was not activated in normal astrocytes.

## MATERIALS AND METHODS Antibodies and Reagents

Peptides 4N1 (RFYVVMWK) and 4NGG (RFYGGMWK) were from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Peptides 4N1 and 4NGG were also synthesized in the lab by Dr. H. de Rocquigny, and were verified by mass spectroscopy. Mouse IgG, secondary horseradish peroxidaseconjugated antibodies, anti-integrin  $\beta$ 1, anti-integrin  $\beta$ 3, anti-G $\alpha$ s, anti-G $\alpha$ i, anti-G $\alpha$ q, anti-G $\beta$ γ, anti-phospho Akt (Ser<sup>473</sup>), anti-Akt, and anti-actin monoclonal antibodies (mAb) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The PLIC-1 antibody was from Abgent (San Diego, CA). The anti-CD47 B6H12 mAb was from BD Biosciences (San Diego, CA). The anti-CD47 2D3 mAb and Fura-2/AM were from Calbiochem (San Diego, CA). All other reagents were from Sigma (St. Louis, MO).

## **Cell Lines and Culture Conditions**

Human U87 astrocytoma (ATCC, Rockville, IN), U373 astrocytoma (ECACC, Salisbury, UK) and normal human astrocytes (Lonza, Basel, Switzerland) were maintained in EMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/mL gentamycin, 100 UI/mL penicillin, and 50  $\mu$ g/mL streptomycin. Human SW1783 astrocytoma (ATCC) and CCF-STTG1 astrocytoma (ATCC) were maintained in Leibovitz medium L-15 and RPMI 1640, respectively, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/mL gentamycin, 100 UI/mL penicillin and 50  $\mu$ g/mL streptomycin.

Culture medium and supplies were from Lonza. Primary normal human astrocytes were used for experiments between the first and the fourth passage. Cells were grown at  $37^{\circ}$ C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air.

# Cell Proliferation Assessed by [<sup>3</sup>H]-Thymidine Incorporation

Cells  $(1 \times 10^5)$  were plated in 24-well plates in EMEM supplemented with 1% FBS. After 24 h incubation, the medium was discarded and cells were treated with 4N1, 4NGG, or the anti-CD47 mAbs in a final volume of 1 mL serum-free EMEM and incubated for 24 and 48 h at 37°C. [<sup>3</sup>H]-thymidine (0.5 µCi/well) was added for the last 6 h incubation. The medium was then discarded and the cell layer was rinsed twice with ice cold PBS. Then 10% TCA was then added for 10 min on ice, discarded, and fresh TCA was incubated for 10 min at room temperature. TCA-insoluble material was then incubated with 1 N NaOH. Plates were allowed to stand overnight at room temperature. Samples were then neutralised with 2 N HCl, added to scintillation liquid and the tritium content was determined by scintillation counting. In order to ensure that the [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation was related to cell proliferation and not with multinucleation that can occur with cancerous cells, results were confirmed at least three times by using a blinded manual counting of the cells stained with 0.2% Trypan blue.

#### **Evaluation of Apoptosis**

Cells (7.5  $\times$  10<sup>5</sup> cells per well) were seeded in IBIDI LabTek dishes (Nunc, Wiesbaden, Germany) in EMEM supplemented with 1% FBS. After 24 h, cells were treated in serum-free medium for 24 and 48 h at 37°C. As previously described (Shynkar et al., 2007), apoptosis was detected using the novel ratiometric fluorescent probe F2N12S that was synthesized in the lab by Dr. A.S. Klymchenko. Briefly, a freshly prepared solution of F2N12S in HBSS was added to the cells to a final concentration of 0.1  $\mu M$  (<0.1% DMSO volume) and incubated for 7 min at room temperature in the dark. Two-photon fluorescence microscopy experiments were performed on a home built two-photon laser scanning set-up based on an Olympus  $1 \times 70$  inverted microscope with an Olympus 60x 1.2NA water immersion objective. Two-photon excitation was provided by a titanium-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) and photons were detected with Avalanche photodiodes (APD; SPCM-AQR-14-FC, Perkin Elmer) connected to a counter/timer PCI board (PCI6602, National Instrument). Imaging was carried out using two fast galvo mirrors in the descanned fluorescence collection mode. Typical acquisition time was 5 s with an excitation power around 2.5 mW (830 nm) at the level of the sample. Images corresponding to normal (N\*) and tautomer (T\*) forms

Abbreviations

IAP integrin-associated protein mAb monoclonal antibody TCA trichloroacetic acid.

of the dye emission bands were recorded simultaneously using a dichroic mirror (Beamsplitter 550 DCXR) and two band-pass filters (Brightline HC 520/20 and HQ 585/40) in front of the APDs. The images were processed using a home-made program under Labview that generates a ratiometric image by dividing the image of the N\* band by that of the T\* band. For each pixel, a pseudocolour scale is used for coding the ratio, while the intensity is defined by the integral intensity recorded for both channels at the corresponding pixel (Oncul et al., 2010).

## **Detection of Autophagy**

Cells  $(1 \times 10^5)$  were seeded on polylysine-coated glass coverslips placed in 24-well plates in EMEM supplemented with 1% FBS. After 24 h, cells were treated in serum-free medium for 24 and 48 h at 37°C. Acridine orange was then added for 15 min at a final concentration of 1 µg/mL and the presence of acidic vesicles (Paglin et al., 2001) in unfixed cells was immediately evaluated using an epifluorescence microscope (Nikon Diaphot). Since cells might be shed from the culture surface, both adherent cells and cells contained in culture supernatants were systematically evaluated.

## **Detection of Senescence**

Cells  $(7.5 \times 10^5)$  were seeded in 6-well plates in EMEM supplemented with 1% FBS. After 24 h, cells were treated in serum-free medium for 24 and 48 h at 37°C.  $\beta$ -galactosidase activity (Dimri et al., 1995) was measured using the Senescence Cell Histochemical Staining Kit (Sigma). Plates were then observed using an inverted microscope. Since cells might be shed from the culture surface, both adherent cells and cells contained in culture supernatants were systematically evaluated.

## **Measurement of Intracellular Calcium**

Intracellular calcium was measured from Fura-2-loaded astrocytoma cell suspensions using a spectrofluorimeter (Hitachi F-2000) essentially as previously described (Kassel et al., 1995; Lynch et al., 1994). Briefly, astrocytoma cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were incubated with 1  $\mu$ M Fura-2/AM for 45 min at room temperature in HEPES buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, 10 mM HEPES, and NaOH to pH 7.4). Cells were then washed twice in HEPES buffer and resuspended in the same buffer at  $1 \times 10^6$  cells/mL in a 1 cm quartz cuvette. Cells were continuously stirred and sequentially excited at 340 and 380 nm for 1 s period at room temperature. Emitted fluorescence was measured at 510 nm.

### Measurement of cAMP Levels

Cells  $(1 \times 10^5)$  were grown in 24-well plates in EMEM supplemented with 1% FBS for 24 h. CD47 receptor cou-

pling to adenylyl cyclase was assessed by measuring cAMP levels from 4N1- and/or forskolin-stimulated cells  $(5.10^{-5} \text{ and/or } 1.10^{-6} \text{ M}, \text{ respectively})$  using radioimmunoassay as previously described (Lynch et al., 1994; Ouedraogo et al., 2008).

### **RNA Extraction and RT-PCR**

Total RNA was extracted from cells with PureZOL<sup>TM</sup> reagent (BioRad) according to manufacturer's recommendations. Reverse transcription was done using 500 ng total RNA with the SuperScript<sup>TM</sup>III First-strand synthesis system (Invitrogen, Paisley, UK) according to manufacturer's protocol. Amplification was assessed using 1 µL RT products in a mixture containing 200 µM of each dNTP, 0.5  $\mu$ M oligonucleotide primer, 1  $\times$  Phusion HF buffer, and 0.02 U/µL Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). PCR primers 5'-TGAAG GTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' (forward) and 5'-CAT GTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (reverse) were used to detect GAPDH mRNA. PCR primers 5'-CCTATATCC TCGCTGTGGTT-3' (forward) and 5'-ACTTTTCTTGTTT CTTCTCC-3' (reverse) were used to detect CD47 mRNA. Cycling parameters were: 98°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s for 30 cycles, followed by a final elongation at 72°C for 5 min. PCR products were run on 2% agarose gels stained with 1 µg/mL ethidium bromide. As a negative control, cDNA was omitted from the reaction mixture, with no observed amplified band. This ensures that no exogenous contamination was present in our experiments. Image J software (NIH freeware) was used for densitometry analysis. For NHA, PCR data were similar over passages 1 to 4.

## Immunoprecipitation

Cells were grown on 75 cm<sup>2</sup> flasks in EMEM supplemented with 10% FBS for 3 days to 80% to 90% confluence. Culture medium was discarded, cells were rinsed twice with PBS, and stimulated with 4N1 (50 µM) in PBS for 10 min at 37°C. Cells were then lysed in a lysis buffer containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Triton X-100, 10 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM sodium pyrophosphate, and Halt<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), pH 8. Cells were incubated on ice for 30 min and lysates were centrifuged at 14,000g for 10 min at 4°C. Supernatants were then incubated on a rotator with 1.5 µg/mL of the anti-CD47 (B6H12) or control IgG antibodies for 3 h at room temperature in the presence of Sepharose beads. Protein G (GE Healthcare, Waukesha, WI) was then added and the lysates were incubated overnight at 4°C under agitation. After three washes with ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, pH 7.5), immunoprecipitated CD47-containing protein complexes were separated from beads by boiling for 5 min in Laemmli sample buffer (BioRad, Hercules, CA) supplemented with

CD47-MEDIATED PROLIFERATION OF ASTROCYTOMA



Fig. 1. Effects of CD47 function-blocking mAbs (2D3, B6H12) on proliferation of untreated human astrocytoma U87 cells (A), U373 cells (B), SW1783 cells (C), CCF-STTG1 cells (D), and normal human astrocytes (NHA) (E). Astrocytes and astrocytoma were incubated with the indicated compounds for 48 h at  $37^{\circ}$ C. Proliferation was then assessed

50 mM DTT. Beads were eliminated by centrifugation and supernatants were analyzed by Western blotting using a panel of mAbs. For IP experiments with NHA, the results obtained were not different for passages 1 to 4.

#### Western Blotting

Cells were grown in 6-well plates to 80% confluency and treated in serum-free EMEM. The medium was then aspirated and cells were rinsed twice with ice-cold PBS. Cells were then lysed with and scraped loose into ice-cold lysis buffer (M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce Biotechnology). After centrifugation at 14,000g for 10 min at 4°C, supernatants were boiled for 5 min in Laemmli sample buffer supplemented with 50 mM DTT. Equal amounts of lysed and boiled protein (30 µg/well) were loaded and subjected to electrophoresis on 10% polyacrylamide gels (BioRad). Separated proteins were electrophoretically transferred to PVDF membranes (GE Healthcare), which were then blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat dried milk (BioRad). Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody. Concentrations were chosen according to the manufacturer's instructions. Secondary horseradish peroxydase-conjugated antibody was incubated for 1 h at room temperature and proteins were detected using an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare). Image J software (NIH freeware) was used for densitometric analysis. Again, for NHA, Western blot data were not different over passages 1 to 4.

by <sup>3</sup>[H]-thymidine incorporation. Data are mean  $\pm$  SEM of four independent experiments (\*P < 0.05). (F) U87 cells were incubated with 2D3 or B6H12 (both at 2 µg/mL) for 48 h at 37°C. Cell viability was then assessed by Trypan blue staining. Data are mean  $\pm$  SEM of thre independent experiments (\*P < 0.05).

#### **Statistical Analysis**

Results are presented as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was done using ANOVA. Significant differences are represented throughout as \*P < 0.05.

#### RESULTS Function-Blocking CD47 Antibodies Inhibit Astrocytoma Cell Proliferation

The effects of 2D3 and B6H12, two well-characterized CD47 function-blocking monoclonal antibodies (mAbs; Barazi et al., 2002; Lymn et al., 2002; Rebres et al., 2001, 2005), were assessed on proliferation of human astrocytoma and normal human astrocytes using <sup>3</sup>[H]-thymidine incorporation. As illustrated in Fig. 1A, U87 cell proliferation was inhibited by 50% by 2D3 and B6H12 at 2 µg/mL. The maximal effect was obtained after 48 h and a higher mAb concentration (20 µg/mL) did not induce greater inhibition of proliferation (not shown). Similarly, U373 cell proliferation was signifi-cantly reduced by 25% by both CD47 function-blocking mAbs at 2 µg/mL (Fig. 1B) and no greater inhibition was observed at 20 µg/mL (not shown). We found that SW1783 and CCF-STTG1 cell proliferation was significantly inhibited by 80% and 60%, respectively by 2D3 and B6H12 at 2 µg/mL (Fig. 1C,D). In contrast, proliferation of normal human astrocytes (NHA) was affected neither by 2D3 nor B6H12 (Fig. 1E). To confirm that decreases in cell proliferation were not due to increased

GLIA
SICK ET AL.



Fig. 2. Ratiometric images (emitted fluorescence pseudo-coloured; 520/580 nm) of U373 cells stained with F2N12S, a novel fluorescent probe, using 2-photon excitation at 830 nm. Untreated cells (A). Cells after treatment with actinomycin D (B), 2D3 mAb (C), and BGH12 mAb (D) (all at 2 µg/mL) for 48 h at 37°C. Images are representative of three independent experiments.

necrotic cell death, manual counting of Trypan bluestained cells was done. As illustrated in Fig. 1F, the number of living U87 cells was decreased by about 50% by 2D3 and B6H12 at 2  $\mu$ g/mL, while the number of dead cells (Trypan blue positive cells) was unchanged after treatment by CD47-blocking mAbs for 24 or 48 h compared to untreated cells. Similar data were also obtained for U373 cells (not shown). Together, these data are consistent with CD47 receptors constitutively contributing to proliferation of astrocytoma cells but not NHA.

We tested whether the CD47 mAb-induced inhibition of cell proliferation assessed by <sup>3</sup>[H]-thymidine incorporation was correlated to apoptotic cell death. Apoptosis was evaluated using F2N12S, a novel ratiometric fluorescent probe that was developed and characterized in our lab. This probe belongs to the family of 3-hydroxyflavones (3HFs) and exhibits dual emission bands due to its excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) reaction, which is highly sensitive to the membrane environment (Klymchenko et al., 2002). Thus, the ratio of the emission bands of 3HFs is a valuable analytical signal for probing biological membranes (for review, Demchenko et al., 2009). The probe F2N12S binds spontaneously to the outer leaflet of the plasma membrane without fast transfer to the inner leaflet and internalization into the cell. This makes F2N12S sensitive to the changes in the transmembrane lipid asymmetry that occurs during apoptosis (Shynkar et al., 2007). Fluorescent ratiometric imaging was performed by recording two images simultaneously at 520 nm and 580 nm with a two-photon fluorescence microscope. Apoptosis was not detected in U373 cells after 24 and 48 h treatment by 2D3 (Fig. 2C) or B6H12 mAbs (Fig. 2D), since the pseudo-colours corresponding to the 520/580 nm intensity ratio were unchanged compared with control cells (Fig. 2A). As a positive control, apoptosis was induced in U373 cells using actinomycin D at 2 µg/mL (Narita

GLIA

et al., 2000; Shynkar et al., 2007). We observed an obvious modification in the emission pseudo-colour (increase in green) at the cell membrane of actinomycin D-treated astrocytoma (Fig. 2B), corresponding to an increase in the 520/580 nm intensity ratio that is characteristic of apoptosis (Shynkar et al., 2007). Moreover, actinomycin D-treated cells exhibit a rounded shape whereas CD47 mAb-treated cells were elongated, having the same morphology as untreated cells. Similar results were obtained with U87 cells (not shown).

No formation of acidic vesicular organelles in the cytoplasm, a feature characteristic of autophagic cell death, was observed in astrocytoma treated with 2D3 or B6H12 for 24 or 48 h after vital staining of cells with acridine orange (not shown). Since inhibition of proliferation may also reflect cellular senescence, putative increases in  $\beta$ -galactosidase activity in U87 and U373 cells treated with 2D3 or B6H12 were evaluated. The percentage of senescent astrocytoma cells was close to 5%, both in control cells and after mAb treatment for 24 or 48 h (not shown). Our results thus indicate that CD47 function-blocking mAbs that decrease astrocytoma proliferation do not induce cell death (by necrosis, apoptosis, autophagy, or senescence).

#### Activation of CD47 Receptors Induces Proliferation of Astrocytoma but Not Normal Human Astrocytes

After 48 h treatment with peptide 4N1, a widely used CD47 agonist derived from the C-terminal domain of TSP-1, (Dorahy et al., 1997; Gao and Frazier, 1994; Gao et al., 1996; Kosfeld and Frazier, 1992), proliferation of U87 cells increased in a concentration-dependent manner (Fig. 3A). A maximal twofold increase in proliferation was reached at 100  $\mu$ M. Concentrations of 4N1 used were in the same range as previously described (Manna and Frazier, 2003; Rath et al., 2006a,b) and

CD47-MEDIATED PROLIFERATION OF ASTROCYTOMA



Fig. 3. Effects of CD47-activating peptide 4N1 and control peptide 4NGG on U87 cells (A), U373 cells (B), and NHA (C). Astrocytes and astrocytoma were incubated with the indicated compounds for 48 h at 37°C. Proliferation was then assessed by <sup>3</sup>[H]-thymidine incorporation. Data are mean  $\pm$  SEM of four independent experiments (\*P < 0.05).

greater concentrations were not used because of lack of peptide solubility. Alone, peptide 4NGG that serves as negative control peptide (Gao et al., 1996; Manna and Frazier, 2003) had no effect on U87 cell proliferation. Proliferation of U373 cells was also dose-dependently increased in the presence of 4N1, with a maximal effect similar to that obtained for U87 cells (Fig. 3B). Again, 4NGG alone was without effect on U373 cell proliferation. In contrast, proliferation of normal human astrocytes was unaffected in the presence of peptides 4N1 and 4NGG (Fig. 3C). <sup>3</sup>[H]-thymidine incorporation results were confirmed by manual counting of cells stained with Trypan blue: proliferation of U87 and U373 cells was doubled after 48 h treatment with 100 µM 4N1. Thus, activation of CD47 receptors enhances proliferation of astrocytoma but not normal astrocytes.

#### CD47 Coupling to G-proteins in Astrocytes and Astrocytoma

Several CD47-mediated functions have been shown to depend of coupling of this receptor to G-proteins (Brown and Frazier, 2001). In our attempt to identify CD47induced signals responsible for proliferating of astrocy-toma cells, we thus evaluated intracellular  $Ca^{2+}$ mobilization and cAMP levels, two major G-proteindependent signaling events. Upon challenge with 100 µM 4N1, no increases in intracellular Ca2+ were observed in U87 or U373 cells (Fig. 4A,B), nor in NHA (not shown). This suggests that CD47 receptors are not coupled to  $G\alpha q$  in these cells. Histamine  $(1 \times 10^{-4} \text{ M})$  was used as a positive control because it was previously shown to induce intracellular Ca2+ increases in U373 cells (Young et al., 1998). No significant changes in cAMP levels were measured in the three cell types treated with 50 µM 4N1 (Fig. 4C), suggesting that CD47 does not couple to  $\mbox{G}\alpha s$  in astrocytoma or astrocytes. Furthermore, the increased cAMP levels in forskolin-treated cells (1  $\times$  10<sup>-6</sup> M) were unaffected by 50  $\mu$ M 4N1, suggesting that CD47 receptors do not couple to Gai (Fig. 4C).

U87 and U373 cells were previously shown to express similar levels of CD47 (Chen et al., 2004). While CD47 is thought to be ubiquitously expressed (Brown and Frazier,

2001), its presence in astrocytes has not been previously reported. By RT-PCR, mRNA for CD47 was detected in U87, U373, and NHA at levels that were not different for the three cell types (Fig. 5A). Western blots were also done to confirm expression of CD47 receptors at the protein level in our cells (Fig. 5B). Whereas U87 and NHA expressed similar levels of CD47, we observed a slight but significant decrease of CD47 expression in U373 cells at the protein level. These results may explain, at least in part, why U373 cells are slightly less sensitive to CD47 activation or inhibition, compared to U87 cells (Figs. 1 and 3). However, these observations cannot explain the differences observed after the activation of CD47 in astrocytes compared with astrocytoma. The absence of Ca<sup>2</sup> mobilization and modulation of cAMP levels upon activation of CD47 is puzzling since several CD47-mediated effects have been reported to depend on coupling to Gai (Frazier et al., 1999; Manna and Frazier, 2003; N'Diaye and Brown, 2003). We therefore assessed CD47 receptor coupling to G-proteins in our cells by immunoprecipitation. In U87 cells, CD47 was strongly coupled to the  $\beta\gamma$ dimer of G-proteins (Fig. 6A). No differences were observed for cells treated or not with 4N1. This result is consistent with the effects of anti-CD47 function-blocking mAbs described above and thus with CD47 being constitutively activated. CD47 coupling to Gai and Gaq was absent and negligible for Gas, consistent with the lack of CD47-depedent Ca<sup>2+</sup> mobilization and modulation of cAMP levels. In U373 cells, CD47 coupling to Gaq was observed, and to a lesser extent, also to  $G\beta\gamma$  (Fig. 6B). Again, no differences were found in U373 cells treated or not with 4N1, indicating that CD47 constitutively couples to these G-protein subunits. In normal astrocytes, CD47 couples to Gas, to Gaq and to the GBy dimer (Fig. 6C). According to these results, CD47 is apparently coupled to Gaq in U373 cells and NHA and to  $G\beta\gamma$  in all three cell types. However, 4N1 challenge did not result in mobilization of Ca<sup>2+</sup> in U373 cells and astrocytes.

In an attempt to resolve these puzzling results, the presence of the recently described CD47-associated protein PLIC-1 ("protein linking IAP to the cytoskeleton") was verified in astrocytoma cells. PLIC-1, a ubiquitinrelated protein, was shown to functionally couple to the cytoplasmic tail of CD47 where it directly interacts with

GLIA



Fig. 4. Effects of 4N1 on intracellular Ca<sup>2+</sup> and cAMP levels. Changes in emitted fluorescence from Fura-2-loaded U87 cells (A) and U373 cells (B) upon stimulation (arrow) with 4N1 ( $1 \times 10^{-4}$  M) or histamine ( $1 \times 10^{-4}$  M). Traces are representative from three independent.

ent experiments. (C) Cells were incubated with 4N1 (5  $\times$  10<sup>-5</sup> M) and/ or forskolin (1  $\times$  10<sup>-6</sup> M) or left untreated. cAMP levels were measured after 20 min by radioimmunoassay. Data are mean  $\pm$  SEM of seven independent experiments.

Gβγ and thereby inhibits Gαi- and Gαq-signaling (NDiaye and Brown, 2003). We found that PLIC-1 was expressed in U87 cells, in U373 cells, as well as in NHA. Interestingly, it was only immunoprecipitated with CD47 in U87 and U373 cells (Fig. 6). This may then explain why activation of CD47 receptors by 4N1 does not result in Ca<sup>2+</sup> mobilization in U373 cells, since PLIC-1 interaction with CD47 and Gβγ would lead to inhibition of Gαq. Similarly, the lack of effect of 4N1 stimulation on cAMP

levels might be also related to putative PLIC-1-dependent inhibition of Gai- and Gas-associated signaling.

#### CD47 Activation Stimulates Astrocytoma Proliferation via an Akt-Dependent Pathway

Since the signals for increased proliferation produced by activation of CD47 are not related to changes in

314

GLIA

intracellular Ca<sup>2+</sup> or cAMP levels, we assessed whether phosphorylation of Akt was affected. In glioma, Akt has been well characterized as a kinase responsible for enhancing proliferation (Nakamura et al., 2008). Upon treatment with 4N1 ( $5 \times 10^{-5}$  M), a time-dependent increase in phosphorylation of Akt was observed in U87 and U373 cells (Fig. 7A,B), with a maximal effect being obtained after 5 to 10 min. In untreated U87 and U373 cells, a weak phosphorylation of Akt was detected. In contrast, no detectable phosphorylation of Akt was found in normal astrocytes after 10 min treatment with 4N1 (Fig. 7C). Also, Akt was not basally phosphorylated in



Fig. 5. CD47 mRNA expression assessed by PCR in NHA, U87, and U373 cells (A, left panel; data are representative of three independent experiments). mRNA expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with NHA (A, right panel; data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. CD47 protein expression assessed by Western blotting in NHA, U87, and U373 cells (B, left panel; data are representative of three independent experiments). CD47 protein levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with NHA (B, right panel; data are mean  $\pm$  SEM of three independent; \*P < 0.05).

NHA, unlike in astrocytoma. The CD47-dependent phosphorylation Akt was inhibited by wortmannin, a PI3K inhibitor, in U373 cells (Fig. 7D) and also in U87 cells (not shown). Akt phosphorylation levels were unaffected when cells were pretreated with chelerythrine, a PKC inhibitor and rapamycin, a mTOR inhibitor. Wortmannin also inhibited the basal phosphorylation of Akt in untreated U87 and U373 cells, as previously described for U373 cells (He et al., 2007).

#### DISCUSSION 7

In this study, we sought to clarify the role of CD47 in astrocytes and astrocytoma. Our data demonstrate for the first time to our knowledge that the activation of CD47 by its agonist 4N1 stimulates proliferation of human astrocytoma cells but not normal human astrocytes. Moreover, function-blocking anti-CD47 mAbs inhibit proliferation of untreated astrocytoma cells but not normal astrocytes, indicating that CD47 may be constitutively activated in astrocytoma cells. These results are consistent with previous studies describing the expression of endogenous ligands for CD47 like SIRPa and TSPs in astrocytoma (Chen et al., 2004; Kawataki et al., 2000). In normal brain tissues, TSP-1 is not expressed or at only very low levels, whereas glioblastoma express high levels of TSP-1 that were correlated with malignancy (Kawataki et al., 2000).

The published effects of CD47-induced cell proliferation are controversial. Indeed, CD47 has been described to either promote cell growth or on the contrary, to induce apoptosis. For example, in the central nervous system, forced expression of CD47 in cultured neurons promotes neurite formation and branching and the binding of SIRP $\alpha$  to CD47 promotes formation of filopodia and spines in cultured neurons (Miyashita et al., 2004; Murata et al., 2006). CD47 ligation by TSP-1 or 4N1



Fig. 6. Expression and association of CD47 with G-protein subunits and PLIC-1. Whole cell lysates from U87 cells (A), U373 cells (B), and NHA (C) were analyzed by Western blotting (WB). Immunoprecipitation (IP) was done with the anti-CD47 mAb B6H12. Blots are representative of three independent experiments.

316



Fig. 7. Time-dependent effects of 4N1 stimulation on Akt phosphorylation levels in U87 cells (A) and U373 cells (B). Cells were incubated with 4N1 (5 × 10<sup>-5</sup> M) at 37°C for the indicated times and whole cell lysates were analyzed by Western blotting using mAbs against Akt and phosphorylated Akt (P-Akt); blots are representative of four independent experiments. Data were quantified by densitometry (bottom panels; mean  $\pm$  SEM, n = 4; \*P < 0.05). (C) Absence of P-Akt in NHA

stimulated or not with 4N1 (5 × 10<sup>-5</sup> M) for 10 min at 37°C. (D) U373 cells were pretreated or not with chelerythrine (2 × 10<sup>-6</sup> M), rapamycin (5 × 10<sup>-9</sup> M), or wortmannin (3 × 10<sup>-8</sup> M) for 30 min at 37°C. Cells were then challenged with 4N1 (5 × 10<sup>-5</sup> M) for 10 min at 37°C or left untreated and whole lysates were analyzed by Western blotting. Blots are representative of three independent experiments.

was also shown to mediate vascular smooth muscle cell proliferation and migration (Lymn et al., 2002). Moreover, CD47 activation stimulates adhesion and spreading of melanoma cells (Barazi et al., 2002; Gao et al., 1996) and intestinal epithelial cells (Broom et al., 2009), as well as proliferation of breast cancer cells (Congote and Temmel, 2004). CD47 activation by TSP-1 or 4N1 also protects normal and cancerous thyroid cells from ceramide-induced apoptosis and from camptothecin- and doxorubicin-induced apoptosis (Rath et al., 2006a,b). In contrast, CD47 was found to induce apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells (Mateo et al., 1999) and T cells by caspase-independent processes (Manna and Frazier, 2003). Here, we show that the activation of CD47 enhances proliferation of astrocytoma. Taken together, our data and those published in the literature suggest that the role of CD47 in cell growth may be different according to the cellular lineage. Moreover, CD47 is a major receptor implicated in cellular adhesion by its cooperation with integrins (Brown and Frazier, 2001). Thus, the effects of CD47 may also differ according to the circulating or adherent status of the cell.

Only few data are available concerning the expression of CD47 in cancerous cells compared with normal cells. CD47 and TSPs expression levels were shown to increase with the progression states of multiple myeloma (Rendtlew-Danielsen et al., 2007). CD47 is also upregulated in myeloid leukaemias and is thought to increase pathogenicity by allowing escape from phagocytosis mediated by SIRP $\alpha$ -CD47 interactions (Jaiswal et al., 2009). However, neoplastic mast cells express CD47 at levels not different compared with normal mast cells (Florian et al., 2005). In the present study, we also observed no significant differences in CD47 expression levels between normal astrocytes and astrocytoma. Thus, in our case, differences in CD47 signaling pathways would appear to be determinant for the outcome of its activation.

Based on its modulatory interactions with several types of integrins, it has been proposed that CD47 and integrins form a complex having seven transmembrane helices that mimics G-protein-coupled receptors (Brown and Frazier, 2001). Indeed, G-proteins are thought to mediate several CD47-dependent effects. For example, pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G-proteins are involved in signals that stimulate cytoskeletal reorganization following TSP binding to CD47 in melanoma cells (Gao et al., 1996; Guo et al., 1998). Pertussis toxin also inhibits CD47-mediated chemotaxis in smooth muscle cells (Wang et al., 1999) and CD47-mediated mast

cell activation (Sick et al., 2009). Moreover, the mechanism of CD47-dependent killing of Jurkat T cells depends on PKA inhibition via Gi proteins (Manna and Frazier, 2003). Similarly, 4N1 was shown to protect thyroid cells from ceramide-induced apoptosis via the adenylate cyclase pathway (Rath et al., 2006b). Alternatively, some studies provide evidence that CD47-mediated neurite development and B-cell motility depend on the activation of Rac and Cdc42 (Murata et al., 2006; Yoshida et al., 2000). In this study, we propose an original CD47 signaling pathway that involves  $G\beta\gamma$  dimers and the subsequent activation of PI3K/Akt in astrocytoma. Several G-protein subunits can regulate PI3K/Akt activation including Gaq and GBy dimers (Bommakanti et al., 2000; Brock et al., 2003; Stephens et al., 1994; Xie et al., 2000). Signaling through PI3K/Akt is widely described as a tumor progression pathway that influences cell growth, proliferation, survival and motility in several types of cancer, including breast, ovarian, endometrial, lung, renal, thyroid, and lymphoid cancers as well as melanoma and astrocytoma (Vivanco and Sawyers, 2002). In astrocytoma, the PI3K/Akt pathway contributes to glycolysis by regulating localization of the glucose transporter Glut1 to the cell surface and stimulating hexokinase activity, an enzyme in the glycolytic pathway (Cheng et al., 2009). Moreover, Akt-dependent phosphorylation of IP3 receptors inhibits apoptosis induced by staurosporine in U87 cells (Szado et al., 2008). mTOR is also an important target of Akt in glioma. mTOR regulates many aspects of cellular functions, including transcription, cell size, cytoskeletal organization, and autophagy in order to promote cell survival (Zeng and Kinsella, 2008).

Despite evidence indicating that CD47 may be coupled to  $G\alpha s$  in normal astrocytes, we failed to detect an increase in intracellular cAMP following activation of CD47. This may well be explained by putative PLIC-1 interactions with GBy dimers that might modify regulation of adenylate cyclase (Landry et al., 2006). PLIC proteins are widely expressed in multiple organs and have an amino-terminal domain with homology to ubiquitin (UBQ domain) as well as a carboxy-terminal ubiquitinassociated (UBA) domain (Wu et al., 1999). Thus, in addition to their G-protein regulatory roles, PLICs were shown to physically associate with both proteasome and E3 ligase which catalyse the addition of ubiquitin onto lysine residues of target proteins (Kleijnen et al., 2003). PLICs were also shown to affect the membrane expression of several receptors, probably through proteosomal degradation pathways. PLIC-1, for example, enhances the membrane insertion of GABAA receptors by increasing their stability within the endoplasmic reticulum (Saliba et al., 2008). PLIC-2 may also act as a negative regulator of G-protein-coupled receptor endocytosis (N'Diaye et al., 2008). CD47 expression levels in Jurkat cells were not modified after PLIC-1 transfection but CD47-mediated cell spreading was increased (Wu et al., 1999). PLIC-1 may thus enhance CD47-associated functions and its selective co-immunoprecipitation in astrocytoma cells but not in astrocytes reported here may

explain the selective proliferation of astrocytoma cells. Recently, Yang et al. (2009) reported that Akt undergoes lysine-63 chain ubiquitination, which is important for Akt membrane localization and phosphorylation. TRAF6 was found to be a direct E3 ligase for Akt and was essential for Akt ubiquitination, membrane recruitment, and phosphorylation upon growth-factor stimulation. The human cancer-associated Akt mutant displayed an increase in Akt ubiquitination, in turn contributing to the enhancement of Akt membrane localization and phosphorylation. Thus, according to Yang et al. (2009), Akt ubiquitination is an important step for oncogenic Akt activation. Since PLIC-1 is known to physically associate with E3 ligase, PLIC-1 may thus regulate the activity of Akt in astrocytoma cells but not in astrocytes. Therefore, it can be suggested that PLIC-1 might enhance CD47-associated functions and its selective coimmunoprecipitation in astrocytoma cells but not in astrocytes reported here may thus be pertinent in explaining the selective proliferative effect of CD47 activation in astrocytoma cells.

In conclusion, our data indicate that the activation of CD47 receptors enhances the proliferation of human astrocytoma cells but not normal astrocytes. We propose that the CD47-associated signaling pathway underlying this effect involves  $G\beta\gamma$  dimer-dependent activation of PI3K/Akt in astrocytoma, but not in astrocytes. Consistently, we also suggest that PLIC-1 association with CD47 receptors may thus be crucial in oncogenic transformation.

#### REFERENCES

Adams JC, Lawler J. 2004. The thrombospondins. Int J Biochem Cell Biol 36:961-968

- Biol 36:961-968.
  Alblas J, Honing H, de Lavalette CR, Brown MH, Dijkstra CD, van den Berg TK. 2005. Signal regulatory protein a ligation induces macro-phage nitric oxide production through JAK/STAT- and phosphatidyl-inositol 3-kinase/Rac1/NADPH oxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent pathways. Mol Cell Biol 25:7181-7192.

- Mol Cell Biol 25:7181-7192.
  Armant M, Avice MN, Hermann P, Rubio M, Kiniwa M, Delespesse G, Sarfati M. 1999. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. J Exp Med 190:1175-1182.
  Barazi HO, Li Z, Cashel JA, Krutzsch HC, Annis DS, Mosher DF, Roherts DD. 2002. Regulation of integrin function by CD47 ligands. J Biol Chem 277:42859-42866.
  Bommakanti RK, Vinayak S, Simonds WF. 2000. Dual regulation of Akt/Protein kinase B by heterotrimeric G protein subunits. J Biol Chem 275:38870-38876.
  Brock C, Schaefer M, Reusch HP, Czunalla C, Michalke M, Snicher K.
- Cock C, Schaefer M, Reusch HP, Czupalla C, Michalke M, Spicher K, Schult G, Nürnberg B. 2003. Roles of G $\beta\gamma$  in membrane recruitement and activation of p110 $\gamma$ /p101 phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ . J Cell Biol Brock 160:89-99.
- 160:89-99.
  Broom JO, Zhang Y, Oldenborg PA, Massoumi R, Sjolander A. 2009. CD47 regulates collagen I-induced cyclooxygenase-2 expression and intestinal epithelial cell migration. Plos ONE 4:e6371.
  Brown EJ, Frazier WA. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. Trends Cell Biol 11:130-135.
  Cheng CK, Fan QW, Weiss WA. 2009. PI3K signaling in glioma-animal models and therapeutic challenges. Brain Pathol 19:112-120.
  Chen TT, Brown EJ, Huang EJ, Seaman WE. 2004. Expression and activation of signal regulatory protein on astrocrtames.

- activation of signal regulatory protein a on astrocytomas. Cancer Res 64:117-127.
- Chung J, Gao AG, Frazier WA. 1997. Thrombspondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin  $\alpha IIb\beta\beta$ . J Biol Chem 272:14740-14746.
- Congote LF, Temmel N. 2004. The C-terminal 26-residue peptide of serpin A1 stimulates proliferation of breast and liver cancer cells: role of protein kinase C, CD47. FEBS Lett 576:343-347.

GLIA

- Dorahy DJ, Thorne RF, Fecondo JV, Burns GF. 1997. Stimulation of
- Dorahy DJ, Thorne RK, Fecondo JV, Burns GF, 1997. Stimulation of platelet activation and aggregation by a carboxyl-terminal peptide from thrombospondin binding to the integrin-associated protein receptor. J Biol Chem 272:1823-1330.
  Florian S, Ghannadan M, Mayerhofer M, Aichberger KJ, Hauswirth AW, Schernthaner GH, Printz D, Firtsch G, Böhm A, Sonneck K, Krauth MT, Müller MR, Sillaber C, Sperr WR, Bühring HJ, Valent P. 2005. Evaluation of normal and neoplastic human mast cells for expression of CD172a (SIRPα), CD47 and SHP-1. J Leukocyte Biol 77:984-992 77.984-922.
- Frazier WA, Gao AG, Dimitry J, Chung J, Brown EJ, Lindberg FP, Linder ME. 1999. The thrombospondin receptor integrin-associated protein (CD47) functionally couples to heterotrimeric Gi. J Biol Chem 274:8554-8560
- Gao AG, Frazier WA. 1994. Identification of a receptor candidate for the carboxyl-terminal cell binding domain of thrombospondins. J Biol Chem 269:29650-29657.
- Gao AG, Lindberg FP, Finn MB, Blystone SD, Brown EJ, Frazier WA
- Gao AG, Lindberg FP, Finn MB, Blystone SD, Brown EJ, Frazier WA. 1996. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. J Biol Chem 271:21-24.
  Guo NH, Zabrenetzky VS, Chandrasekaran L, Sipes JM, Lawler J, Krutzsch HC, Roberts DD. 1998. Differential roles of protein kinase C, pertussis toxin-sensitive G-binding proteins in modulation of mela-noma cell proliferation and motility by thrombospondin-1. Cancer Res 58:2154-3162. Res 58:3154-3162.
- He S, Dibas A, Yorio T, Prasanna G. 2007. Parallel signaling pathways in endothelin-1-induced proliferation of U373MG astrocytoma cells. Exp Biol Med 232:370-384.
- Exp Biol Med 232:370–384.
  Hermann P, Armant M, Brown E, Rubio M, Ishihara H, Ulrich D, Caspary RG, Lindberg FP, Armitage R, Maliszewski C, Delespesse G, Sarfati M. 1999. The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23. J Cell Biol 144:767–775.
  Isenberg JS, Frazier WA, Roberts DD. 2008. Thrombospondin-1 is a central regulator of nitric oxide signaling in vascular physiology. Cell Mol Life Sci 66:728–742.
- Mol Life Sci 65:728-742. Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, van Roojen N, Weissman IL. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukaemia cells to avoid phagocytosis. Cell 138:271-285.
- Bagocytans, Cen 130:271-200.
  Kassel O, Amrani Y, Landry Y, Bronner C. 1995. Mast cell activation involves membrane potential- and thapsigargin-sensitive intracellular calcium pools. Fund Clin Pharmacol 9:531-539.
  Kawataki T, Naganuma H, Sasaki A, Yoshikawa H, Tasaka K, Nukui
- H. 2000. Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor- $\beta$  expression with malignancy of glioma. Neuropathol 20:161-169
- Kleijnen MF, Alarcon RM, Howley PM. 2003. The ubiquitin-associated domain of hPLIC-2 interacts with the proteasome. Mol Biol Cell 14:3868-3875.
- Kosfeld MD, Frazier WA. 1992. Identification of active peptide sequences in the carboxyl-terminal cell binding domain of human thrombo-spondin-1. J Biol Chem 267:16230-16236.
   Klymchenko AS, Duportail G, Ozturk T, Pivovarenko VG, Mély Y, Demchenko AP. 2002. Novel two-band ratiometric fluorescence probes with different location and orientation in phospholipid membranes. Chom Biol 2002;1199, 1208. Chem Biol 2002 1199-1208
- Latour S, Tanaka H, Demeure C, Mateo V, Rubio M, Brown EJ, Malia-zewski C, Lindberg FP, Oldenborg A, Ullrich A, Delespesse G, Sarfati M. 2001. Bidirectional negative regulation of human T, dendritic cells M. 2001. Bidirectional negative regulation of human T, dedictitic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-α: Down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. J Immunol 167:2647-2564.
  Lee EHY, Hsieh YP, Yang CL, Tsai KJ, Liu CH. 2000. Induction of integrin-associated protein (IAP) mRNA expression during memory consolidation in rat hippocampus. Eur J Neurosci 12:1105-1112.
  Lindberg FP, Bullard DC, Caver TE, Gresham HD, Beaudet AL, Brown EJ. 1996. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. Science 274:795-788.
  Lindberg FP, Gresham HD, Schwarz E, Brown EJ. 1993. Molecular cloning of integrin-associated protein: An immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in αvβ3-dependent ligand binding. J Cell Biol 123:485-496.
  Lymn JS, Patel MK, Clunn GF, Rao SJ, Gallagher KL, Hughes AD. 2002. Thrombospondin-1 differentially induces chemotaxis and DNA

synthesis of human venous smooth muscle cells at the receptor-bind-ing level. J Cell Sci 115:4353-4360.

- Lynch JW, Lemos VS, Bucher B, Stoclet JC, Takeda K. 1994. A pertus-sis toxin-insensitive calcium influx mediated by neuropeptide Y<sub>2</sub> receptors in a human neuroblastoma coll line, J Biol Chem 269: 8226-8233.
- Manna PP, Frazier WA. 2003. The mechanism of CD47-dependent killing of T cells: Heterotrimeric Gi-dependent inhibition of protein
- killing of T cells: Heterotrimeric Gr-dependent innibition of protein kinase A. J Immunol 170:3544-3553.
  Mateo Y, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, Sar-fati M. 1999. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. Nat Med 5:1277-1284.
  Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. 2009. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPa signalling pathway. Trends C-11 Bird 10-79. 80 Cell Biol 19:72-80.
- Miyashita M, Ohnishi H, Okazawa H, Tomonaga H, Hayashi A, Fuji-moto TT, Furuya N, Matozaki T. 2004. Promotion of neurite and filopodium formation by CD47: Roles of integrins, Rac, and Cdc42. Mol Biol Cell 15:3560-3963.
  Murata T, Ohnishi H, Okazawa H, Murata Y, Kusakari S, Hayashi Y,

- Murata T, Ohnishi H, Okazawa H, Murata Y, Kusakari S, Hayashi Y, Miyashita M, Itoh H, Oldenborg PA, Furya N, Matozaki T. 2006. CD47 promotes neuronal development through Src- and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and Cdc42. J Neurosci 26:12397-12407. Nakamura JL, Garcia E, Pieper RO. 2008. S6K1 plays a key role in glial transformation. Cancer Res 68:6516-6522. Narita Y, Asai A, Kuchino Y, Kirino T. 2000. Actinomycin D, stauro-sporine, potent apoptosis inducers in vitro, are potentially effective chemother Pharmacol 45:149-156.
- chemotherapeutic agents against glioblastoma multiforme. Cancer Chemother Pharmacol 45:149-156. N'Diaye EN, Brown EJ. 2003. The ubiquitin-related protein PLIC-1 regulates heterotrimeric G protein function through association with G $\beta\gamma$ . J Cell Biol 163:1157-1165. N'Diaye EN, Hanyaloglu AC, Kajihara KK, Puthenveedu MA, Wu P, von Zastrow M, Brown EJ. 2008. The Ubiquitin-like Protein PLIC-2 is a negative regulator of G protein-coupled receptor endocytosis. Mol Biol Cell 19:1252-1260.
- Didenborg PA, Zhelezoyak A, Fang YF, Carl F, Gresham D, Lindberg FP. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science 288:2051-2054.
- Oncul S, Klymchenko AS, Kucherak OA, Demchenko AP, Martin S, Dontenwill M, Arntz Y, Didier P, Duportail G, Mély Y. 2010. Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: effects of cholesterol depletion and apoptosis. Biochim Biophys Acta 1798:1436-1443.
- Neuroperior M, Lecat S, Rochdi MD, Hachet-Haas M, Matthes H, Gicquiaux H, Verrier S, Gaire M, Glasser N, Mély Y, Takeda K, Bouv-ier M, Galzi JL, Bucher B. 2008. Distinct motifs of neuropeptide Y receptors differentially regulate trafficking and desensitization. Traffic 9:305-324.
- Pagin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. 2001. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. Cancer Res 61:439-444
- Res 51:439-444.
  Piccio L, Vermi W, Boles KS, Fuchs A, Strader CA, Facchetti F, Cella M, Colonna M. 2005. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. Blood 105:2421-2427.
- proliferation. Blood 105:2421-2427.
  Rath GM, Schneider C, Dedieu S, Rothhut B, Soula-Rothhut M, Ghoneim C, Sid B, Morjani H, El Btaouri H, Martiny L. 2006a. The C-terminal CD47/IAP-binding domain of thrombospondin-1 prevents camptothecin- and doxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells. Biochim Biophys Acta 1763:1125-1134.
  Rath GM, Schneider C, Dedieu S, Sartelet H, Morjani H, Martiny L, El Btaouri H. 2006b. Thrombospondin-1 C-terminal-derived peptide protects thyroid cells from ceramide-induced apoptosis through the adenylyl cyclase pathway. Int J Biochem Cell Biol 38:2219-2228.
  Rebres RA, Green JM, Reinhold MI, Ticchioni M, Brown EJ. 2001. Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C 0 translocation in its synergistic activation of T cells. J Biol Chem 276:762-7680.
  Rebres RA, Kajihara K, Brown EJ. 2005. Novel CD47-dependent intercellular adhesion modulates cell migration. J Cell Physiol 205:182-

- cellular adhesion modulates cell migration. J Cell Physiol 205:182-193.
- Rendtlew-Danielsen JM, Knudsen LM, Dahl IM, Lodahl M, Rasmusser
- Kendulew-Danielsen JM, Knudsen LM, Dahl IM, Lodahl M, Rasmussen T. 2007. Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma. Br J Haematol 138:756-760.
  Saliba RS, Pangalos M, Moss SJ. 2008. The ubiquitin-like protein PLIC-1 enhances the membrane insertion of GABA<sub>A</sub> receptors by increasing their stability within the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 283:18588-18544.
- Shynkar VV, Klymchenko AS, Kunzelmann C, Duportail G, Muller CD, Demchenko AP, Freyssinet JP, Mely Y. 2007. Fluorescent biomem-

brane probe for ratiometric detection of apoptosis. J Am Chem Soc 129:2187-2193.

- Sick E, Niederhoffer N, Takeda K, Landry Y, Gies JP. 2009. Activation of CD47 receptors causes histamine release from mast cells. Cell Mol Life Sci 66:1271–1282.
- Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TB, Sterweis PC, Hawkins PT. 1994. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloidderived cells is activated by G protein βγ subunits. Cell 77:83-93. Szado T, Vanderheyden V, Parys JB, De Smedt H, Rietdorf K, Kotele-
- Szado T, Vanderheyden V, Parys JB, De Smedi H, Rietdorf K, Kotelevets L, Chastre E, Khan F, Landegren U, Söderberg O, Bootman MD, Roderick HL. 1998. Phosphorylation of inositol 1,4,5-triphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca<sup>2+</sup> release and apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 105:2427-2432.
- Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. Nat Rev Cancer 2:489-501.
- Wang XQ, Lindberg FP, Frazier WA. 1999. Integrin-associated protein stimulates α2β1-dependent chemotaxis via Gi-mediated inhibition of adenylate cyclase and extracellular-regulated kinases. J Cell Biol 147:389-399.
- Wu AL, Wang J, Zheleznyak A, Brown EJ. 1999. Ubiquitin-related proteins regulate interaction of vimentin intermediate filaments with the plasma membrane. Mol Cell 4:619-625.
- Xie P, Browning DD, Hay N, Mackman N, Ye RD. 2000. Activation of NF-κB by bradykinin through a Gαq- and Gβγ-dependent pathway

that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. J Biol Chem  $275{:}24907{-}24914.$ 

- Yamao T, Noguchi T, Takeuchi O, Nishiyama U, Morita H, Hagiwara T, Akahori H, Kato T, Inagaki K, Okazawa H, Hayashi Y, Matozaki T, Takeda K, Akira S, Kasuga M. 2002. Negative regulation of platelet clearance and of macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1. J Biol Chem 277:39833-39839.
- Yang WL, Wang J, Chan CH, Lee SW, Campos AD, Lamothe B, Hur L, Grabiner BC, Lin X, Darnay BG, Lin HK. 2009. The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. Science 325: 1134-1137.
- Yoshida H, Tomiyama Y, Ishikawa J, Oritani K, Matsumura I, Shiraga M, Yokota T, Okajima Y, Ogawa M, Miyagawa J, Nishiura T, Matsuzawa Y. 2000. Integrin-associated protein/CD47 regulates matile activity in human B-cell lines through Cdc42. Blood 96:234-241.
- Young KW, Pinnock RD, Nahorski SR. 1998. Determination of the inositol (1,4,5) triphosphate requirement for histamine- and substance P-induced Ca<sup>2+</sup> mobilisation in human U373 MG astrocytoma cells. Cell Calcium 24:59-70.
- Zeng X, Kinsella TJ. 2008. Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy. Cancer Res 68:2384-2390.

# Publication 3

# Récepteur CD47 et PI3-kinase/Akt, UHRF-1 et p16<sup>INK4A</sup> dans les astrocytomes

#### Publication n°3 (soumise):

Activation of CD47 –induced UHRF-1 overexpression is associated with silencing of tumor suppressor gene *p16<sup>INK4a</sup>* in glioblastoma cells: role of PI3-kinase/Akt

#### **Objectifs de l'étude:**

Nous avons montré que la stimulation du récepteur CD47 active les protéines PI3K/Akt dans les astrocytomes mais pas dans les astrocytes normaux. Cette voie de signalisation serait déterminante de : **1**- l'effet prolifératif du récepteur CD47 observé dans certains types cellulaires et ; **2**- du statut cancéreux ou normal. Aussi avons donc décidé de nous intéresser aux mécanisme moléculaires impliqués dans cette voie de signalisation et tout particulièrement au rôle du récepteur CD47 dans la régulation de l'expression de la protéine UHRF-1 et de gènes suppresseurs de tumeur en portant une attention particulière au gène *p16<sup>INK4A</sup>* qui joue un rôle essentiel dans le cycle cellulaire en contrôlant notamment la transition G1/S. En effet, nous savons que la protéine UHRF-1 est surexprimée dans de nombreux cancers tels que les astrocytomes, le cancer du pancréas, de la vessie, de l'utérus, et du rein. Elle joue un rôle fondamental dans le maintien de la méthylation de l'ADN, l'acétylation et la méthylation des histones, l'apoptose et la prolifération cellulaire. De plus, lors de cancer, UHRF-1 est responsable de l'hyperméthylation de l'ADN et des histones entrainant ainsi la répression de gènes suppresseur de tumeur (TSGs).

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier le rôle du récepteur CD47 dans la régulation de la protéine UHRF-1 : Ubiquitin-like containing PHD and RING Finger Domain-1 (qui joue un rôle crucial dans la prolifération cellulaire et dans la réplication du code épigénétique) et dans la régulation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur en portant une attention particulière au gène  $p16^{INK4A}$  qui est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines.

#### Discussion et Perspectives:

Ces travaux visaient à étudier la variation d'expression de UHRF-1 qui pouvait, de part son activité sur l'ADN et les histones, être impliqué dans la prolifération cellulaire des astrocytomes humains. Nos résultats montrent que l'activation du CD47 entraine une surexpression de la protéine UHRF-1 et une diminution d'expression de p16<sup>INK4A</sup> dans les lignées d'astrocytomes humains U87 et CCF-STGG1 (Grade IV). A l'inverse, le blocage de CD47 par l'anticorps B6H12 induit une sous-expression d'UHRF-1 et une surexpression de p16<sup>INK4A</sup> chez ces mêmes cellules. De manière intéressante, nous avons montré que l'expression de la protéine UHRF-1 et de p16<sup>INK4A</sup> par les astrocytes normaux ne varie pas, que le CD47 soit activé ou bloqué. Cette régulation d'expression d'UHRF-1 est sous le contrôle de la voie PI3K/Akt. L'activation du récepteur CD47 permet également la transactivation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et l'activation des gènes correspondants : IL-6, IL-7 et MCP-1.

Ces résultats confortent les précédents (publications 1 et 2) et permettent de positionner le récepteur CD47 dans un cercle vicieux qui favorise la prolifération tumorale que l'on pourrait résumer de manière simpliste : **1**- stimulation de CD47 ; **2**- activation de PI3K/Akt ; **3**- activation de NF- $\kappa$ B (Phosphorylation de I $\kappa$ B- $\alpha$ ) ; **4**- activation des gènes de l'IL-6, IL-7, MCP-1 ; **5**- stimulation de la prolifération tumorale par l'IL-6.

Il s'agit maintenant de déterminer si le récepteur CD47 intervient dans la duplication du code épigénétique et de ce fait permet à la cellule cancéreuse de transmettre la répression des gènes suppresseurs de tumeurs, dont  $p16^{INK4A}$ , à sa descendance. La caractérisation d'une association entre les **DNMTs**: *ADN-méthyltransférase* et les **HDACs**: *histone déacétylases* constitue la première base moléculaire de la tumorigenèse. Dans ce contexte, il a été suggéré que l'interaction entre la DNMT1 et la HDAC pourrait intervenir dans la régulation épigénétique des gènes suppresseurs de tumeurs dont  $p16^{INK4A}$ . Pour cet objectif, la HDAC1 et la DNMT1 qui sont impliquées dans la répression du gène suppresseur de tumeur  $p16^{INK4A}$  seront analysées. Pour cette partie du projet, nous allons réaliser des expériences de précipitation de la chromatine (DNA ChIP) et tenter de révéler la présence de HDAC1, et DNMT1 sur le promoteur du gène  $p16^{INK4A}$ .



## Activation of CD47 receptor-induced UHRF1 overexpression is associated with silencing of tumor suppressor gene p16INK4A in glioblastoma cells: Role of PI3kinase/Akt

Journal:	GLIA
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	ALHOSIN, Mahmoud
Key Words:	astrocytoma, CD47, UHRF1, Tumor suppressor gene

SCHOLARONE<sup>™</sup> Manuscripts

John Wiley & Sons, Inc.

# Activation of CD47 receptor-induced UHRF1 overexpression is associated with silencing of tumor suppressor gene *p16<sup>INK4A</sup>* in glioblastoma cells: Role of PI3-kinase/Akt

Abdelaziz BOUKHARI<sup>1</sup>\*, Mahmoud ALHOSIN<sup>1</sup>\*, Krizia SAGINI<sup>1</sup>, Cécile TRUCHOT<sup>1</sup>, Christian BRONNER<sup>1,2</sup>, Marc MOUSLI<sup>1</sup>, Valerie B. SCHINI-KERTH<sup>1</sup>, Philippe ANDRE<sup>1</sup> and Jean-Pierre GIES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France.

<sup>2</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Strasbourg, Parc d'innovation, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex,

France

\*Equal first author

Correspondance : Jean-Pierre GIES CNRS UM 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie Faculté de Pharmacie 74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 Illkirch FRANCE Tel: 0368854140 Fax: 03 68 85 43 13

E-mail: jean-pierre.gies@unistra.fr

Running title: CD47 induces up-regulation of UHRF1 Key words: astrocytoma; integrin-associated protein; NF-κB Number of words: 5546

### ABSTRACT

CD47, an integrin-associated protein is overexpressed in several tumors including glioblastomas. We have shown that activation of CD47 induces proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent manner; however, the pathways mediating this process are still unknown. The epigenetic integrator UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and RING Finger 1) is overexpressed in various cancers and plays a vital role in the silencing numerous tumor suppressor genes including  $p16^{INK4A}$  thereby promoting cell proliferation. The objective of this study was to investigate whether the UHRF1/p16<sup>INK4A</sup> deregulation found in cancer is mediated at least in part by CD47 and, if so, to determine the role of the Akt pathway. Here we show that activation of CD47 in human astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1 (Grade IV) up-regulated UHRF1 with subsequent down-regulation of  $p16^{INK4A}$  without affecting their expression in astrocytes. Blocking CD47 function allowed re-expression of normal human  $p16^{INK4A}$  associated with UHRF1 down-regulation in both cancer cell lines. Inhibition of the PI3/Akt pathway was able to counteract the CD47-induced up-regulation of UHRF1 expression through an Akt-UHRF1 indicating that CD47 regulates dependent mechanism. We also observed that CD47 regulates the transactivation of NF-kB and its inflammatory gene targets IL-6, IL-7 and MCP-1. In conclusion, our data indicate that CD47 activation induces UHRF1 up-regulation and suggest for the first time that CD47 might regulate the epigenetic code by targeting UHRF1 through the PI3/Akt pathway. This could represent a new pathway to synergistically promote silencing tumor suppressor genes.

### **INTRODUCTION**

CD47, also called integrin-associated protein is a membrane receptor that is involved in several pathophysiological processes including cell proliferation and migration (Jaiswal et al. 2009; Liu et al. 2001; Lymn et al. 2002), infection (Lindberg et al. 1996), immune response (Sarfati et al. 2008), and apoptosis (Gardai et al. 2005). CD47 expression has been reported to be increased in several haematological and solid tumors (Chao et al. 2012). CD47 regulates osteoclastogenesis and its disruption causes a decrease in tumor bone metastasis (Uluckan et al. 2009). It has been shown that CD47 plays a key role in the progression of breast cancer via its interaction with the transmembrane glycoprotein SIRP $\alpha$  (signal regulatory protein  $\alpha$ ) (Nagahara et al. 2010). CD47 was found to be highly expressed in multiple myeloma (MM) (Rendtlew Danielsen et al. 2007) and human myeloid leukaemia stem cells (AML LSC) compared to normal bone marrow and the increase in its level is associated with worse clinical outcomes (Majeti et al. 2009). Interestingly, blocking CD47 function using monoclonal antibody B6H12 enabled selectively the phagocytosis of AML LSC by human macrophages (Majeti et al. 2009). In the same context, it has been shown that CD47 receptor expression is increased in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) patients compared to normal cell counterparts and blocking its function was able to eliminate ALL (Chao et al. 2011). We have previously shown that activation of CD47 induced proliferation of human astrocytoma via an Akt-dependent manner (Sick et al. 2011). All together these studies suggest that the CD47 receptor is a potential therapeutic target and that its inhibition will lead to block pathways involved in the transfer of extracellular signals to the nucleus.

NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) transcription factor has pro-survival and anti-apoptotic activities on several tumors including glioblastoma (Greten and Karin 2004; Miyakoshi and Yagi 2000; Russell et al. 2002). Several studies have shown that activation of NF- $\kappa$ B

regulates the expression of several anti-apoptotic, pro-metastatic and inflammatory cytokines promoting cell proliferation and survival (Mantovani 2010; Nakshatri et al. 1997; Newton et al. 1999; Patel et al. 2000).

UHRF1 (Ubiquitin-Like containing PHD and RING Finger 1), an oncogene overexpressed in many human cancer cells, is an essential protein required for the DNA methylation via its affinity for hemi-methylated DNA and its association with DNA methyltransferase 1 (DNMT1) (Achour et al. 2008; Arita et al. 2008; Avvakumov et al. 2008; Bostick et al. 2007). Many studies have shown that UHRF1 plays an important role in G1/S transition of cell cycle and the epigenetic silencing of various tumor suppressor genes including the cell cycle inhibitor  $p16^{INK4A}$  (Achour et al. 2008; Alhosin et al. 2003; Wang et al. 2012). Interestingly, UHRF1 down-regulation activates tumor suppressor genes with subsequent cell proliferation inhibition and apoptosis in cancer cells (Achour et al. 2008; Alhosin et al. 2008; Alhosin et al. 2010; Karagianni et al. 2008).

Considering that UHRF1 negatively regulates tumor suppressor gene  $p16^{INK4A}$  (Achour et al. 2008; Wang et al. 2012) and has pro-proliferative activities on many cancer cell lines (Alhosin et al. 2011), we hypothesize that CD47 decreases tumor suppressor gene expression  $p16^{INK4A}$  by increasing UHRF1 expression level thus enhancing cell proliferation. We also hypothesize that CD47-induced UHRF1/  $p16^{INK4A}$  deregulation is orchestrated by activation of the Akt pathway and that the NF- $\kappa$ B transcription factor plays a role in this process. In the present study we observed that CD47 activation induces UHRF1 up-regulation and  $p16^{INK4A}$  down-regulation in human astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1 (Grade IV) without affecting their expression in normal human astrocytes. Blocking CD47 receptor function allowed re-expression of tumor suppressor gene  $p16^{INK4A}$  accompanied with UHRF1 down regulation in both cancer cell lines. We observed that activation of CD47induced UHRF1 up-

regulation is mediated by the Akt pathway. We also observed that CD47 regulates the transactivation of NF- $\kappa$ B suggesting that CD47 receptor up-regulates UHRF1 via activation of NF- $\kappa$ B transactivation promoting proliferation of glioma cells.

#### **MATERIAL AND METHODS**

#### Cell culture and treatment

Human astrocytoma cell lines CCF-STTG1, U373, SW-1783, 1321N1 were obtained from the America Type Culture Collection (Rockville, IN), U87 from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) and normal human astrocytes from Lonza (Walkersville, MD). Cell lines were maintained in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and grown in astrocyte basal medium (ABM<sup>TM</sup>) (Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated FBS for normal human astrocytes, in EMEM for U87 and U373 cells, in RPMI for CCF-STTG1 cells and in L-15 for SW-1783. All media were supplemented with 2 mM Lglutamine, 100  $\mu$ g/mL gentamycin, 100 U/mL penicillin and 50 mg/ml streptomycin (Sigma St. Louis, MO). Primary normal human astrocytes were used from the first to the fourth passage. The peptide 4N1 (RFYVVMWK) and the anti-CD47 B6H12 mAb were purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland) and BD Biosciences (San Diego, CA), respectively, and wortmannin from Santa Cruz (Santa Cruz, CA).

#### Western blot analysis

Cells were grown in 6-well plates to 75% confluence and treated with different concentrations of the peptide 4N1 or the anti-CD47 B6H12 mAb for 24 h. Cells were then washed with cold PBS and lysed with ice-cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and a protease inhibitor mixture tablet). Equal amounts of total proteins were separated on 10-12% polyacrylamide gel and electrophoretically transferred to PVDF membranes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), which were then blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat dried milk (BioRad, Hercules, USA). Membranes were then incubated with either a mouse monoclonal anti-UHRF1 antibody (Proteogenix, Oberhausbergen, France), a rabbit polyclonal anti-

p16<sup>INK4A</sup> (DeltaBiolabs, Gilroy, CA), a rabbit polyclonal anti-p-I $\kappa$ B $\alpha$  (Merck Millipore, Billerica, MA) or a mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody (Abcam, Paris, France), according to the manufacturer's instructions at 4°C overnight. The membranes were then washed three times; 5 min/each time with PBS. Membranes were thereafter incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (diluted to 1:20,000 for anti-mouse antibody and 1:20,000 for anti-rabbit antibody) at room temperature for 1 h. The membranes were then washed with PBS five times. Signals were detected by chemiluminescence using an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare).

#### **Real-time RT–PCR analysis**

Cells were grown in 6-well plates to 75% confluence and treated with different concentrations of the peptide 4N1 or the anti-CD47 B6H12 mAb for 5 h. Total RNA was extracted from cells with PureZOLTM reagent (BioRad) according to manufacturer's recommendations. Reverse transcription was done using 500 ng total RNA with the SuperScript<sup>TM</sup>III First-strand synthesis system (Invitrogen, Paisley, UK) according to manufacturer's protocol. Amplification was assessed using 1 µL RT products in a mixture containing 200 µM of each dNTP, 0.5 µM oligonucleotide primers, 1x Phusion HF buffer, and 0.02 U/IL Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). The results were normalized to those obtained with GAPDH mRNA. The sequences of the primers for PCR amplification were: UHRF1 (sense: 5'-GTCGAATCATCTTCGTGGAC-3'; antisense: 5'- AGTACCACCTCGCTGGCAT-3'); IL-6 (sense: 5'-TCAATGAGGAGACTTGCCTG-3'; antisense: 5'GATGAGTTGTCATGTCCTGC-3'), IL-7 (sense: 5'-CTGGGTGAAGCCCAAC 5'-TTCAGTGTTCTTTAGTGCCCATCA-3'), CA-3': antisense: MCP-1 (sense: 5'-ATGCAATCAATGCCCCAGTC-3'; antisense: 5'-TGCAGATTCTTGGGTTGTGG-3') and GAPDH (sense: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3', antisense: 5'-AGAGTTAAAAGC

AGCCCTGGTG-3'). Cycling parameters were: 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s for 30 cycles, followed by a final elongation at 72°C for 5 min. Amplicons were size controlled on agarose gel and purity was assessed by analysis of the melting curves at the end of the real-time PCR reaction.

### **Statistical Analysis**

Results are presented as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was done using ANOVA. Significant differences are represented throughout as \**P*< 0.05, \*\**P*<0.001, \*\*\**P*<0.0001.

#### RESULTS

#### 1. CD47 is required for UHRF1 expression in astrocytoma cell lines

To investigate whether CD47 regulates UHRF1 expression in glioma cells, the effect of peptide 4N1 (CD47 agonist) and B6H12 (CD47 function-blocking monoclonal antibody) were assessed on UHRF1 expression on human astrocytoma U87 and CCF-STTG1. After 24 h treatment of U87 with peptide 4N1, UHRF1 protein level was increased in a concentrationdependent manner (Fig. 1A). A four-fold increase in UHRF1 expression was reached at 100 μ M. Similarly, UHRF1 expression in CCF-STTG1 was increased in a concentrationdependent manner with two-fold and three-fold increases in UHRF1 expression observed at 50 and 100 µM, respectively (Fig. 1B). In order to determine whether CD47 -induced UHRF1 up-regulation results from enhanced transcription, UHRF1 gene transcription was analyzed in U87 and CCF-STTG1 (Fig. 1C). A significant increase in UHRF1 gene expression was found in both glioma cell lines starting from 50  $\mu$ M and a maximal two-fold increase was reached at 100 µM (Fig. 1C). Given that blocking of CD47 function by B6H12 decreases cell proliferation (Sick et al. 2011) and UHRF1 down-regulation also inhibits cell proliferation (Wang et al. 2012), we determined whether CD47 receptor function blocking is associated with UHRF1 down-regulation. The results indicate that inhibition of CD47 function by B6H12 induced a concentration-dependent down-regulation of UHRF1 expression in both human astrocytoma cell lines (Fig. 2A & B). This effect was observed at 0.2  $\mu$ g/mL and was further increased at 2  $\mu$ g/mL. Moreover, blocking of CD47 receptor induced a decrease in the UHRF1 gene expression (Fig. 2C). UHRF1 gene expression was significantly inhibited by about 60% and 80% at 0.2 and 2  $\mu$ g/ml of B6H12 in both cell lines, respectively (Fig. 2C). Altogether, these results suggest that CD47 is a key regulator of UHRF1 expression in

astrocytoma cell lines and that UHRF1 most likely is an important actor involved in glioma cell proliferation following activation of CD47.

#### 2. CD47 activation induces Akt-dependent up-regulation of UHRF1 in glioma cells

Our previous study showed that CD47 is able to activate Akt in astrocytoma cells to induce cell proliferation (Sick et al. 2011). Experiments were performed to determine the role of the PI3 kinase using wortmannin, an inhibitor of PI3 kinase on CD47-induced UHRF1 mRNA expression (Fig. 3A & B). While, activation of CD47 induced UHRF1 up-regulation in U87 cells (Fig. 3A) and CCF-STTG1 cells (Fig. 3B), these responses were markedly reduced by wortmannin (Fig. 3A & B). Thus, these findings indicate a key role of the PI3-kinase/Akt pathway in the CD47-induced signal transduction pathway leading to UHRF1 up-regulation, which will subsequently promote cell growth and survival.

# 3. CD47 correlates inversely with tumor suppressor gene $p16^{INK4A}$ expression in glioma cells

We and others have shown that UHRF1 down-regulation inhibits cancer cell growth through p16<sup>INK4A</sup> up-regulation, a downstream target of UHRF1 (Achour et al. 2008; Wang et al. 2012). Therefore, experiments were performed to determine whether p16<sup>INK4A</sup> is regulated by CD47. After a 24 h treatment period of U87 with peptide 4N1, p16<sup>INK4A</sup> protein levels were decreased in a concentration-dependent manner (Fig. 4A). More than a two-fold decrease in p16<sup>INK4A</sup> expression was reached at 100  $\mu$  M (Fig. 4A). Similar to U87, p16<sup>INK4A</sup> expression was also decreased in CCF-STTG1 in a concentration-dependent mechanism (Fig. 4B). Interestingly, treating both cell lines with CD47 function blocking antibody B6H12 at 0.2  $\mu$  g/ml induced p16<sup>INK4</sup> up-regulation (Fig. 4A & B) which was associated with a sharp decrease in UHRF1 expression (Fig. 2A & B). A two-fold increase in p16<sup>INK4</sup>

John Wiley & Sons, Inc.

observed (Fig. 4A & B) which was associated with a sharp decrease in UHRF1 expression in response to B6H12 (Fig. 2A & B). Taken together, these data suggest that CD47 regulates positively UHRF1, which induces down-regulation of the cell cycle inhibitor p16<sup>INK4</sup> leading to glioma cell growth.

## 4. CD47 does not affect UHRF1 and p16<sup>INK4</sup> expression in normal human astrocytes

UHRF1 overexpression observed in various cancer cells is likely to trigger their abnormal proliferation. We determined the expression level of UHRF1 in several human astrocytoma cell lines such as U87 and CCF-STTG1 (Grade IV), U373 and SW-1783 (Grade III), 1321N1 (Grade II), and normal human astrocytes (NHA) (Fig. 5). UHRF1 expression was increased in all human astrocytoma cell lines, especially of grade IV (U87 and CCF-STTG1) compared with normal human astrocytes (Fig. 5A). In the same way, UHRF1 protein level was significantly increased in grade IV compared with NHA (Fig. 5B). Since the activation of CD47 induces proliferation of astrocytoma cells but not of normal human astrocytes (Sick et al. 2011), we investigated whether UHRF1/p16<sup>INK4A</sup> expression could play a role in the CD47-induced selective proliferation of glioma cells. Interestingly, we observed that activation of CD47 by peptide 4N1 (Fig. 6A) or blocking its function by B6H12 (Fig. 6B) did affect neither UHRF1 nor p16<sup>INK4A</sup> protein level in normal astrocytes. These findings indicate that activation of CD47 enhances proliferation of astrocytoma cells but not of astrocytoma cells but not of normal astrocytes.

# 5. CD47 regulates NF-κB transactivation and inflammatory genes IL-6, IL-7 and MCP-1 in glioma cells

Previous studies have shown that the NF- $\kappa$ B transcription factor has pro-survival and proliferative activities in several cancer cells including human glioblastoma cells (Mut et al. John Wiley & Sons, Inc. 11

2010). We investigated the effect of CD47 activation on the phosphorylation of  $I\kappa B\alpha$  which is an indicator of NF- $\kappa$ B transactivation. Figure 7A & B indicate that activation of CD47 induced a concentration-dependent increase in p-I $\kappa$ B\alpha expression level in glioma cells. The increase in the level of I $\kappa$ B phosphorylation was more pronounced in U87 (Fig. 7A) than in CCF-STTG1 (Fig. 7B). Conversely, blocking of CD47 function by B6H12 mAb decreased the phosphorylation level of I $\kappa$ B (Fig. 7B). Then, we analyzed the expression NF- $\kappa$ B-induced inflammatory genes IL-6, IL-7 and MCP-1 in both cell lines (Fig. 7C & D). Treating astrocytoma cells with peptide 4N1 increased the expression of IL-6, IL-7 and MCP-1 in a concentration-dependent manner (Fig. 7C). Interestingly, blocking the CD47 function induced a concentration-dependent decrease in the level of IL-6, IL-7 and MCP-1 in both astrocytoma cell lines grade IV (Fig. 7D). Altogether, these results indicate that CD47 receptor activates NF- $\kappa$ B transactivation by phosphorylation of its inhibitor, I $\kappa$ B leading to the expression of IL-6, IL-7 and MCP-1.

#### DISCUSSION

The role of CD47 in promoting cell growth and enabling tumors to escape the immune response has been studied extensively but the pathways involved in this process still needs to be clarified. Our previous study has shown that activation of CD47 induces selectively human astrocytoma cell proliferation via the activation of the Akt pathway (Sick et al. 2011). The present study was designed to determine more precisely the upstream and downstream players involved in the mechanism of action of CD47 leading to the selective effect on human astrocytoma cell proliferation. The findings indicate that CD47 activation induced the upregulation of the oncogenic factor UHRF1 associated with a down-regulation of the tumor suppressor gene  $p16^{INK4A}$  in human astrocytoma cells without affecting their expression levels in human normal astrocytes. Moreover, blocking CD47 function was able to induce UHRF1 down-regulation associated with p16<sup>INK4A</sup> up-regulation in both astrocytoma cell lines. We have previously shown that UHRF1 down-regulation induces an activation of the tumor suppressor gene  $p16^{INK4A}$  in acute lymphoblastic leukaemia ALL (Achour et al. 2008). Recently, study has shown that UHRF1 overexpression in colorectal cancer cells is associated with silencing of tumor suppressor gene  $p16^{INK4A}$  and tumoral progression and that UHRF1 down-regulation induced a significant decrease in proliferation and migration of colorectal cancer cells associated with p16<sup>INK4A</sup> up-regulation (Wang et al. 2012). Our study showed that blocking CD47 function induces UHRF1 down-regulation and p16<sup>INK4A</sup> up-regulation in astrocytoma cell lines but not in normal cells, although they have similar CD47 levels (Sick et al. 2011). Altogether these previous findings and the present ones suggest that activation of CD47 induces proliferation of human astrocytoma cells by increasing UHRF1 expression and the subsequent silencing of the tumor suppressor gene p16<sup>INK4A</sup>

We have observed in the present study that UHRF1 expression was more pronounced in human astrocytoma cells of grade IV (U87 and CCF-STTG1) compared with normal astrocytes. This observation supports the hypothesize that stimulatory effect of CD47 on the astrocytoma cell proliferation is dependent at least in part on their high expression level of UHRF1. We have previously shown that activation of CD47 induced a rapid phosphorylation of Akt, a downstream target of PI3-kinase in human astrocytomas but not in human normal astrocytes (Sick et al. 2011). In the present study, we observed that the inhibition of the PI3kinase pathway by wortmannin counteracted the CD47 activation-induced up-regulation of UHRF1 in astrocytoma cells. These findings indicate that CD47 activation induces the Aktdependent UHRF1 up-regulation promoting astrocytoma cell proliferation. The question of how the CD47-induced PI3-kinase/Akt signal may induce UHRF1 overexpression in glioblastoma remains to be clarified. Signalling through the PI3-kinase is commonly activated in many tumors including glioblastoma and leads to activation of the pro-survival NF-κB pathway (Parcellier et al. 2008). The present findings showed in U87 and CCF-STTG1 that activation of CD47 by its agonist 4N1 stimulates the activation of NF-KB transcription factor by inducing phosphorylation of its inhibitor IkB $\alpha$  with the subsequent up-regulation of several inflammatory genes including IL-6, IL-7 and MCP-1. The CD47-induced stimulatory effects on NF-kB and its targets IL-6, IL-7 and MCP-1 were reversed by blocking CD47 function using B6H12 mAb in both cell lines. Activation of the transcription factor NF-KB is observed in several tumors including glioblastoma, and stimulates the expression of various oncogenes and factors involved in inflammation, cell cycle, apoptosis and angiogenesis (Akca et al. 2011; Barkett and Gilmore 1999; Bhat-Nakshatri et al. 2002; Foo and Nolan 1999; Greten and

Karin 2004; Mayo et al. 2001; Miyakoshi and Yagi 2000; Pahl 1999; Sun et al. 2011; Yamagishi et al. 1997). NF- $\kappa$ B activation has been shown to inhibit the tumor suppressor gene p53 in glioblastoma (grade IV) (Huang et al. 2007; Park et al. 2009; Tergaonkar et al.

2002). As the tumor suppressor gene p53 negatively regulates UHRF1 expression (Arima et al. 2004), we suggest that CD47-mediated NF- $\kappa$ B activation leads to UHRF1 overexpression via inhibition of the p53 pathway. Alternatively, NF- $\kappa$ B may also directly regulate UHRF1 expression.

In conclusion, the present findings indicate that the selective proliferative effect of CD47 in glioblastoma cells involves an Akt/NF- $\kappa$ B-dependent up-regulation of UHRF1 and down-regulation of the tumor suppressor gene *p16<sup>INK4A</sup>* (Fig. 8). Furthermore, the present findings indicate that CD47-induced NF- $\kappa$ B activation up-regulates several inflammatory genes promoting growth and metastasis of astrocytoma cells. This study supports the concept that CD47 is a potential target for anticancer therapy and that blockage of its function helps to inhibit cancer cell proliferation most likely by decreasing UHRF1 and increasing p16<sup>INK4A</sup> expression.

# Acknowledgments

This study was supported by a grant of the Ligue contre le Cancer, Comité du Haut-Rhin,

France.

#### REFERENCES

- Achour M, Jacq X, Ronde P, Alhosin M, Charlot C, Chataigneau T, Jeanblanc M, Macaluso M, Giordano A, Hughes AD and others. 2008. The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. Oncogene 27(15):2187-97.
- Akca H, Demiray A, Tokgun O, Yokota J. 2011. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells. Lung Cancer 73(3):302-9.
- Alhosin M, Sharif T, Mousli M, Etienne-Selloum N, Fuhrmann G, Schini-Kerth VB, Bronner C. 2011. Down-regulation of UHRF1, associated with re-expression of tumor suppressor genes, is a common feature of natural compounds exhibiting anti-cancer properties. J Exp Clin Cancer Res 30:41.
- Arima Y, Hirota T, Bronner C, Mousli M, Fujiwara T, Niwa S, Ishikawa H, Saya H. 2004. Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNAdamage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. Genes Cells 9(2):131-42.
- Arita K, Ariyoshi M, Tochio H, Nakamura Y, Shirakawa M. 2008. Recognition of hemimethylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism. Nature 455(7214):818-21.
- Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li Y, Duan S, Bronner C, Arrowsmith CH, Dhe-Paganon S. 2008. Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. Nature 455(7214):822-5.

- Barkett M, Gilmore TD. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 18(49):6910-24.
- Bhat-Nakshatri P, Sweeney CJ, Nakshatri H. 2002. Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF-kappaB activation in breast cancer cells. Oncogene 21(13):2066-78.
- Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. 2007. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. Science 317(5845):1760-4.
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Jan M, Weissman-Tsukamoto R, Zhao F, Park CY, Weissman IL, Majeti R. 2011. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res 71(4):1374-84.
- Chao MP, Weissman IL, Majeti R. 2012. The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. Curr Opin Immunol 24(2):225-32.
- Daskalos A, Oleksiewicz U, Filia A, Nikolaidis G, Xinarianos G, Gosney JR, Malliri A, Field JK, Liloglou T. 2011. UHRF1-mediated tumor suppressor gene inactivation in nonsmall cell lung cancer. Cancer 117(5):1027-37.
- Foo SY, Nolan GP. 1999. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. Trends Genet 15(6):229-35.
- Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. Cell 123(2):321-34.
- Greten FR, Karin M. 2004. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. Cancer Lett 206(2):193-9.

- Huang WC, Ju TK, Hung MC, Chen CC. 2007. Phosphorylation of CBP by IKKalpha promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF-kappaB. Mol Cell 26(1):75-87.
- Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, van Rooijen N, Weissman IL. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. Cell 138(2):271-85.
- Jeanblanc M, Mousli M, Hopfner R, Bathami K, Martinet N, Abbady AQ, Siffert JC, Mathieu E, Muller CD, Bronner C. 2005. The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. Oncogene 24(49):7337-45.
- Jin W, Chen L, Chen Y, Xu SG, Di GH, Yin WJ, Wu J, Shao ZM. 2010. UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer. Breast Cancer Res Treat 123(2):359-73.
- Karagianni P, Amazit L, Qin J, Wong J. 2008. ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation. Mol Cell Biol 28(2):705-17.
- Lindberg FP, Bullard DC, Caver TE, Gresham HD, Beaudet AL, Brown EJ. 1996. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. Science 274(5288):795-8.
- Liu Y, Merlin D, Burst SL, Pochet M, Madara JL, Parkos CA. 2001. The role of CD47 in neutrophil transmigration. Increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of CD47. J Biol Chem 276(43):40156-66.
- Lymn JS, Patel MK, Clunn GF, Rao SJ, Gallagher KL, Hughes AD. 2002. Thrombospondin-1 differentially induces chemotaxis and DNA synthesis of human venous smooth muscle cells at the receptor-binding level. J Cell Sci 115(Pt 22):4353-60.

- Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Jr., van Rooijen N, Weissman IL. 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. Cell 138(2):286-99.
- Mantovani A. 2010. Molecular pathways linking inflammation and cancer. Curr Mol Med 10(4):369-73.
- Mayo MW, Norris JL, Baldwin AS. 2001. Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. Methods Enzymol 333:73-87.
- Miyakoshi J, Yagi K. 2000. Inhibition of I kappaB-alpha phosphorylation at serine and tyrosine acts independently on sensitization to DNA damaging agents in human glioma cells. Br J Cancer 82(1):28-33.
- Mousli M, Hopfner R, Abbady AQ, Monte D, Jeanblanc M, Oudet P, Louis B, Bronner C. 2003. ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. Br J Cancer 89(1):120-7.
- Mut M, Amos S, Hussaini IM. 2010. PKC alpha phosphorylates cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells. Turk Neurosurg 20(3):277-85.
- Nagahara M, Mimori K, Kataoka A, Ishii H, Tanaka F, Nakagawa T, Sato T, Ono S, Sugihara K, Mori M. 2010. Correlated expression of CD47 and SIRPA in bone marrow and in peripheral blood predicts recurrence in breast cancer patients. Clin Cancer Res 16(18):4625-35.
- Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. 1997. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. Mol Cell Biol 17(7):3629-39.

- Newton TR, Patel NM, Bhat-Nakshatri P, Stauss CR, Goulet RJ, Jr., Nakshatri H. 1999. Negative regulation of transactivation function but not DNA binding of NF-kappaB and AP-1 by IkappaBbeta1 in breast cancer cells. J Biol Chem 274(26):18827-35.
- Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 18(49):6853-66.
- Parcellier A, Tintignac LA, Zhuravleva E, Hemmings BA. 2008. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. Cell Signal 20(1):21-30.
- Park S, Hatanpaa KJ, Xie Y, Mickey BE, Madden CJ, Raisanen JM, Ramnarain DB, Xiao G, Saha D, Boothman DA and others. 2009. The receptor interacting protein 1 inhibits p53 induction through NF-kappaB activation and confers a worse prognosis in glioblastoma. Cancer Res 69(7):2809-16.
- Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, Gelfanov V, Boswell SH, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. and others. 2000. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. Oncogene 19(36):4159-69.
- Rendtlew Danielsen JM, Knudsen LM, Dahl IM, Lodahl M, Rasmussen T. 2007.Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma.Br J Haematol 138(6):756-60.
- Russell JS, Raju U, Gumin GJ, Lang FF, Wilson DR, Huet T, Tofilon PJ. 2002. Inhibition of radiation-induced nuclear factor-kappaB activation by an anti-Ras single-chain antibody fragment: lack of involvement in radiosensitization. Cancer Res 62(8):2318-26.
- Sarfati M, Fortin G, Raymond M, Susin S. 2008. CD47 in the immune response: role of thrombospondin and SIRP-alpha reverse signaling. Curr Drug Targets 9(10):842-50.

- Sick E, Boukhari A, Deramaudt T, Ronde P, Bucher B, Andre P, Gies JP, Takeda K. 2011. Activation of CD47 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway. Glia 59(2):308-19.
- Sun HZ, Yang TW, Zang WJ, Wu SF. 2011. Dehydroepiandrosterone-induced proliferation of prostatic epithelial cell is mediated by NFKB via PI3K/AKT signaling pathway. J Endocrinol 204(3):311-8.
- Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I. 2002. p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. Cancer Cell 1(5):493-503.
- Uluckan O, Becker SN, Deng H, Zou W, Prior JL, Piwnica-Worms D, Frazier WA, Weilbaecher KN. 2009. CD47 regulates bone mass and tumor metastasis to bone. Cancer Res 69(7):3196-204.
- Wang F, Yang YZ, Shi CZ, Zhang P, Moyer MP, Zhang HZ, Zou Y, Qin HL. 2012. UHRF1 Promotes Cell Growth and Metastasis Through Repression of p16(ink4a) in Colorectal Cancer. Ann Surg Oncol.
- Yamagishi N, Miyakoshi J, Takebe H. 1997. Enhanced radiosensitivity by inhibition of nuclear factor kappa B activation in human malignant glioma cells. Int J Radiat Biol 72(2):157-62.
#### FIGURES LEGENDS

Fig. 1. Effect of CD47-activating peptide 4N1 on UHRF1 expression in human astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1. U87 cells and CCF-STTG1 cells were incubated with either 50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M of peptide 4N1 for 24 h (A, B) or 5 h (C). UHRF1 protein expression was assessed by Western blotting in U87 cells (A, upper panel) and in CCF-STTG1 (B, upper panel). UHRF1 expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with control (A, B lower panel). UHRF1 mRNA expression was assessed by RT-PCR in both cell lines (C). Data are shown as mean±sem of three independent experiments (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001 versus control).

Fig. 2. Effect of CD47 function-blocking mAb (B6H12) on UHRF1 expression in human astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1. U87 cells and CCF-STTG1 cells were incubated with either 0.2 or 2  $\mu$ g/mL of anti-CD47 mAb B6H12 for 24 h (A, B) or 5 h (C). UHRF1 protein expression was assessed by Western blotting in U87 cells (A, upper panel) and in CCF-STTG1 (B, upper panel). UHRF1 expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with control (A, B lower panel). UHRF1 mRNA expression was assessed by RT-PCR in U87 and CCF-STTG1 cells (C). Data are shown as mean±sem of three independent experiments (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001 versus control).

Fig. 3. Effect of the PI3 kinase inhibitor (wortmannin) on UHRF1 expression in human astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1. U87 cells (A) and CCF-STTG1 cells (B) were pre-treated with or without wortmannin (30 nM) for 30 min and then they were challenged with either 50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M of peptide 4N1 for 5 h. UHRF1 mRNA expression was assessed by RT-PCR in both cell lines. Data are shown as mean±sem of three independent experiments (\*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001 versus control), (°*P*<0.05, °°*P*<0.01, °°°*P*<0.001 versus the corresponding cell condition).

Fig. 4. Effect of CD47-activating peptide 4N1 and blocking mAb (B6H12) on p16<sup>INK4A</sup> expression in U87 and CCF-STTG1. U87 cells (A) and CCF-STTG1 (B) were incubated with either 50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M of peptide 4N1 or 0.2  $\mu$ g/mL of anti-CD47 mAb B6H12 for 24h. p16<sup>INK4A</sup> protein expression was assessed by Western blotting in U87 cells (A, upper panel) and in CCF-STTG1 (B, upper panel). p16<sup>INK4A</sup> expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with control (A, B lower panel). Results are shown as mean±sem of three independent experiments (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01 versus control).

Fig. 5. Expression of UHRF1 in human astrocytoma cell lines and normal human astrocytes cell line NHA. UHRF1 mRNA expression (A) and UHRF1 protein level (B) were assessed respectively by RT-PCR and Western blotting in human astrocytoma cell lines U87, CCF-STTG1 (Grade IV), U373, SW-1783 (Grade III), 1321N1 (Grade II), and normal human astrocytes (NHA). UHRF1 mRNA and protein expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with NHA (A, B, lower panels).

24

#### GLIA

Results are shown as mean $\pm$ sem of three independent experiments (\*P<0.05, \*\*P<0.01 versus NHA).

Fig. 6. Effect of CD47-activating peptide 4N1 and blocking mAb (B6H12) on UHRF1 and p16<sup>INK4A</sup> expression in normal human astrocyte cell line NHA. Human astrocyte cell line NHA was incubated with either 50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M of peptide 4N1 (A), and either 0.2 or 2  $\mu$ g/mL of anti-CD47 mAb B6H12 (B) for 24 h. UHRF1 and p16<sup>INK4A</sup> protein expression level were assessed by Western blotting (A, B upper panel). UHRF1 and p16<sup>INK4A</sup> expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with control (middle and lower panels, respectively). Results are shown as mean±sem of three independent experiments.

Fig. 7. Effect of CD47-activating peptide 4N1 and blocking mAb (B6H12) on p-I $\kappa$ B $\alpha$ , IL-6, IL-7 and MCP-1 expression in human astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1. U87 cells and CCF-STTG1 cells were incubated with either 50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M of 4N1 peptide and with 0.2 or 2  $\mu$ g/mL of anti-CD47 mAb B6H12. p-I $\kappa$ B $\alpha$ expression was assessed by Western blotting (A, B). IL-6, IL-7 and MCP-1 mRNA expression levels were evaluated by RT-PCR in peptide 4N1-treated (C) and mAb B6H12treated U87 and CCF-STTG1 cells (D). Data are shown as mean±sem of three experiments (\*P<0.05, (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 versus control).

**Fig. 8.** Schematic illustration indicating the hypothetical role of CD47 in enhancing cell growth and metastasis of astrocytoma cells involving UHRF1 overexpression, p16<sup>INK4A</sup> down- regulation and the induction of the inflammatory genes IL-6, IL-7 and MCP-1.

25

26

GLIA



GLIA

John Wiley & Sons, Inc.

**U87** 

CCF-STTG1



0.0

Control



John Wiley & Sons, Inc.

2

Control 0.2

**CCF-STTG1** 

2

0.2

**U87** 

A

U87



B

**CCF-STTG1** 









4N1 (µM) mAb B6H12 4N1 (µM) mAb B6H12



GLIA

NHA

A





John Wiley & Sons, Inc.



John Wiley & Sons, Inc.

# **Publication 4**

## Rôle du complexe « SIPRα- CD47» dans les interactions mastocytes-astrocytomes

#### Publication n°4 (en préparation):

### Activation of CD47 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway

#### **Objectifs de l'étude:**

Le récepteur CD47 interagit avec des protéines membranaires de la famille SIRP (Signal Regulatory protein), notamment SIRPα et SIRPγ (Catani et al., 2011). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires contenant trois domaines immunoglobulines (Ig)-like dans la région extracellulaire et un domaine ITIM à l'extrémité intracellulaire (Matozaki et al., 2009). Plusieurs études ont montré que : **1**.- La glycoprotéine SIRPα est faiblement exprimée par plusieurs types de cancers (Cancer de cellules hépatiques, cancer du cerveau, glioblastomes) (Wang et al., 2008) **2**.- l'augmentation de l'expression de SIRPα réduit la croissance et la migration tumorale (Chen et al., 2004 ; Li et al., 1999 ; Ruhul et al., 2002) **3**.- l'interaction SIRPα/CD47 régule la transmigration tissulaire des neutrophiles (Chin et al., 2009) **4**.- SIRPγ interagit avec le récepteur CD47 et active des cascades de signalisation contrôlant la prolifération et la migration des cellules tumorales.

Les objectifs de ce travail visaient à étudier le mécanisme des interactions cellule-cellule impliquées dans la prolifération des astrocytomes induite par les mastocytes et à considérer l'éventuelle implication du couple CD47/SIRPα.

#### **Discussion et Perspectives:**

Dans une étude précédente, nous avons montré que les mastocytes favorisent la prolifération des astrocytomes humains lorsqu'ils sont en contact avec ces cellules, ce qui suggère l'implication des protéines d'adhérences cellulaires (*Publication n°1*). Nous avons également montré que la stimulation du récepteur CD47 induit une prolifération des astrocytomes (*Publication n°2*). Dans cette étude nous observons, dans un modèle de coculture mastocytes/astrocytomes, une diminution non seulement de l'expression de CD47 (ARNm et protéine) mais également de son ligand SIRP $\alpha$  (ARNm et protéine) dans les lignées U87 et CCF-STGG1. Cette prolifération tumorale induite par les mastocytes est potentialisée

*Résultats* 153

par un anticorps bloquant dirigé contre SIRP $\alpha$  des astrocytomes (SE7C2). L'augmentation de prolifération des astrocytomes induite par les mastocytes ou/et par SE7C2 est accompagnée par une phosphorylation de protéines de la voie des MAPK à savoir Akt et ERK. L'anticorps SE7C2 favorise la prolifération des astrocytomes d'une manière dose-dépendante ainsi qu'une hyperphosphorylation de Akt, ERK et p70SK (protéine du cycle cellulaire qui favorise le passage de la phase G1 à la phase S). Ces observations corroborent ceux d'autres équipes qui ont montré que l'activation de SIRP $\alpha$  induit une signalisation intracellulaire « inhibitrice » par activation des motifs SHP-1 et SHP-2 des phosphatases PTPN6 et PTP11 *(Wang et al. 2008 ; Kapoor and O'Rourk, 2010; Alblas et al. 2005).* 

Ces résultats semblent indiquer que la prolifération des astrocytomes induite par les mastocytes serait due à l'activation d'une voie de signalisation inhibitrice impliquant d'une part un rétrocontrôle négatif de l'expression membranaire de CD47 et SIRPα et d'autre part à l'activation par hyperphosphorylation, de protéines cytosoliques comme Akt, ERK et p70SK.

## Mast cells enhance the proliferation of human astrocytomas cell lines U87 and CCF-STTG1 through the down-regulation of SIRPα and the increase of ERK1/2 and Akt phosphorylation.

Abdelaziz Boukhari et al.

Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France

#### **EN COURS DE REDACTION**

Correspondance : Jean-pierre Gies

CNRS UMR 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie Faculté de Pharmacie 74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 Illkirch FRANCE Tel: 0368854140 Fax: 03 68 85 43 13 E-mail: jean-pierre.gies@unistra.fr

Abbreviations: NHA, normal human astrocytes; RPMC, rat peritoneal mast cells; MTS, 3-

(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium);

mAb, monoclonal antibody; RT-PCR, real time-polymerase chain reaction;

#### Abstract

Signal regulatory protein, also known as SHPS-1 or SIRPa, is a transmembrane glycoprotein receptor expressed mainly in myeloid and neuronal cells. The extracellular region of the molecule is composed of immunoglobulin (Ig)-like domains that mediate recognition of the broadly expressed cellular ligand CD47. SIRPa is coupled to the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 through its cytoplasmic tail. Interaction between CD47 and SIRPa constitute a cell-cell communication system that plays important roles in a variety of cellular processes, including cell proliferation. Our objective was to study the role of SIRPa-CD47 interaction on human astrocytoma cell lines growth cocultured with rat peritoneal mast cells (RPMC). The blocking of SIRPa-CD47 interaction by SE7C2, a monoclonal antibody raised against recombinant extracellular domain of human SIRPa (SE7C2), promotes the proliferative effect of RPMC on human astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1 but not on U373 and SW-1783. Furthermore, RPMC decrease SIRPa and its ligand CD47 expression, and increase the level of ERK1/2 and AKT phosphorylation in U87 and CCF-STTG1 cell lines. This suggested that RPMC induce the proliferation of these astrocytoma cell lines by down regulation of the SIRP $\alpha$  and its ligand CD47 proteins. Other results showed that SE7C2 induces the proliferation of U87 and CCF-STTG1 cell lines and increases ERK1/2, p70s6k phosphorylation by U87 and Akt, p70s6k phosphorylation by CCFSTTG1. Our data indicate that RPMC enhance the growth of U87 and CCF-STTG1 cell lines. This effect is mediated by an inhibition of the negative signal induced by SIRPa and its ligand CD47, which increase the phosphorylation level of Akt and ERK1/2 proteins involved in cell survival. Thereby likely contributing aggressiveness enhancing proliferation. to tumor by the

#### Introduction

It is now widely accepted a functional link between inflammation and cancer. Is now well established that primary tumours are composed of a multitude of stromal cell types in addition to cancerous cells (Tlsty and Coussens, 2006). Among the stromal cell types that have been implicated in tumour promotion are endothelial cells (Joyce and Pollard, 2009), which comprise the blood and lymphatic circulatory systems, pericytes, fibroblasts and various bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs), including innate immune cells, granulocytes, dendritic cells, macrophages, natural killer cells, and mast cells, are prominent components of premalignant and malignant tissues and contribute functionally to cancer development largely through diverse molecules and pathways (Polyak et al., 2009; Tlsty and Coussens, 2006).

Among tumour-infiltrating leukocytes, mast cells abundantly accumulate at sites of tumour growth in response to numerous chemoattractants (Bischoff, 2007; Gurish and Austen, 2001). Mast cells (MCs) are hematopoietic immune cells and are dispersed throughout multiple tissues including the brain and are located mainly at the major immunologic interfaces such as skin, gut, and lung (Li et al., 1998; Nautiyal et al., 2011).

Secondary lymphoid organs including tonsils and lymph nodes show a moderate amount of mast cells in physiologic conditions, which increases in the early phases of inflammation, suggesting an active participation of mast cells in the orchestration of the immune response. (Kashiwakura et al., 2004). Over the past few years, the association between MCs and human cancer has progressively emerged and many studies have highlighted a correlation between the amount of tumor-infiltrating MCs and the degree of tumor aggressiveness and dissemination, which is in favor of a role of MCs in tumor growth (Galinsky and Nechushtan, 2008; Merluzzi et al., 2010).

Glioblastoma (GBM) is a highly malignant brain cancer characterized by uncontrolled astrocytes proliferation, diffuse infiltration, a tendency for necrosis, significant angiogenesis, intense resistance to apoptosis, and widespread genomic aberrations. Prognosis is poor and treatments are largely palliative (Kesari, 2011). Using the World Health Organization (WHO) classification system, gliomas can be classified into four different grades (Lim et al., 2011). Grade I and II low-grade astrocytomas are slow-growing less aggressive tumors while grade III and IV high grade gliomas are malignant tumors, characterized by high proliferation rate (grade III) and the presence of necrotic tissue and/or angiogenic activity (grade IV). The most

malignant form, glioblastoma multiforme (GBM, grade IV), is one of the most aggressive and lethal forms of cancer. (Maher et al., 2001).

Mast cells and astrocytes share perivascular localization (Seeldrayers et al., 1992). Astrocytes are able to maintain the viability of rat serosal mast cells *in vitro* (Seeldrayers et al., 1992), and astrocytes have receptors for histamine, a major constituent of mast cell granules (Hosli et al., 1984). In addition, astrocytes can produce cytokines or chemokines that cause MCs degranulation (Dong and Benveniste, 2001).

Signal regulatory proteins (SIRPs) constitute a family of structurally related surface receptors expressed on leukocytes as well as other cells (van den Berg et al., 2005). The SIRP family currently contains more than 15 members that vary with respect to subtle amino acid differences in their extracellular domains. The family was further divided into two types,  $\alpha$ and  $\beta$ , which differ by the presence (SIRP $\alpha$ ) or absence (SIRP $\beta$ ) of a cytoplasmic SHP-2binding domain (Kapoor et al., 2004; Kharitonenkov et al., 1997). SIRPa, also known as SHPS-1, SIRPA, and p84, is described as a transmembrane phosphoproteins that coprecipitated with SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatases (Kapoor et al., 2004), and contained three immunoglobulin (Ig)-like domains in its extracellular region and putative tyrosine phosphorylation sites in its cytoplasmic region (Kharitonenkov et al., 1997; Matozaki et al., 2009). These transmembrane receptors have been shown to exert negative effects on signal transduction by receptor tyrosine kinases via immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs in the carboxyl domain. SIRP $\alpha$  can bind SHP-2 in the form of tyrosine phosphorylation by SH2 effect and negatively regulate growth factors, oncogenes, (Kharitonenkov et al., 1997; van den Berg et al., 2005) or insulin-induced responses (Li et al., 1998). found that the expression of SIRPa1 is down regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and cells. It is closely related to tumor growth and invasiveness, suggesting that SIRPa1 might be an important negative regulator of HCC during carcinogenesis and development (Qin et al., 2006).

CD47 is a ligand for the extracellular region of SIRP $\alpha$  (Sick et al., 2011). This protein, which was originally identified in association with the integrin  $\alpha_v\beta_3$  (hence its alternative name 'integrin-associated protein' [IAP]), is also a member of the Ig superfamily, possessing a Vtype Ig-like extracellular domain, five putative membrane-spanning segments and a short cytoplasmic tail (Matozaki et al., 2009). The extracellular region of CD47 is also responsible for its association with the integrin  $\beta_3$  subunit (Sick et al., 2011). Interaction between CD47 and SIRP- $\alpha$  constitutes a cell-cell communication system that plays important roles in a variety of cellular processes, including cell migration, T cell activation, B and T cell apoptosis in the immune system (Kurihara et al., 2010). In particular, the CD47-SIRP- $\alpha$  system is implicated in the negative regulation of phagocytosis by macrophages (Matozaki et al., 2009). This is called a "don't eat me signal," which is mediated by SHP-1 and SHP-2 downstream of SIRP- $\alpha$  (Kinchen et al., 2008; Kurihara, 2010). Our objective was to study the effect of MCs on human astrocytoma cell lines growth. We therefore hypothesized that mast cells may interact with astrocytes via interactions of cell surface molecules CD47-SIRP $\alpha$  in the brain. To pursue this hypothesis, we investigated the signaling pathways activated in astrocytoma during coculture with mast cells.

We demonstrated that MCs cocultured with human astrocytoma cell lines promote the proliferation and migration of astrocytoma, and the blocking of CD47 receptor and SIRP $\alpha$  interaction by SE7C2 mAb potentiates the proliferative effect of mast cells on astrocytoma. Furthermore, mast cells decrease the CD47 receptor and SIRP $\alpha$  mRNA expression, which suggests that mast cells induce the proliferation of astrocytoma cell lines by down regulation of these proteins. Other results showed that SE7C2 mAb induces the proliferation of astrocytoma cell lines and increases ERK, Akt, p70s6k phosphorylation which are involved in tumoral development. However, the role of mast cells activated in the brain cancer is not yet clarified. Therefore, we hypothesized that both cells are bi-directionally activated *in vitro*, and examined the signaling pathways and role of mast cells in the co-culture system.

#### Materials and methods

#### **Antibodies and Reagents**

The anti-SIRPα SE7C2 and anti-CD47 B6H12 mAb were from BD Biosciences (San Diego, CA). Mouse IgG, secondary horseradish peroxidaseconjugated antibodies, anti-phospho AKT (Ser473), anti-AKT, anti- p70SK and anti-actin monoclonal antibodies (mAb) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Rabbit polyclonal anti-ERK mAb (Assay design) and anti-phosphoERK mAb (Biosource) All other reagents were from Sigma (St. Louis, MO).

#### **Cell Lines and Culture Conditions**

Human U87 astrocytoma Grade IV (World Health Organization) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, IN), CCF-STTG1 cell Grade IV, U373 cell Grade III, SW-1783 cell Grade III were obtained from European Collection of Cell Culture (l'ECACC, Salisbury, UK) and normal human astrocytes (NHA) from (Lonza, Walkersville, USA). NHA was maintained in astrocyte basal medium (ABM<sup>TM</sup>) from (Lonza, Walkersville, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/mL gentamycin, 100 UI/mL penicillin, and 50  $\mu$ g/mL streptomycin from (Lonza, Verviers, Belgium). Human U87 and U373 astrocytomas were maintained in EMEM medium, SW1783 and CCF-STTG1 astrocytomas were maintained in Leibovitz medium (L-15) and RPMI 1640 respectively, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/mL gentamycin, 100 UI/mL penicillin and 50  $\mu$ g/mL streptomycin.

Culture medium and supplies were from Lonza. Primary normal human astrocytes were used for experiments between the first and the fourth passage. Cells were grown at  $37^{\circ}$ C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air.

#### Isolation and purification of mast cells

All animal care and experimental procedures were in accordance with Institutional policies (N° D-67- 218-26, Direction Départementale des Services Vétérinaires du Bas-Rhin). Mature mast cells were isolated as previously described (Ferry et al., 2001). Briefly, male Wistar rats (250–350 g, 12–14 weeks old), raised in the animal house facilities in the Faculty of Pharmacy, were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg·kg-1 ip), before exsanguination. Buffer (10 mL of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.3 mM CaCl2, 1.0 mM MgCl2, 0.4 mM NaH2PO4, 5.6 mM glucose, 10 mM HEPES and NaOH to pH 7.4)

supplemented with 0.1% BSA was injected i.p. Peritoneal fluid was collected after gentle abdominal massage and centrifuged for 3 min at 180x g. The pellet of mixed peritoneal cells was resuspended in the same buffer and mast cells were purified by centrifugation for 10 min at 220x g on a discontinuous BSA gradient (30% and 40%). The approximate yield of mast cells was 1–1.5 x  $10^6$  cells per animal. The pellet was then resuspended and mast cells were examined under a light microscope for viability (>95%) and purity (>97%) using Trypan blue and toluidine blue respectively.

#### Co-culture of human astrocytomas cell lines with RPMC

Astrocytomas cell lines U87, CCF-STTG1, U373 and SW-1783  $(1x10^5)$  were co-cultured in the presence of  $2.5x10^4$  RPMC (Rat peritoneal mast cells) (ratio RPMC/astrocytes 1/4) or in the presence of  $5x10^4$  RPMC (ratio 1/2) and 2.5 µg/ml of SE7C2 mAb.

#### MTS assay

Cells were seeded in triplicate on 96-multiwell plates at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well, 24 hours after growth, replace the medium with 100µl fresh medium, and traited the cells by The anti-SIRP $\alpha$  SE7C2 mAb at different concentrations for an additional 24 h. Cell proliferation rate was then assessed by colorimetric assay using the CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), following the manufacturer's recommendations (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Absorbance was measured at 492 nm on a multiwell ELISA plate reader.

#### **RNA Extraction and RT-PCR**

Total RNA was extracted from cells with PureZOLTM reagent (BioRad) according to manufacturer's recommendations. Reverse transcription was done using 500 ng total RNA with the SuperScript<sup>TM</sup>III First-strand synthesis system (Invitrogen, Paisley, UK) according to manufacturer's protocol. Amplification was assessed using 1 lmL RT products in a mixture containing 200 μM of each dNTP, 0.5 lM oligonucleotide primers, 1x Phusion HF buffer, and 0.02 U/IL Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). PCR primers 5'-GGGTCAGCACCACCTTGGCT-3' (forward) and 5'-GGCGGGTGAGGAGGAGGAGCTGC AGGTGAT-3' (reverse) were used to detect SIRPα. PCR primers 5'-CCTATATCC TCGCTGTGGTT-3' (forward) and 5'-ACTTTTCTTGTTT CTTCTCC-3' (reverse) was used to detect CD47 mRNA.PCR primers 5'-TGAAG GTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'

(forward) and 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (reverse) were used to detect GAPDH mRNA. Cycling parameters were: 95°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s for 30 cycles, followed by a final elongation at 72°C for 5 min. PCR products were run on 2% agarose gels stained with 1  $\mu$ g/mL ethidium bromide. As a negative control, cDNA was omitted from the reaction mixture, with no observed amplified band. This ensures that no exogenous contamination was present in our experiments. Image J software (NIH freeware) was used for densitometry analysis. For NHA, PCR data were similar over passages 1 to 4.

#### Western Blotting

Cells were grown in 6-well plates to 70% confluency and treated in serum-free RPMI-1640 for CCF-STTG1 cell line and EMEM for U87 cell line. Cells were then washed with cold PBS and lysed with ice-cold RIPA buffer (150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, and a protease inhibitor mixture tablet) After centrifugation at 14,000g for 10 min at 4°C, supernatants were boiled for 5 min in Laemmli sample buffer supplemented with 50 mM DTT. Equal amounts of lysed and boiled protein (30 µg/well) were loaded and subjected to electrophoresis on 10% polyacrylamide gels (BioRad). Separated proteins were electrophoretically transferred to PVDF membranes (GE Healthcare), which were then blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat dried milk (BioRad). Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody. Concentrations were chosen according to the manufacturer's instructions. Secondary horseradish peroxydase-conjugated antibody was incubated for 1 h at room temperature and proteins were detected using an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare).

#### **Statistical Analysis**

Results are presented as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was done using ANOVA. Significant differences are represented throughout as \*P < 0.05, \*\*P < 0.001, \*\*\*P < 0.0001.

#### **Results**

Function-Blocking CD47-SIRPα interaction antibodies potentializes the proliferative effect of mast cells on human astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1 Proliferation but not effect on U373 and SW-1783 cell lines.

As shown in Fig. 1A, after 24 h, U87 cell growth assessed by MTS was increased by 50% in the presence of  $2.5 \times 10^4$  mast cells (ratio 1/4) and by 55% in the presence of  $5 \times 10^4$  mast cells (ratio 1/2). When The U87 cells were treated with SE7C2 mAb ( $2.5 \mu$ g/ml) and co-cultured with mast cells (ratio 1/4 and 1/2) cell growth increased by 90%. CCF-STTG1 cell growth assessed by MTS was also increased by 40% in the presence of mast cells (ratio 1/2) and 55% when CCF-STTG1 cells were treated with SE7C2 mAb ( $2.5 \mu$ g/ml) (Fig. 1B).

In contrast, U373 and SW1783 cell growth assessed by MTS was not modified by the presence of mast cells with SE7C2 mAb ( $2.5\mu g/ml$ ) or not after 24 h (Fig. 1C et 1D).

#### Expression of CD47 receptor and SIRPa by human astrocytoma cell lines.

We have demonstrated that SIRP $\alpha$ 1 and CD47 receptor are expressed in human astrocytoma cell lines U87, CCF-STTG1, U373, SW-1783 and 1321N1 and normal human astrocytes (NHA) by western blot using antibody against human SIRP $\alpha$  (SE7C2 mAb) and CD47 receptor (B6H12 mAb). We next examined expression of SIRP $\alpha$  and CD47 transcripts on all cell lines by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). We used specific probes of human SIRP $\alpha$  and CD47 receptor. The results, shown in Fig. 2, demonstrate that U87 and U373 cells were previously shown to express similar levels of CD47 (Chen et al., 2004), and no difference of CD47 expression on CCF-STTG1,U373, SW-1783, 1321N1 cell lines and NHA. While CD47 is thought to be ubiquitously expressed (Brown and Frazier, 2001). By RT-PCR, mRNA for CD47 was detected in astrocytoma cell lines, and NHA at levels that were not different for the all cell types (Fig. 2A). Western blots were also done to confirm expression of CD47 receptors at the protein level in our cells (Fig. 2C). Whereas astrocytoma cell lines and NHA expressed similar levels of CD47.

The above-mentioned studies demonstrated that SIRPs are frequently present on astrocytoma cell lines (Chen et al., 2004), and differential endogenous expression of SIRP $\alpha$ 1 transcripts in different glioblastoma cell lines, with LN229 and U373MG cells (Kapoor and O'Rourke, 2010). As shown in Fig. 2 (B, D) that SIRP $\alpha$ 1 is expressed in all U87,CCF-STTG1, U373,SW-1783, 1321N1 astrocytoma cells and normal human astrocytes (NHA), we next

examined expression of SIRP $\alpha$  transcripts on all cell lines by RT-PCR. We used specific probes of human SIRP $\alpha$ 1.

## Down regulation of CD47 receptor and SIRPα mRNA and proteins expression on human astrocytoma co-cultured with mast cells.

SIRP $\alpha$  and CD47 receptor mRNA expression by U87 and CCF-STTG1 cell lines in cocultures where mast cells were in direct contact with astrocytoma was assessed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using a specific probes of human SIRP $\alpha$  and CD47. After 5 h, whole cell mRNA from U87 cells (Fig.3A) and CCF-STTG1 cells (Fig.3C) were analyzed by RT-PCR. The data showed that SIRP $\alpha$  and CD47 mRNA expression was significantly decreased in the presence of mast cells (Fig. 3). The proteins level of SIRP $\alpha$  and its ligand CD47 was assaed by Western blot (Fig.4). The results show that the protein level of SIRP $\alpha$  and its ligand CD47 also decreased on humans astrocytoma cell lines U87 (Fig.4A) and CCF-STTG1 (Fig.4C) in presence of mast cells.

## Mast cells and SE7CE mAb increase the levels of Erk and Akt phosphorylation in human astrocytoma cell lines.

To further establish that CD47-SIRP $\alpha$  interaction can be implicated in the mast cells and astrocytoma cell lines interaction, we examined the effect of mast cells and SIRP $\alpha$  mAb SE7C2 on the phosphorylation of ERK and Akt. For these studies, astrocytoma cell lines were co-cultured with mast cells and pre-treated or not with the 2.5µg/ml of SE7C2 mAb for 24h at 37°C. Whole cell lysates from U87 cells (Fig.4A) and CCF-STTG1 cells (Fig.4B) were analyzed by Western blotting (WB). The data showed that mast cells increase the level of ERK phosphorylation in U87 (A) and Akt phosphorylation in CCF-STTG1 (B), furthermore, the blocking of CD47-SIRP $\alpha$  interaction using SE7C2 mAb, potentialize the effect of mast cells on ERK and Akt phosphorylation in U87 and CCF-STTG1 cell lines.

### The blocking of CD47 Receptor-SIRPα interaction by SE7CE mAb induces Proliferation of Astrocytoma cell lines.

To evaluate the effects of CD47-SIRP $\alpha$  interaction blocking on astrocytoma cell growth using SE7C2 mAb, it was necessary to determine the dose-dependent effect of SE7C2 mAb on cell viability. For this purpose, cells were treated with different concentrations of SE7C2 mAb 1.5µg/ml and 2.5µg/ml for 24 h. Cell Proliferation was quantified using the colorometric test MTS. As indicated in Fig. 6, after 24 h treatment with SE7C2 mAb (1.5 and 2.5µg/ml), the

proliferation of U87 (Fig.6A), CCF-STTG1 (Fig.6B), U373 (Fig.6C) and SW-1783 (Fig.6D) cells was increased in a concentration-dependent manner (Fig. 6). A maximal twofold increase in proliferation was reached at 2.5µg/ml of SE7C2 mAb.

## The SE7CE mAb increase the level of Erk, p70s6k phosphorylation in U87 cell line and Akt, p70s6k phosphorylation in CCF-STTG1 cell line.

As shown in (Fig. 7A), incubation of U87 cell line with  $2.5\mu/ml$  of SE7CE mAb for 5 to 180 min revealed a time-dependent increase the level of Erk phosphorylation. Incubation of CCF-STTG1 with the same concentration of SE7CE mAb for 0.5 to 24h increases the level of Akt phosphorylation (Fig. 7C). Upon treatment with two concentration of SE7CE mAb (1.5 and  $2.5\mu/ml$ ), a dose-dependent increase in phosphorylation of both Erk and p70s6k was observed in U87 cell line (Fig. 7B), Akt and p70s6k in CCF-STTG1 cell line (Fig. 7D).

#### Discussion

The major compelling element strengthening the need for a deep understanding of mast cellsastrocytoma cells interactions is the long-standing evidence of the association between mast cells (MCs) and tumoral development (Samoszuk et al., 2005). MC have a widespread distribution in the brain, endocrine glands, intestine, liver, kidney, skin, tongue and lungs (Baccari et al., 2011), (Silver et al., 1996), which were described over a century ago by Paul Ehrlich (Amin, 2012). Since then, many other reports have focused on the abundance of MCs at sites of tumor growth in response to numerous chemoattractants. These could include tumor-derived peptides as well as RANTES or monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (Theoharides and Conti, 2004). Mast cell precocious infiltration in several types of tumours has been described, including astrocytoma (Sharma et al., 2004), and has been implicated in tumor growth and is associated with poor prognosis (Molin et al., 2002). Mast cells might be recruited by the tumor for its benefit; they might accumulate in reaction to the tumor, which somehow prevents their degranulation (Theoharides and Conti, 2004).

In this study, we first provide the effect of mast cells on astrocytoma cells growth in vitro. Our data demonstrate that mast cells can directly enhance human astrocytoma cells U87 and CCF-STTG1 (WHO grade IV) proliferation but no effect on human astrocytoma cells U373 and SW-1783 (WHO grade III). We found that mature serosal type mast cells stimulated U87 and CCF-STTG1 cell growth when direct cell-to-cell contact was allowed (Fig.1).

We have showed that proliferative effect of mast cell on astrocytomas requires direct cell-tocell contact, suggesting the involvement of adhesion proteins. Our hypothesis is that CD47 receptor-SIRP $\alpha$  interaction may be involved; several studies have confirmed its involvement in tumor development (Qin et al., 2006). In this study we blocked the CD47-SIRP $\alpha$ interaction by a monoclonal antibody SE7C2 and evaluate the behavior of astrocytomas cocultured with mast cells. The data showed that CD47-SIRP $\alpha$  interaction blocking mAb SE7C2 potentialize the mast cells proliferative effect on human astrocytomas (Fig.1).

SIRP $\alpha$  is a member of SIRP $\alpha$  families containing a 24-residue transmembrane domain, which can be separated into extracellular portion containing 3 Ig-like structures from the cytoplasm region including 4 potential tyrosine phosphorylation sites and a proline-rich region. As an activated Receptor tyrosine kinases (RTKs) substrate, SIRP $\alpha$  can bind SHP-2 in the form of tyrosine phosphorylation by Src homology 2 (SH2) effect and negatively regulate growth factor and oncogene (Li et al., 1998, 1999; Qin et al., 2006). found that the expression of SIRP $\alpha$  was down-regulated in several cancers including hepatocellular carcinoma tissues and cells (Qin et al., 2006), and was closely related to the tumor growth and invasiveness, suggesting that CD47-SIRP $\alpha$  interaction might be an important negative regulator of human astrocytoma development.

In first time, we confirmed the expression of both SIRPa and CD47 receptor on astrocytoma cell lines and mast cells by western blot and RT-PCR. The data showed that no difference of CD47 receptor expression in astrocytoma cell lines, although levels of SIRPa expression vary considerably (Fig.2). Second, we studied the effect of mast cells on the SIRPa and CD47 receptor mRNA expression in astrocytomas, as shown in figure (3 & 4). We showed by RT-PCR and Western blot that the mast cells down regulated SIRPa and its ligand CD47 mRNA expression and their proteins level in human astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1 using the human specific primers antibody (Fig.3 & 4). This suggests that mast cells promote the proliferation of astrocytomas through down regulation of SIRPa protein and its ligand CD47 mRNA expression. Furthermore, several study showed that SIRPa has a long intracellular domain that contains four tyrosine residues to form two immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIMs) and this type of signaling structure is highly conserved between mice, rats and humans (Liu et al., 2008). Studies have suggested that binding of SIRPa with its extracellular ligand CD47 results in phosphorylations of SIRPa ITIMs, which in turn, leads to their association with SH2-domain-containing protein tyrosine phosphotases SHP-1 and SHP-2 (Kharitonenkov et al., 1997) to delivers signals that regulate a variety of cellular functions (Kharitonenkov et al., 1997). Ligation of SIRPa by antibody or CD47 recombinant inhibits many leukocyte functions, including tumour-necrosis factor production (Smith et al., 2003) and in vitro transmigration (de Vries et al., 2002). Negative regulatory role of SIRPa has also been found in tumor metastasis, survival, and cell transformation (Liu et al., 2008).

The down regulation of SIRP $\alpha$  and its ligand CD47 expression by astrocytomas cocultured with mast cells accompanied by an increase the level of ERK1/2 and Akt phosphorylation in U87 and CCF-STTG1cell lines (Fig.5). Furthermore, this phosphorylation further increases in the presence of the SIRP $\alpha$ -CD47 interaction blocking mAb SE7C2 (Fig.5), which correlated with the proliferation of astrocytomas cocultered with mast cells and pre-treated with mAb SE7C2 (Fig.1).

To better understand the involvement of SIRP $\alpha$ -CD47 interaction, we treated U87, CCF-STTG1, U373 and SW-1783 cell lines with two concentrations of mAb SE7C2 (1.5 and 2.5µg/ml) and evaluate their effect on the proliferation of astrocytomas, the data showed that blocking of the CD47-SIRP $\alpha$  interaction by SE7C2 enhances the proliferation of astrocytoma cell lines a dose dependent manner (Fig.6), and increases the phosphorylation level of intracellular proteins involved in tumor development ERK1/2, Akt and p70SK (Fig.7). This can be explained by an inhibition of the coupling SIRP $\alpha$ -SHP-1 and SHP-2 by mAb SE7C2 which promotes hyperphosphorylation of these proteins and potentialize the proliferative effect of mast cells on astrocytomas cell lines by other pathways like cytokines secretion (unpublished).

#### Conclusion

We show that mast cells stimulate WHO grade IV U87 and CCF-STTG1 astrocytoma cell growth but do not affect the WHO grade III U373 and SW-1783, and this effect was dependent on cell-to-cell contact. The blocking of SIRP $\alpha$ -CD47 interaction potentializes proliferative effet of mast cells on astrocytomas. We show that mast cells downregulated of SIRP $\alpha$  and its ligand CD47 mRNA expression by astrocytomas and were accompanied by an increase of the level of ERK and Akt phophorylation by astrocytoma cell lines U87 and CCF-STTG1. The blocking of SIRP $\alpha$ -CD47 interaction also enhanced the growth of U87, CCF-STTG1, U373 and SW-1783 cells in dose dependent manner, and increases the phosphorylation level of proteins involved in glioma development ERK1/2, Akt and p70SK. These results point to precocious infiltration of mast cells as being critical in conditioning the tumour microenvironment. Taken together, our *in vitro* data are consistent with mast cells playing key roles in promoting astrocytoma cell proliferation through cell to cell interaction proteins like SIRP $\alpha$ -CD47 interaction, thereby enhancing malignant progression in the brain.

### Acknowledgements.

This study was supported by a grant of the Ligue contre le Cancer (to J.P.Gies from the Comité du Haut-Rhin), France

#### References

- Amin, K. (2012). The role of mast cells in allergic inflammation. Respiratory medicine 106, 9-14.
- Baccari, G.C., Pinelli, C., Santillo, A., Minucci, S., and Rastogi, R. Mast cells in nonmammalian vertebrates: an overview. International review of cell and molecular biology 290, 1-53.
- Baccari, G.C., Pinelli, C., Santillo, A., Minucci, S., and Rastogi, R.K. (2011). Mast cells in nonmammalian vertebrates: an overview. International review of cell and molecular biology 290, 1-53.
- Bischoff, S.C. (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. Nat Rev Immunol 7, 93-104.
- Brown, E.J., and Frazier, W.A. (2001). Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. Trends in cell biology 11, 130-135.
- Chen, T.T., Brown, E.J., Huang, E.J., and Seaman, W.E. (2004). Expression and activation of signal regulatory protein alpha on astrocytomas. Cancer research *64*, 117-127.
- de Vries, H.E., Hendriks, J.J., Honing, H., De Lavalette, C.R., van der Pol, S.M., Hooijberg,
  E., Dijkstra, C.D., and van den Berg, T.K. (2002). Signal-regulatory protein alpha-CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. J Immunol *168*, 5832-5839.
- Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. Glia 36, 180-190.
- Galinsky, D.S., and Nechushtan, H. (2008). Mast cells and cancer--no longer just basic science. Critical reviews in oncology/hematology 68, 115-130.
- Gurish, M.F., and Austen, K.F. (2001). The diverse roles of mast cells. The Journal of experimental medicine 194, F1-5.
- Hosli, L., Hosli, E., Schneider, U., and Wiget, W. (1984). Evidence for the existence of histamine H1- and H2-receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system. Neuroscience letters 48, 287-291.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. Nature reviews 9, 239-252.
- Kapoor, G.S., Kapitonov, D., and O'Rourke, D.M. (2004). Transcriptional regulation of signal regulatory protein alpha1 inhibitory receptors by epidermal growth factor receptor signaling. Cancer research 64, 6444-6452.

- Kapoor, G.S., and O'Rourke, D.M. (2010). SIRPalpha1 receptors interfere with the EGFRvIII signalosome to inhibit glioblastoma cell transformation and migration. Oncogene *29*, 4130-4144.
- Kashiwakura, J., Yokoi, H., Saito, H., and Okayama, Y. (2004). T cell proliferation by direct cross-talk between OX40 ligand on human mast cells and OX40 on human T cells: comparison of gene expression profiles between human tonsillar and lung-cultured mast cells. J Immunol 173, 5247-5257.
- Kinchen, J. M and Ravichandran, K. S. (2008). Phagocytic signaling: you can touch, but you can't eat. Curr Biol 18, 521-524.
- Kesari, S. (2011). Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. Seminars in oncology *38 Suppl 4*, S2-10.
- Kharitonenkov, A., Chen, Z., Sures, I., Wang, H., Schilling, J., and Ullrich, A. (1997). A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. Nature *386*, 181-186.
- Kurihara, H. Harita, Y. Ichimura, K. Hattori, S and Sakai, T. (2010). SIRP-alpha-CD47 system functions as an intercellular signal in the renal glomerulus. Am J Physiol Renal Physiol 299, 517-527.
- Li, B., Wang, H., and Chen, Z. (1998). [Expression of signal-regulatory protein alpha (SIRP alpha) in hepatocellular carcinoma]. Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology] 20, 345-347.
- Li, B., Wang, H., and Chen, Z. (1999). [The association between signal-regulatory protein alpha and hepatocellular carcinoma]. Zhonghua yi xue za zhi 79, 268-270.
- Lim, S.K., Llaguno, S.R., McKay, R.M., and Parada, L.F. (2011). Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models. BMB reports *44*, 158-164.
- Liu, D.Q., Li, L.M., Guo, Y.L., Bai, R., Wang, C., Bian, Z., Zhang, C.Y., and Zen, K. (2008).
   Signal regulatory protein alpha negatively regulates beta2 integrin-mediated monocyte adhesion, transendothelial migration and phagocytosis. PloS one *3*, e3291.
- Maher, E.A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavenee, W.K., and DePinho, R.A. (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. Genes & development 15, 1311-1333.
- Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H., and Ohnishi, H. (2009). Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. Trends in cell biology *19*, 72-80.

- Merluzzi, S., Frossi, B., Gri, G., Parusso, S., Tripodo, C., and Pucillo, C. (2010). Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgAsecreting plasma cells. Blood *115*, 2810-2817.
- Molin, D., Edstrom, A., Glimelius, I., Glimelius, B., Nilsson, G., Sundstrom, C., and Enblad, G. (2002). Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma. British journal of haematology *119*, 122-124.
- Nautiyal, K.M., Liu, C., Dong, X., and Silver, R. (2011). Blood-borne donor mast cell precursors migrate to mast cell-rich brain regions in the adult mouse. Journal of neuroimmunology 240-241, 142-146.
- Polyak, K., Haviv, I., and Campbell, I.G. (2009). Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. Trends Genet 25, 30-38.
- Qin, J.M., Yan, H.X., Liu, S.Q., Wan, X.W., Zeng, J.Z., Cao, H.F., Qiu, X.H., Wu, M.C., and Wang, H.Y. (2006). Negatively regulating mechanism of Sirpalpha1 in hepatocellular carcinoma: an experimental study. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 5, 246-251.
- Samoszuk, M., Kanakubo, E., and Chan, J.K. (2005). Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumors and evidence that mast cell heparin interferes with the growth of tumor cells through a mechanism involving fibroblasts. BMC cancer *5*, 121.
- Seeldrayers, P.A., Levin, L.A., and Johnson, D. (1992). Astrocytes support mast cell viability in vitro. Journal of neuroimmunology *36*, 239-243.
- Sharma, M.C., Ralte, A.M., Gaekwad, S., Santosh, V., Shankar, S.K., and Sarkar, C. (2004). Subependymal giant cell astrocytoma--a clinicopathological study of 23 cases with special emphasis on histogenesis. Pathol Oncol Res 10, 219-224.
- Sick, E. Boukhari, A. Deramaudt, T. Ronde, P. Bucher, B. Andre, P. Gies, J. P and Takeda, K. (2011). Activation of CD47 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an Akt-dependent pathway. Glia 59, 308-319.
- Silver, R., Silverman, A.J., Vitkovic, L., and Lederhendler, II (1996). Mast cells in the brain: evidence and functional significance. Trends in neurosciences *19*, 25-31.
- Smith, R.E., Patel, V., Seatter, S.D., Deehan, M.R., Brown, M.H., Brooke, G.P., Goodridge,
  H.S., Howard, C.J., Rigley, K.P., Harnett, W., *et al.* (2003). A novel MyD-1 (SIRP-1alpha) signaling pathway that inhibits LPS-induced TNFalpha production by monocytes. Blood *102*, 2532-2540.
- Theoharides, T.C., and Conti, P. (2004). Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. Trends in immunology 25, 235-241.
- Tlsty, T.D., and Coussens, L.M. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. Annual review of pathology *1*, 119-150.

van den Berg, T.K., van Beek, E.M., Buhring, H.J., Colonna, M., Hamaguchi, M., Howard, C.J., Kasuga, M., Liu, Y., Matozaki, T., Neel, B.G., *et al.* (2005). A nomenclature for signal regulatory protein family members. J Immunol 175, 7788-7789.
## **Figure legends**

**Figure 1.** Effects of rat peritoneal mast cells (RPMC) and anti-SIRP $\alpha$  SE7C2 mAb on growth of U87 cell (A), CCF-STTG1 (B), U373 cells (C) and SW1783 (D). Astrocytoma cell lines (1x10<sup>5</sup>) were co-cultured in the presence of 2.5x10<sup>4</sup> RMPC (ratio RPMC/astrocytes 1/4) or in the presence of 5x10<sup>4</sup> RMPC (ratio 1/2). Astrocytoma were pre-treated by anti-SIRP $\alpha$  SE7C2 mAb (2.5µg/mL) for 2h or left untreated. Proliferation was assessed by MTS after 24 h incubation at 37°C. Data are mean±sem of 3 independent experiments (\**P*<0.05, \*\**P*<0.001, \*\*\**P*<0.0001).

**Figure 2.** Expression of CD47 and SIRP $\alpha$  mRNA and their proteins expression were assessed by PCR and Western blot respectively, in human astrocytomas cell lines (U87, U373, SW-1783, CCF-STTG1) and normal human astrocyte (NHA) (Data are representative of three independent experiments). A: CD47 mRNA expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage normalized with GAPDH. (Data are mean ± SEM of three independent experiments \*p < 0.05, \*\*p<0.001). B: SIRP $\alpha$  mRNA expressions were analyzed by densitometry and represented as percentage normalized with GAPDH (Data are mean ± SEM of three independent experiments \*p < 0.05, \*\*p<0.001). CD47 and SIRP $\alpha$  proteins levels were assessed by Western blotting in human astrocytomas cell lines (U87, U373, SW-1783, CCF-STTG1) and normal human astrocyte (NHA) in C and D respectively (Data are representative of three independent experiments) (\*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.001).

**Figure 3.** Effects of RMPC on CD47 and SIRP $\alpha$  mRNA expression in U87 cells (A) and CCF-STTG1 cells (C). Astrocytoma cells (5x10<sup>5</sup>) were incubated with or without 1.25x10<sup>5</sup> RMPC (ratio RPMC/astrocytes 1/4) or in the presence of 2.5x10<sup>5</sup> RMPC (ratio 1/2) for 4h at 37°C. The whole cell lysates were analyzed by Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers of human CD47 and SIRP $\alpha$ . The data are representative of three independent experiments. mRNA expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with control U87 cell (B) and CCF-STTG1 cell (D). (\**P*<0.05, \*\**P*<0.001, \*\*\**P*<0.0001).

**Figure 4.** Effects of RMPC on CD47 and SIRP $\alpha$  proteins level in U87 cell (A) and CCF STTG1 cell (C). Astrocytoma cells (5x10<sup>5</sup>) were incubated with or without 1.25x10<sup>5</sup> RMPC (ratio RPMC/astrocytes 1/4) or in the presence of 2.5x10<sup>5</sup> RMPC (ratio 1/2) for 24h at 37°C. The whole cell lysates were analyzed by Western blot using specific antibody of CD47 and SIRP $\alpha$ . The data are representative of three independent experiments. Protein expression

levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with control in U87 cell (B) and CCF-STTG1 cell (D) (\*P<0.05).

**Figure 5.** Effects of mast cells and anti-SIRPα SE7C2 mAb on ERK1/2 phosphorylation level in U87 cells (A) and Akt phosphorylation level in CCF-STTG1 cells (B). Astrocytoma cell lines ( $10^5$  cells) were co-cultured with or without  $1.25 \times 10^5$  RMPC (ratio RPMC/astrocytes 1/4) or  $2.5 \times 10^5$  RMPC (ratio 1/2) and incubated with or without SE7C2 mAb ( $2.5 \mu g/m$ )) at 37°C for 24h. Whole cell lysates were analyzed by Western blotting using mAbs against ERK1/2, phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), Akt and phosphorylated Akt (P-Akt); blots are representative of 3 independent experiments. ERK1/2 and Akt phosphorylation levels were analyzed by densitometry and represented as normalized value with β-actin in U87 cell (C) and CCF-STTG1 cell (D). (\**P* < 0.05).

**Figure 6.** Effects of anti-SIRP $\alpha$  SE7C2 mAb on U87 cells (A), CCF-STTG1 cells (B), U373 cells (C), and SW-1783 cells (D) proliferation. Astrocytoma cell lines (5x10<sup>3</sup>) were incubated with the indicated compounds for 24h at 37°C. Proliferation was then assessed by MTS. Data are mean ± SEM of 3 independent experiments (\**P*< 0.05, \*\**P*<0.001).

**Figure 7.** Time-dependent effects of anti-SIRP $\alpha$  SE7C2 mAb on ERK1/2 phosphorylation level in U87 cell (A) and Akt phosphorylation level in CCF-STTG1 cell (C). Cells were incubated with SE7C2 mAb (2.5µg/ml) at 37°C for the indicated times and whole cell lysates were analyzed by Western blotting using mAbs against ERK1/2, Akt and phosphorylated ERK1/2 (p-Erk), Akt (p-Akt); blots are representative of 3 independent experiments.

Concentration-dependent effects of SE7C2 mAb on ERK1/2 and p70s6k phosphorylation in U87 cell (B), Akt and p70s6k phosphorylation in CCF-STTG1 cell (D). Cells were treated by (1.5 and  $2.5\mu$ g/ml) for 24h at 37°C. Blots are representative of 3 independent experiments.









Figure 1















Figure 2









Figure 3

D





Figure 4





D





Figure 5





С







Figure 6



Figure 7

# **Publication 5**

## Rôle du récepteur CD40 et de son ligand CD40L dans les astrocytomes

#### Publication n°5 (en préparation):

Activation of CD40 receptors causes proliferation of human astrocytoma but not normal astrocytes via an IL-6-dependent pathway

#### **Objectifs de l'étude:**

Le récepteur CD40, est une glycoprotéine membranaire de classe-I comportant un segment transmembranaire et dont la partie extracellulaire est homologue à celle des membres de la famille du récepteur du TNF (*Van Kooten and Banchereau, 2000*). Son ligand le CD40L ou CD154 est une glycoprotéine membranaire présentant également des homologies de séquence avec les molécules de la famille TNF (tumor necrosis factor TNF) (*Yahsou Delmas et al., 2005*). Les deux protéines sont exprimées par une variété de cellules (monocytes, lymphocytes B, astrocytomes humain, mastocytes, cellules musculaires lisses et fibroblastes) (*Chatzigeorgiou et al., 2009 ; nbeck et al., 2000*). Des études ont montré que l'interaction CD40 et CD154/CD40L favorise l'expression de cytokines, chemiokines, métalloprotéinases, facteurs de croissance et de molécules d'adhérence, principalement par le biais de la stimulation de NF-KB (*nbeck et al., 2000; Chatzigeorgiou et al., 2009*). Ces observations suggèrent une implication potentielle de ces deux glycoprotéines dans la sécrétion de métalloproteinases et de cytokines pro-inflammatoires et/ou anti-inflammatoires que nous observons dans nos co-cultures « mastocyte-astrocytome ».

Les objectifs de ce travail visaient à étudier l'implication potentielle du récepteur CD40 dans la prolifération des astrocytomes induite par les mastocytes.

#### **Discussion et Perspectives:**

Dans un premier temps nous avons montré que les lignées d'astrocytomes U87 et U373 ainsi que les astrocytes normaux humains expriment le récepteur CD40 à des taux similaires tandis que l'expression du ligand CD40L serait plus importante dans les astrocytomes en comparaison avec les astrocytes. L'activation du récepteur CD40 par son ligand CD40L favorise la prolifération des lignées d'astrocytomes. Cette prolifération est bloquée de manière dose dépendante par un anticorps dirigé contre le récepteur CD40, (SC-974).

L'activation du récepteur CD40 augmente également la phosphorylation de IĸB- $\alpha$  ainsi que l'expression des ARNm de l'interleukine-6. Ces effets sont bloqués par l'anticorps anti-CD40 de manière dose-dépendante. Ces résultats suggèrent une implication de NF- $\kappa$ B dans l'expression du gène de l'IL-6 car la phosphorylation de I $\kappa$ B- $\alpha$  pourrait favoriser la translocation de NF-KB dans le noyau, mais ceci reste à confirmer. Par contre, dans les astrocytes humains l'activation ou le blocage du récepteur CD40 n'ont aucun effet sur la prolifération ou l'expression des ARNm de l'IL-6, suggérant des voies de couplage différentes entre les astrocytes et les astrocytomes. Cette différence de comportement entre astrocytes. L'effet prolifératif observé est clairement dû à la sécrétion d'IL-6 induite par l'activation du récepteur CD40 puisque : **1**.- le CD40L n'a aucun effet sur les astrocytomes après neutralisation de l'IL-6 avec un antagoniste, MAB206, et **2**.- une gamme de concentration croissante d'IL-6 favorise la prolifération des astrocytomes de manière dose dépendante.

Ces résultats nous permettent de proposer une implication de CD40/CD40L dans la stimulation de la prolifération tumorale induite par les mastocytes. Il reste à confirmer ces résultats en présence de mastocytes (modèle de coculture : mastocytes/astrocytomes ou astrocytes), en utilisant un antagoniste du récepteur CD40 ou en inactivant le gène du récepteur par siRNA.

# CD40 receptor activation increases proliferation of human astrocytoma cells but not normal astrocyte via an IL-6-dependent pathway

Abdelaziz Boukhari et al.

Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France

## **EN COURS DE REDACTION**

Correspondance : Jean-pierre Gies

CNRS UMR 7213

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

Faculté de Pharmacie

74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 Illkirch

FRANCE

Tel: 0368854140

Fax: 03 68 85 43 13

E-mail: jean-pierre.gies@unistra.fr

## Abstract

Glioblastoma multiform (GBM) is the most malignant and aggressive type of brain tumor. CD40, a tumour necrosis factor (TNF) receptor family member, is expressed in a variety of cell types, including B-lymphocytes, monocytes, astrocytes, endothelial cells and malignant cells like astrocytoma cells. In this study, we provide evidence to support a role for constitutive CD40 signalling in cell growth and proliferation *in vitro* through production of IL-6. We show that the ligand for CD40 (CD40L) is expressed as well as in CD40-positive astrocytoma cell lines and normal astrocyte cell. Alternatively, co-expression of CD40 and CD40L confers oncogenic effects on astrocytoma cell lines U87 and U373 but not on normal human astrocyte (NHA). The observed effects of CD40 activation on cell growth are through oncogenic NF-kappaB signalling pathway leading to production of IL-6. Taken together, this study supports the concept that CD40 is a potential target for anticancer therapy and that blockage of its function helps to inhibit cancer cell proliferation most likely by decreasing the production of IL-6 and other pro-inflammatory cytokines.

## Introduction

Glioblastoma multiform (GBM) is the most malignant and aggressive type of brain tumor with an average life expectancy of less than 15 months. This is mostly due to the highly mutated genome of GBM, which is characterized by the deregulation of many keys signalling pathways involving growth, proliferation, survival, and apoptosis (Mao et al. 2012). CD40 is a cell surface receptor with a typical structure of the type I transmembrane protein and belongs to the tumor necrosis factor-R (TNF-R) family. It is expressed by a wide variety of cell types following activation signals, and constitutively on B lymphocytes, macrophages, and dendritic cells (Bishop et al. 2007). CD40 binds its ligand CD40L (CD40-L/CD154) which is a type II transmembrane protein expressed by large variety of immune cells such as T and B lymphocytes, mast cells and macrophages, and also by other tissues, especially under inflammatory conditions. CD40L is a glycoprotein member of the TNF family composed by 261 AA, 33kDa, with a 22-AA cytoplasmic domain, a 24-AA transmembrane domain, and a 215-AA extracellular domain (van Kooten and Banchereau 2000). There are two shorter soluble forms retain their ability to bind CD40 and to deliver biological signals (van Kooten and Banchereau 2000). CD40 regulates a lot of cellular processes including the initiation and progression of cellular and humoral adaptive immunity. In fact CD40 signals are important for the T-dependent B cells activation, promoting B cells proliferation, antibodies production, isotype switching and maturation to memory B cells (Bishop et al. 2007). Activation of CD40 in the antigen presenting cells (APC) increases the expression of cell surface molecules and the production of variety of cytokines like IL-6, IL-12 and TNFα. In this way, enhancing the function of APC, CD40 promote T cells activation (Bishop et al. 2007). CD40 increases cell survival through the expression of inhibitors of apoptosis such as Bcl-x (Denfeld et al. 1996). Moreover, CD40 is expressed in many tumor cells such as lymphoma, leukemia, myeloma, nasopharyngeal, colorectal, bladder, ovarian, liver, and breast carcinomas and glioma (Tong and Stone 2003; Xie et al. 2010). However, its role in tumor biology is still debated because of its contrasting effects in tumor progression. In fact, CD40 engagement is implicated in glioma angiogenesis through the up-regulation of VEGF expression (Xie et al. 2010), and in apoptosis resistance causing by the activation of NFkB and expression of anti-apoptotic proteins (Tong and Stone 2003; Ottaiano et al. 2002). In the other hand, the activation of CD40 leads to cell cycle arrest and apoptosis in some tumor and it can enhance the host's

antitumor immune response by improving antigen presentation (Tong and Stone 2003). Tong et al. demonstrated that CD40 binding modulates human breast cancer cell growth, in which binding with a recombinant sCD40L molecule or with a CD40-reactive monoclonal antibody produced a direct growth-inhibitory effect. Interestingly, they found that breast cancer tumorinfiltrating lymphocyte, rarely express membrane CD40L and, hence, are limited in their capacity to down-regulate CD40 breast cancer growth through the CD40 pathway (Tong et al. 2001). In summary, CD40 effects in malignancies are dependent on the state of differentiation of the stimulated cells and the type of malignancy (Elgueta et al. 2009). In the central nervous system, the co-stimulatory molecule CD40 is expressed in a variety of cells including astrocytes and micrglia . Interaction between CD40 and CD40L on astrocytes from the infiltrating T cells and other resident cells such as monocytic cells, natural killer cells and mast cells, trigger a series of intracellular signaling events that promote the production of a wide array of cytokines, chemokines and neurotoxins (Kim et al. 2011) such as CD40 activation represents an exciting target for haematological malignancies and solid tumors, but its functional role in cancer development still remains unclear and controversial (Ottaiano et al. 2002). The engagement of CD40 by CD40L promotes the clustering of CD40 and induces the recruitment of adaptor proteins known TNFR-associated factors (TRAFs) to the cytoplasmic domain of CD40 then the TRAF proteins activate different signalling pathways including nuclear factor  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ )-signaling pathways, the mitogen-activated protien kinases (MAPKs), the phosphoinositide 3-kinase (PI3K), as well as the phospholipase Cy (PLCy) pathway (Bishop et al. 2007). Recent evidence indicates that signaling may occur independent of the TRAF proteins, as well as with janus family kinase 3 (jak3), which was found to be able to bind directly to the cytoplasmic domain of CD40. Binding of jak3 has been shown to induce the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5(STAT5). Together, these complex pathways elicit the essential signals mediated through CD40 to impart its diverse cellular processes like survival, maturation, production of inflammatory cytokines and expression of co-stimulatory cytokines (Elgueta et al. 2009). It has been suggested that low-level constitutive engagement of CD40 may facilitate malignant cell growth. Studies with non-Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma, and chronic lymphocytic leukemia cells have shown that these cells express low levels of CD40L, and through autocrine pathway sustain cell proliferation. In addition, the low-levels of CD40L expression protect these cells from apoptosis (Furman et al. 2000; Pham et al. 2002). Recently, human CD40-positive breast tumor biopsies were shown to co-express CD40L, and that co-expression confers oncogenic effects in vitro (Baxendale et al. 2005). Furthermore, the

co-expression of CD40 and its ligand, in immortalized human epithelial cells induce an increase in their proliferation, motility, and invasion (Baxendale et al. 2005). These results suggest that neoplastic growth utilizes the CD40/CD40L pathway independent of the immune system to sustain proliferative capacity and survival. Furthermore, one of the main molecular mechanisms of malignant glioma is the dysregulation of IL-6 gene expression. Increased level of IL-6 protein has been associated with glioma malignancy and aggressiveness. IL-6 can promote glial tumor cell growth by an autocrine or paracrine mechanism (Kim et al. 2009). In the present study, the expression of CD40 and CD40L, IL-6 gene expression in different astrocytma cell lines and normal astrocyte, were examined. In addition CD40-CD40L interaction correlated with cellular proliferation and IL-6 gene expression in astrocytoma cell lines were investigated.

## Materials and methods

#### **Antibodies and Reagents**

The Human recombinant CD40L, human recombinant IL-6 and human IL-6 antibody were from R&D Systems (Minneapolis, USA), cell proliferation ELISA BrdU kit was from promega (Indianapolis, USA), the cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) from Promega (Charbonnières-les-Bains, France), the anti-CD40 and anti-CD40L mAb were from BD Biosciences (San Diego, CA). Mouse IgG, secondary horseradish peroxidase conjugated antibodies, anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  and anti-actin monoclonal antibodies (mAb) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

## **Cell Lines and Culture Conditions**

Human astrocytoma cell lines CCF-STTG1, U373, SW-1783 were obtained from the America Type Culture Collection (Rockville, IN), U87 from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) and normal human astrocytes from Lonza (Walkersville, MD). Cell lines were maintained in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and were grown in astrocyte basal medium (ABM<sup>TM</sup>) (Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated FBS for normal human astrocytes, in EMEM for U87 and U373 cells, in RPMI for CCF-STTG1 cells and in L-15 for SW-1783 . All media were supplemented with 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/mL gentamycin, 100 U/mL penicillin and 50 mg/ml streptomycin (Sigma St. Louis, MO). Primary normal human astrocytes were used from the first and the fourth passage.

## MTS assay

Cells were seeded in triplicate on 96-multiwell plates at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well, 24 hours after growth, replace the medium with 100µl fresh medium, cells treated with different concentrations of compound for 24 h. Cell proliferation rate was then assessed by colorimetric assay using the Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), following the manufacturer's recommendations (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Absorbance was measured at 490 nm on a multiwell ELISA plate reader.

## BrdU cell proliferation assay

Astrocytomas cells were seeded at  $5 \times 10^3$  cells/well on 96-well plates. 24 hours after growth, replace the medium with 100µl fresh medium, and traited the cells by The CD40L, anti-CD40 receptor mAb, human recombinant IL-6 and IL-6 neutralized mAb at different concentrations for an additional 24 h. 20µM BrdU was introduced after 24h of culture at 37°C. 11 µL of 10X

BrdU may then be added to the 100  $\mu$ L of culture media/cell treatment already present in each well, for a final 1X concentration. After 48h of treatment, aspirate the media from the cell wells and add 200  $\mu$ L/well Fixing Solution and incubate at room temperature (RT) for 30 minutes. Aspirate the Fixing Solution and blot the plate dry. For detection of the BrdU label by the anti-BrdU monoclonal antibody, it is necessary to fix the cells and denature the DNA using the solution provided in the kit (Fixing Solution). After washing, the BrdU Antibody is provided as a prediluted solution and add 100  $\mu$ L/well and incubate for 1 hour at RT. The Peroxidase Anti-Mouse IgG conjugate 1:2,000, pipette 100  $\mu$ L/well and incubate for 30 minutes at RT. Finally, Pipette 100  $\mu$ L/well TMB Substrate and incubate for 30 minutes at RT in the dark. Positive wells will be visible by a blue Color, the intensity of which is proportional to the amount of BrdU incorporated in the proliferating cells. Stop the reaction by pipetting 100  $\mu$ L of acid Stop Solution provided to every well. The color of positive wells will change from blue to bright yellow. Read the plate using a spectrophotometric microtiter plate at 450 nm).

#### **RNA Extraction and RT-PCR**

Total RNA was extracted from cells with PureZOLTM reagent (BioRad) according to manufacturer's recommendations. Reverse transcription was done using 500 ng total RNA with the SuperScript<sup>TM</sup>III First-strand synthesis system (Invitrogen, Paisley, UK) according to manufacturer's protocol. Amplification was assessed using 1 lmL RT products in a mixture containing 200 µM of each dNTP, 0.5 lM oligonucleotide primers, 1x Phusion HF buffer, and 0.02 U/IL Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). PCR primes 5'-TCAATGAGGAGACTTGCCTG-3' (forward) and 5'-GATGAGTTGTCATGTCCTGC-3' (reverse) were used to detect IL-6 mRNA. PCR primers 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGA TTTGGT-3' (forward) and 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (reverse) were used to detect GAPDH mRNA.

Cycling parameters were: 95°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s for 30 cycles, followed by a final elongation at 72°C for 5 min. PCR products were run on 2% agarose gels stained with 1  $\mu$ g/mL ethidium bromide. As a negative control, cDNA was omitted from the reaction mixture, with no observed amplified band. This ensures that no exogenous contamination was present in our experiments. Image J software (NIH freeware) was used for densitometry analysis. For NHA, PCR data were similar over passages 1 to 4.

## Western Blotting

Cells were grown in 6-well plates to 70% confluency and treated in serum-free RPMI for CCF-STTG1 cell line and EMEM for U87 cell line. Cells were then washed with cold PBS and lysed with ice-cold RIPA buffer (150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, and a protease inhibitor mixture tablet). After centrifugation at 14,000g for 10 min at 4°C, supernatants were boiled for 5 min in Laemmli sample buffer supplemented with 50 mM DTT. Equal amounts of lysed and boiled protein (30µg/well) were loaded and subjected to electrophoresis on 10% polyacrylamide gels (BioRad). Separated proteins were electrophoretically transferred to PVDF membranes (GE Healthcare), which were then blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat dried milk (BioRad). Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody. Concentrations were chosen according to the manufacturer's instructions. Secondary horseradish peroxydase-conjugated antibody was incubated for 1 h at room temperature and proteins were detected using an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare).

## **Statistical Analysis**

Results are presented as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was done using ANOVA. Significant differences are represented throughout as \*P < 0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001.

## Results

#### 1. CD40 and CD40L expression on normal astrocyte and astrocytoma cell lines.

To develop the models appropriate for the study of CD40-growth regulation, we characterized CD40 and CD40L expression in established astrocytoma cell lines and normal astrocyte by Western Blot analysis. Western blot analysis demonstrated that all astrocytoma and NHA cell lines expressed CD40 with out significant differences (Fig.1A), whereas the astrocytoma cell lines over express significantly the CD40L compared to NHA cells (Fig.1B). These findings indicated that Human astrocytoma cell lines U87, CCF-STTG1, U373 and SW-1783 constitutively expressed CD40 and were suitable for the study of CD40 growth regulation.

#### 2. Growth stimulation by sCD40L.

Previously, Tong AW et al. demonstrated that CD40 is a functional growth-regulatory receptor in myeloma cells (Tong et al. 2000). Similar evaluations were carried out to examine the role of CD40 in astrocytomas cell lines. Analysis was carried out with human recombinant CD40L. The growth stimulatory effect was concentration dependent and observed in all astrocytomas cell lines and the cell growth was totally inhibited by anti-CD40 mAb, whereas neither human recombinant sCD40L nor anti-CD40 mAb exerts any effect on normal human astrocyte (NHA) cells (Fig.2 A,B,C,D,E). Here, we observed that besides the fact that in all cell lines no difference found in CD40 expression, the cell growth quite significantly augmented in astrocytomas cell lines by sCD40L, suggesting that CD40 receptor is more activated in astrocytoma than normal astrocyte.

## 3. CD40 regulates NF-KB transactivation in glioma cell.

NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) transcription factor has pro-survival and anti-apoptotic activities on several tumors including glioblastoma (Greten and Karin 2004; Miyakoshi and Yagi 2000; Russell et al. 2002). Several studies have shown that activation of NF- $\kappa$ B regulates the expression of several anti-apoptotic, pro-metastatic and inflammatory cytokines promoting cell proliferation and survival (Mantovani 2010; Nakshatri et al. 1997; Newton et al. 1999; Patel et al. 2000).We investigated the effect of CD40 activation on the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  which is an indicator of NF- $\kappa$ B transactivation. Figure 3 A & B shows that activation of CD40 induced a concentration-dependent increase in p-I $\kappa$ B $\alpha$  expression level in glioma cells and this effect is clearly abolished when the cell lines are treated with anti-CD40 mAb. Alternatively, neither human recombinant sCD40L nor anti-CD40 mAb has any effect on p-I $\kappa$ B $\alpha$  expression in normal astrocyte cells (NHA). (Fig 3, C)

#### 4. Effect of CD40 activation on IL-6 gene expression.

According to previous study published by Kim et al, showed that IL-6 is essential for human glioblastoma cell growth and proliferation through STAT3 phosphorylation (Kim et al. 2009). Here, we were interested to study the effect of CD40 activation by sCD40L on IL-6 gene expression in different cell lines and identify the consequence of adding anti-CD40 mAb on its expression. We noticed that on treating astrocytoma cell lines (U87, U373) with sCD40L there is significant increases in IL-6 gene expression in a concentration dependent manner (Fig.4 A&B). and in the same way when we treated the same cell lines with anti-CD40 mAb the IL-6 gene down-regulated in concentration dependent manner (Fig. 4 A&B), whereas neither human recombinant sCD40L nor anti-CD40 mAb has any effect on IL-6 gene expression in NHA. (Fig. 4C)

## 5. Effect of IL-6 on glial tumor cell growth.

II-6 can promote glial tumor cell growth by an autocrine or paracrine mechanism (Goswami et al. 1998; Malinowska et al. 2009). Many studies have showed that STAT3 is constitutively activated in gliobalstoma cells (Iwamaru et al. 2007; Konnikova et al. 2003). The constitutive STAT3 activation has been reported to be closely associated with the up-regulation of its target genes including Cyclin D1, XIAP and Bcl-2 and the concomitant prevention of apoptosis (Bhattacharya et al. 2005), and that the phosphorylation of STAT3 is induced by cytokines including IL-6 (Berishaj et al. 2007). Here we were interested to study the effect of IL-6 in astrocytoma cell line growth, furthermore, study the effect of IL-6 neutralized antibody on astrocytoma cell lines (U87, U373) in concentration dependent manner (Fig 5) and the IL-6 neutralized antibody nearly totally abolish the growth promoting effect of sCD40L (Fig. 6 A&B) this suggest that both sCD40L and IL-6 are necessary for cell growth and that the effect of IL-6 is more dominant than that of sCD40L.

## Discussion

The CD40 is expressed in many tumor cells such as lymphoma, leukemia, myeloma colorectal, bladder, ovarian, liver, and breast carcinomas and glioblastoma (Xie et al. 2010). However, its role in tumor biology is still debated because of its contrasting effects in tumor progression. Recently, certain CD40-positive tumor biopsies were shown to co-express CD40L, and that co-expression confers oncogenic effects in vitro (Baxendale et al. 2005). The present study was designed to determine the expression level of both CD40 and CD40L in astrocytoma cell lines and the effect of engagement of CD40 by sCD40L on different cellular characteristics. The findings indicate that both CD40 and CD40L are expressed by astrocytoma cell lines and normal astrocyte except that CD40L is consistently more expressed in astrocytoma cell. The sCD40L was able to enhance significantly cellular growth through CD40 receptor in human astrocytoma cell lines CCF-STTG1, U373, SW-1783 whereas it has no effect on normal astrocyte cell NHA. Moreover, blocking CD40 function by mAb was able to abolish the enhancing effect of sCD40L and these findings suggest the presence of positive interaction between CD40-CD40L in astrocytoma cell lines. Activation of the transcription factor NF-kB is observed in several tumors including glioblastoma. NF-kB stimulates the expression of various oncogenes and factors involved in inflammation, cell cycle, apoptosis and angiogenesis (Akca et al. 2011; Barkett and Gilmore 1999; Bhat-Nakshatri et al. 2002; Foo and Nolan 1999; Greten and Karin 2004; Mayo et al. 2001; Miyakoshi and Yagi 2000; Pahl 1999; Sun et al. 2011; Yamagishi et al. 1997). We observed in our study that CD40 activation by sCD40L stimulates the activation of NF-kB transcription factor by inducing phosphorylation of its inhibitor IkBa in U87 and U373 cells but not in NHA. This effect was totally reversed by CD40 Mab. Moreover, subsequent to CD40 activation the present findings showed in U87 and U373 cells but not in NHA cells, an up-regulation of IL-6 mRNA expression and again this effect was reversed by blocking CD40. The present study also showed positive regulatory effect of IL-6 in astrocytoma cell lines growth independent of CD40/CD40L pathway this in accordance of what Kim et al (2009) concluded, that neoplastic growth utilizes the CD40/CD40L pathway independent of the immunesystem to sustain proliferative capacity and survival. Furthermore, one of the main molecular mechanisms of malignant glioma is the dysregulation of IL-6 gene expression. Increased level of IL-6 protein has been associated with glioma malignancy and aggressiveness. IL-6 can promote glial tumor cell growth by an autocrine or paracrine mechanism (Kim et al. 2009). As far as the glioma cells uses different mechanisms to enhance there growth and proliferation. In the present study we speculate the role of both IL-6 and CD40/CD40L and we suggest that IL-6 is the dominant pathway in cell growth and proliferation provided by the fact that IL-6 neutralized antibody was able to block the effect of CD40 activation pathway on cell growth and proliferation (Fig. 6).

In conclusion, the present findings suggest that the selective pro-proliferative effect of CD40/CD40L interaction in glioblastoma cells involves an NF- $\kappa$ B-dependent up-regulation of IL-6 mRNA expression (Fig. 4). Furthermore, we suggest that IL-6 produced by glioma cell promote growth and metastasis of astrocytoma cells independent of CD40/CD40L. This study supports the concept that CD40 is a potential target for anticancer therapy and that blockage of its function helps to inhibit cancer cell proliferation most likely by decreasing the production of IL-6 and other pro-inflammatory cytokines.

## Acknowledgements.

This study was supported by a grant of the Ligue contre le Cancer (to J.P.Gies from the Comité du Haut-Rhin), France.

## References

- Akca H, Demiray A, Tokgun O, Yokota J. 2011. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells. Lung Cancer 73(3):302-309.
- Barkett M, Gilmore TD. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 18(49):6910-6924.
- Baxendale AJ, Dawson CW, Stewart SE, Mudaliar V, Reynolds G, Gordon J, Murray PG, Young LS, Eliopoulos AG. 2005. Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth. Oncogene 24(53):7913-7923.
- Berishaj M, Gao SP, Ahmed S, Leslie K, Al-Ahmadie H, Gerald WL, Bornmann W, Bromberg JF. 2007. Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. Breast Cancer Res 9(3):R32.
- Bhat-Nakshatri P, Sweeney CJ, Nakshatri H. 2002. Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF-kappaB activation in breast cancer cells. Oncogene 21(13):2066-2078.
- Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. 2005. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. Biochem J 392(Pt 2):335-344.
- Bishop GA, Moore CR, Xie P, Stunz LL, Kraus ZJ. 2007. TRAF proteins in CD40 signaling. Adv Exp Med Biol 597:131-151.
- Denfeld RW, Hollenbaugh D, Fehrenbach A, Weiss JM, von Leoprechting A, Mai B, Voith U, Schopf E, Aruffo A, Simon JC. 1996. CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. Eur J Immunol 26(10):2329-2334.
- Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Immunol Rev 229(1):152-172.
- Foo SY, Nolan GP. 1999. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. Trends Genet 15(6):229-235.
- Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. 2000. Modulation of NFkappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. J Immunol 164(4):2200-2206.

- Goswami S, Gupta A, Sharma SK. 1998. Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. J Neurochem 71(5):1837-1845.
- Greten FR, Karin M. 2004. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. Cancer Lett 206(2):193-199.
- Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, Aoki H, Yokoyama T, Fokt I, Hess K, Conrad C, Madden T, Sawaya R and others. 2007. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. Oncogene 26(17):2435-2444.
- Kim DY, Hong GU, Ro JY. 2011. Signal pathways in astrocytes activated by cross-talk between of astrocytes and mast cells through CD40-CD40L. J Neuroinflammation 8:25-32.
- Kim SR, Bae MK, Kim JY, Wee HJ, Yoo MA, Bae SK. 2009. Aspirin induces apoptosis through the blockade of IL-6-STAT3 signaling pathway in human glioblastoma A172 cells. Biochem Biophys Res Commun 387(2):342-347.
- Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM, Cochran BH. 2003. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. BMC Cancer 3:23-30.
- Malinowska K, Neuwirt H, Cavarretta IT, Bektic J, Steiner H, Dietrich H, Moser PL, Fuchs D, Hobisch A, Culig Z. 2009. Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor. Endocr Relat Cancer 16(1):155-169.
- Mantovani A. 2010. Molecular pathways linking inflammation and cancer. Curr Mol Med 10(4):369-373.
- Mao H, Lebrun DG, Yang J, Zhu VF, Li M. 2012. Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. Cancer Invest 30(1):48-56.
- Mayo MW, Norris JL, Baldwin AS. 2001. Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. Methods Enzymol 333:73-87.
- Miyakoshi J, Yagi K. 2000. Inhibition of I kappaB-alpha phosphorylation at serine and tyrosine acts independently on sensitization to DNA damaging agents in human glioma cells. Br J Cancer 82(1):28-33.
- Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. 1997. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. Mol Cell Biol 17(7):3629-3639.

- Newton TR, Patel NM, Bhat-Nakshatri P, Stauss CR, Goulet RJ, Jr., Nakshatri H. 1999. Negative regulation of transactivation function but not DNA binding of NF-kappaB and AP-1 by IkappaBbeta1 in breast cancer cells. J Biol Chem 274(26):18827-18835.
- Ottaiano A, Pisano C, De Chiara A, Ascierto PA, Botti G, Barletta E, Apice G, Gridelli C, Iaffaioli VR. 2002. CD40 activation as potential tool in malignant neoplasms. Tumori 88(5):361-366.
- Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 18(49):6853-6866.
- Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, Gelfanov V, Boswell SH, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. and others. 2000. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. Oncogene 19(36):4159-4169.
- Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Terry N, Reid PS, Ford RJ. 2002. A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas. Immunity 16(1):37-50.
- Russell JS, Raju U, Gumin GJ, Lang FF, Wilson DR, Huet T, Tofilon PJ. 2002. Inhibition of radiation-induced nuclear factor-kappaB activation by an anti-Ras single-chain antibody fragment: lack of involvement in radiosensitization. Cancer Res 62(8):2318-2326.
- Sun HZ, Yang TW, Zang WJ, Wu SF. 2011. Dehydroepiandrosterone-induced proliferation of prostatic epithelial cell is mediated by NFKB via PI3K/AKT signaling pathway. J Endocrinol 204(3):311-318.
- Tong AW, Papayoti MH, Netto G, Armstrong DT, Ordonez G, Lawson JM, Stone MJ. 2001. Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer. Clin Cancer Res 7(3):691-703.
- Tong AW, Seamour B, Chen J, Su D, Ordonez G, Frase L, Netto G, Stone MJ. 2000. CD40 ligand-induced apoptosis is Fas-independent in human multiple myeloma cells. Leuk Lymphoma 36(5-6):543-558.
- Tong AW, Stone MJ. 2003. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. Cancer Gene Ther 10(1):1-13.
- van Kooten C, Banchereau J. 2000. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol 67(1):2-17.
- Xie F, Shi Q, Wang Q, Ge Y, Chen Y, Zuo J, Gu Y, Deng H, Mao H, Hu Z and others. 2010.CD40 is a regulator for vascular endothelial growth factor in the tumor microenvironment of glioma. J Neuroimmunol 222(1-2):62-69.

Yamagishi N, Miyakoshi J, Takebe H. 1997. Enhanced radiosensitivity by inhibition of nuclear factor kappa B activation in human malignant glioma cells. Int J Radiat Biol 72(2):157-162.

## **Figure legends**

Fig. 1. CD40 and CD40L Expression on normal astrocyte and astrocytoma cell lines NHA and CCF-STTG1, U373, SW-1783, U87 respectively, CD40 expression was assessed by western blotting in NHA and CCF-STTG1, U373, SW-1783, U87 (A, upper panel). CD40L expression was assessed by western blotting in NHA and CCF-STTG1, U373, SW-1783, U87 (B, upper panel). CD40 and CD40L expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with control (A, B lower panel). Data are shown as mean±sem of three independent experiments (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus control).

Fig. 2. Effect of sCD40L and CD40 mAb on CCF-STTG1, U373, SW-1783, U87 and NHA growth rate. The U87 cells, CCF-STTG1 cells, SW-1783 cells, SW-1783 cells and NHA cells were incubated overnight and then the serum enriched medium changed by serum free medium and were treated for additional 48 hours by sCD40L or anti-CD40 receptor mAb at concentrations (200, 500 ng/ml) and (1, 2.5, 5  $\mu$ g/ml) respectively (A, B, C, D, E). Then BrdU cell proliferation assay were used to study the cell growth and proliferation rate. Data represented as percentage compared with control and shown as mean±sem of three independent experiments (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus control).

Fig. 3. Effect of CD40 activating and blocking on p-I $\kappa$ B $\alpha$  expression in human astrocytoma cell lines U87, U373 and normal astrocyte NHA. The U87 (A), U373 (B) and NHA (C) cells were incubated overnight and then the serum enriched medium changed by serum free medium and were treated for additional 24 hours by sCD40L or anti-CD40 receptor mAb at concentrations (200, 500 ng/ml) and (2.5 $\mu$ g/ml) respectively. p-I $\kappa$ B $\alpha$  expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with control (A, B, C lower panel). Data are shown as mean±sem of three independent experiments (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus control).

**Fig. 4. Effect of CD40 activating and blocking on expression of IL-6 gene in human astrocytoma cell lines and normal human astrocytes cell line NHA.** The U87 (A), U373 (B) and NHA (C) cells were incubated overnight and then the serum enriched medium changed by serum free medium and were treated for additional 5 hours by sCD40L or anti-CD40 receptor at concentrations(200, 500 ng/ml) and(1, 2.5, 5  $\mu$ g/ml) respectively. IL-6 mRNA expression (A, B, C upper panel) was assessed by RT-PCR. The IL-6 mRNA expression levels were analyzed by densitometry and represented as percentage compared with NHA (A, B, C lower panels). Results are shown as mean±sem of three independent experiments (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01 versus NHA).

Fig. 5. Effect of human IL-6 on U87, U373. The U87 (A) and U373 (B) cells were incubated for overnight and then the serum enriched medium changed by serum free medium and were treated for additional 48 hours with human recombinant IL-6 at concentration of (0.5, 1, 2  $\mu$ g/ml). Cells growth rate were assessed by MTA assay. Data represented as percentage compared with control (A, B). Results are shown as mean±sem of three independent experiments (\*p<0.05, \*\*p<0.01 versus control).

Fig. 6. Effect of sCD40L on astrocytoma cell lines in the presence of human neutralized IL-6 antibody. The U87 (A) and U373 (B) cells were incubated for overnight then the serum enriched medium changed by serum free medium. The cells were treated with 10µg of human neutralized IL-6 antibody for two hours before adding sCD40L at concentrations(200, 500 ng/ml) for additional 48 hours. Then BrdU cell proliferation assay were used to study the cell growth and proliferation rate. Data represented as percentage compared with control and shown as mean±sem of three independent experiments (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 versus control).



Figure 1


















Figure 5





Figure 6

# Autres Résultats

Parallèlement à mes travaux de thèse j'ai également participé à des études sur la **Thymoquinone**. Il s'agit du principe actif majeur extrait de **Nigella sativa** (graine noire de cumin). Ce principe actif possède notamment des effets antioxydants et inhibe la prolifération et la migration de plusieurs types de cellules cancéreuses (sein, de l'ovaire, colorectal, adénocarcinome pancréatique, carcinome pulmonaire). C'est dans ce contexte que j'ai participé à des travaux inter-équipes au sein de notre laboratoire.



Figure 29 : Structure de la thymoquinone. (2-Isopropyl-5-méthylbenzo-1,4-quinone)



Figure 29 : Graines noires de cumin (extrait du site « santeplus »)

Ces travaux inter-équipes ont donnés lieu à deux publications ci jointes

Thymoquinone reduces migration and invasion of human glioblastoma cells associated with FAK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation

Kaouther Kolli-Bouhafs, Abdelaziz Boukhari, Abdurazzag Abusnina, Emilie Velot, Jean-Pierre Gies, Claire Lugnier, Philippe Rondé.

Invest. New Drugs 2011, 10637-011-9777-3.

Anti-neoplastic agent thymoquinone induces degradation of  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts.

Mahmoud Alhosin, Abdulkhaleg Ibrahim, Abdelaziz Boukhari, Tanveer Sharif, Jean-Pierre Gies & Cyril Auger, Valérie B. Schini-Kerth.

Invest. New Drugs 2011, 10637-011-9734-1.

## Etude de l'effet de la thymoquinone sur la migration et l'invasion des astrocytomes humains

### Résumè (Publication 6)

Dans cette étude nous avons étudié l'effet de la thymoquinone sur la prolifération et la migration des astrocytomes humains et les astrocytes normaux humains (NHA). Des études antérieures suggéraient que la thymoquinone à un effet inhibiteur sur la prolifération et la migration de plusieurs types de cellules cancéreuses, y compris le cancer du sein, de l'ovaire, le cancer colorectal, l'adénocarcinome pancréatique humain, le carcinome pulmonaire. Nous avons montré que le traitement des cellules de glioblatomes humains par la Thymoquinone réduisait l'expression de FAK, ainsi que l'invasion des cellules de glioblastome. Ces effets se feraient par la réduction de l'adhérence, la migration et la sécrétion des métalloprotéines MMP-2 et MMP-9. Ces propriétés sont imputables à l'implication de la FAK (*Focal Adhesion Kinase*). La TQ semble présenter une spécificité pour les cellules néoplasiques invasives puisqu'elle est sans effet sur la migration des cellules normales astrocytaires

Thymoquinone reduces migration and invasion of human glioblastoma cells associated with FAK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation
Kaouther Kolli-Bouhafs, Abdelaziz Boukhari, Abdurazzag Abusnina, Emilie Velot, Jean-Pierre Gies, Claire Lugnier, Philippe Rondé.
Invest. New Drugs 2011, 10637-011-9777-3.

# Publication 6

### PRECLINICAL STUDIES

### Thymoquinone reduces migration and invasion of human glioblastoma cells associated with FAK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation

Kaouther Kolli-Bouhafs Abdelaziz Boukhari. Abdurazzag Abusnina. Emilie Velot. Jean-Pierre Gies. Claire Lugnier. Philippe Rondé

Received: 10 August 2011 / Accepted: 27 November 2011 Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Summary** Glioblastoma represent the most frequent prima- ry tumors of the central nervous system and remain among the most aggressive human cancers as available therapeutic approaches still fail to contain their invasiveness. Many studies have reported elevated expression of the Focal Adhesion Kinase (FAK) protein in glioblastoma, associated with an increase in the rates of both migration and invasion. This designates FAK as a promising target to limit invasive- ness in glioblastoma. Thymoquinone (TO), the main phytoac- tive compound of Nigella sativa has shown remarkable anti- neoplasic activities on a variety of cancer cells. Here, we studied the anti-invasive and anti-migratory effects of TQ on human glioblastoma cells. The results obtained indicated that TQ treatment reduced migration, adhesion and invasion of both U-87 and CCF-STTG1 cells. This was accompanied by a drastic down-regulation of FAK, associated with a reduction of ERK phosphorylation as well as MMP-2 and MMP-9 secretion. This study provides new data on FAK regulation by a natural product (TQ) which could be of a great value for the development of novel therapies in glioblastoma.

Keywords FAK  $\cdot$  Thymoquinone  $\cdot$  Invasion  $\cdot$  Migration  $\cdot$  MMP  $\cdot$  Glioblastoma

K. Kolli-Bouhafs · A. Boukhari · A. Abusnina · E. Velot · J.-P. Gies · C. Lugnier · P. Rondé Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401 Illkirch, France

### Introduction

Glioblastoma are the most common primary brain tumors, and one of the most lethal human cancers. Despite many efforts made in surgical management, radiotherapy and new combined chemotherapy protocols during the past three decades, the mean survival time still remains around 14 months [1]. Multiple reasons are behind this clinical failure including tumors heterogeneity, susceptibility to mutations, and a high tumor infiltration degree. Indeed, invasive brain tumor cells can escape surgical resection and be responsible for tumor recurrence [2]. Therefore, identifying new agents that target signalling pathways involved in adhesion, migration and invasion processes can be of a great importance to reduce tumorogenicity and improve prognosis of patients with glioblastoma.

FAK is a 125 kDa non-receptor tyrosine kinase protein localized at sites of focal adhesions also known as sites of integrin clustering. FAK regulates cell adhesion and motility by relaying extracellular matrix (ECM) signals from integrins to the intracellular compartment [3]. FAK activation leads to the autophosphorylation of Tyr 397 creating a binding site for Src. The FAK/Src complex then phosphorylates Tyr 925 on FAK triggering thereby the activation of the ERK signalling pathway [4]. Many studies have related FAK to tumor progression as FAK overexpression has been reported in a broad range of cancer types including breast cancer [5], colorectal carcinoma [6] and neuroblastoma [7]. In glioblastoma, tumor biopsy revealed elevated FAK expression rates [8, 9]. Moreover, a role for FAK in the promotion of glioblastoma cell migration and invasion has been demonstrated [8, 10]. Altogether, these data identified FAK as a potential target for anti-invasive strategies in glioblastoma.

K. Kolli-Bouhafs A. Boukhari A. Abusnina E. Velot J.-P. Gies C. Lugnier P. Rondé (\*) Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213, 74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 Illkirch, France e-mail: philippe.ronde@unistra.fr

Among novel anti-cancer agents that are being currently studied, there has been growing interest in natural products [11]. Notably, TQ the main active substance of Nigella sativa has shown promising anti-neoplasic properties, mainly through anti-oxydant, anti-proliferative, anti-inflammatory and immuno-modulatory effects [12-14]. Moreover, TQ is a relatively non-toxic compound as its LD<sub>50</sub> in mice is 100 to 150 times higher than the effective dose when administrated orally [15] Few studies have also described anti-invasive and/ or anti-migratory properties of TQ on colorectal [16], lung cancer models [17], and human umbilical vein endothelial cells [18], but the underlying molecular mechanism remains poorly understood. Remarkably, TQ is cytotoxic to cancer cells without significantly affecting the non-neoplasic cells [19, 20]. Cytotoxicity tests performed on both glioblastoma and normal cells revealed that glioblastoma were more sensitive to TQ-mediated anti-proliferative effects compared to normal parental cells [21].

In this study we sought to determine the effects of TQ on cell invasion and migration of two human glioblastoma cell lines, namely U-87 and CCF-STTG1 cells. We also examined the expression and phosphorylation of FAK and other down-stream molecules of the FAK signalling pathway. Our results showed that TQ drastically reduced migration, adhesion and invasion associated with the down-regulation of FAK.

### Materials and methods

### Chemicals and antibodies

EMEM, foetal bovine serum (FBS), ultraglutamine, penicillin, streptomycin, trypsin-EDTA solution (Lonza). Gelatin type A and B (Sigma). Fibronectin (BD Biosciences); Cyto-Select<sup>TM</sup> Cell Invasion and Adhesion Kits (Euromedex). Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Mouse monoclonal anti-FAK kinase antibody (Ab) (BD Transduction), anti-phosphotyrosine 397 Ab (Cell Signaling), anti-phosphotyrosine 925 Ab (US Biological), anti-GAPDH Ab (Millipore). Rabbit polyclonal anti-ERK Ab (Assay design) and antiphosphoERK Ab (Biosource). Phalloidin fluoroProbe547 (Interchim); HRP-conjugated goat anti-mouse and antirabbit IgG Ab (Promega); Dylight <sup>TM</sup> 488 anti-mouse IgG Ab (Rockland); Trypan blue (Invitrogen).

### **Cell culture**

BJ human fibroblasts, U-87 and CCF-STTG1 Grade IV (World Health Organization) human glioblastoma cell lines were obtained from ATCC and were maintained in respectively DMEM, EMEM, and RPMI supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. Cells were grown at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Primary normal human astrocytes (NHA) were maintained in astrocyte basal medium (ABM) supplemented with 10% FBS and AGM Single Quotes® following manufacturers instructions (LONZA). Cells were used between the first and the fourth passage.

### MTS test

BJ fibroblasts, NHA, U-87 and CCF-STTG1 cells were seeded in 96-well plates at a density of  $10^4$  cells/well and were incubated for 18 h to allow cell attachment. Cells were then treated with different concentrations of TQ and incubated for 24 h. TQ was dissolved in DMSO and the final concentration of DMSO was 0.1% throughout the assays. Cell viability rates were determined by colorimetry using the "Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) according to manufacturer's instructions. Absorbance was measured at  $\lambda_{495nm}$  with a reference wavelength of 620 nm. Percentages of cell viability were normalized to control.

### **Trypan blue test**

Cells were treated with the indicated concentrations of TQ during 24 h. Viable cells were determined using the trypan blue exclusion method. The viability rate was obtained by dividing the number of trypan blue-negative cells by the total number of cells using a Malassez chamber on a light microscope. Percentages of cell viability were normalized to control.

### **Migration test**

Cells were seeded at subconfluency in 60 mm petri dishes preliminarily treated with 10 µg/ml fibronectin during 1 h at room temperature. 24 h later, a scratch was realized on both control and TQ-treated cells using a 1 ml pipette tip, and cells were incubated with or without various concentrations of TQ overnight. Images were acquired using an inverted microscope (Olympus IMT2; 10x) equipped with a CCD camera (Panasonic) as previously reported [22]. The first image was acquired at t00 (t<sub>0</sub>) and further images of the same region were acquired at t<sub>0</sub>+24 h. In each field, the distance between the two margins of the lesion was analyzed using Image J, and the migration speed was calculated by dividing the distance covered during the incubation time.

### In vitro cell adhesion assay

Cell suspensions (10<sup>6</sup>cells/ml) were prepared in serum free media and TQ was added at the indicated concentrations.

Cells were then plated on fibronectin-coated wells and allowed to adhere for 30 min at 37°C. After discarding media, cells were incubated in crystal violet staining solution for 10 min at room temperature, and extracted to be quantified. Optical densities (OD<sup>s</sup>) were measured at  $\lambda_{560nm}$ . Percentages of adhesion were normalized to control cells.

### Immunoflulorescence

Cells were seeded at low density in lab-tek wells and treated with TQ at the indicated concentrations. 18 h later, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.5% Triton-X100. After a 1 h blocking step using PBS1% BSA solution, cells were incubated with anti-FAK primary antibody (1/500) and anti-phalloidin probe (1/5000) for 1 h. Then Alexa 488 conjugated secondary antibody was used in PBS/0.2% BSA (1/200) and fluorescence was observed at 488 nm using a confocal microscope (BioRad 1024, Kr/Ar laser; Nikon Eclipse TE300, 40x oil-immersion CFI Plan-Fluor NA 1.4 objective).

### In vitro cell invasion assay

U-87 and CCF-STTG1 invasiveness was assayed using the CytoSelect<sup>TM</sup> Cell Invasion Kit. Briefly,  $3.10^5$  cells were seeded in the inner part of a polycarbonate membrane insert (8 µm pore size) in the presence or not of TQ. The outer surface is coated with a layer of dried basement membrane matrix solution. Inserts were placed in wells containing medium supplemented with 10% FBS as chemoattractant. After an overnight incubation at 37°C, inserts inner surfaces were swabbed to remove non-invasive cells, then, the invasive cells passing through the ECM coating to the outer side of the membrane were stained following manufacturer's instructions. After cell extraction, OD<sup>s</sup> were quantified at  $\lambda_{560nm}$  and the percentages of invasive cells were normalized to control.

### **Gelatin zymography**

Conditioned media from control and TQ-treated cells were subjected to electrophoresis using SDS-polyacrylamide gels co-polymerized with gelatin. Gels were renatured in a 2.5% TritonX-100 solution and then incubated overnight at 37°C in a developing buffer (Tris 0.5 M, Brij35 0.2%, NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, pH7.6), and then consecutively stained with Coumassie Blue and destained to let the bands appear. Bands intensities were determined densitometrically using Gene Genius device.

### Western blot

After TQ treatment, cells were harvested in ice-cold RIPA lysis buffer and lysate proteins were then subjected to SDS-PAGE resolution and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked for 1 h with 5% BSA in TBS-Tween solution at room temperature (RT), and then probed with one of the following primary antibodies anti-FAK, anti-phospho Tyr 397-FAK, anti-phospho Tyr 925-FAK, anti-ERK, anti-phospho ERK, anti-GAPDH. After an overnight incubation at 4°C with the primary antibody, membranes were incubated with a horseradish peroxiadase conjugated secondary antibody for 1 h at RT, and bands were detected by chemiluminescence.

### Statistical analysis

Data were analyzed using the one-way ANOVA test and differences were considered to be significant at (\*)  $P \le 0$ , 05. Results represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

### Results

### Effects of TQ on normal and glioblastoma cell viability

Several previous studies reported the cytotoxic activity of TO [12, 21, 23]. To evaluate the effects of TO on glioblastoma cell migration and invasion, it was necessary to determine the dose-dependent effect of TQ on cell viability. For this purpose, cells were treated with different concentrations of TQ ranging from 10 µM to 100 µM for 24 h. Viable cells were quantified using both the trypan blue and MTS methods. As indicated in Fig. 1a below a concentration of 50 µM, TQ did not display any significant reduction of glioblastoma cell viability while at this concentration TQ inhibits both U-87 and CCF-STTG1 cells viability by an average of 27% and 51.8% respectively. Interestingly, on normal BJ human fibroblasts, as well as on primary normal human astrocytes, TQ did not significantly affect cell viability at all the concentrations tested in this study (Fig. 1b).

### TQ inhibited U-87 and CCF-STTG1 cell migration in vitro

Wound healing experiments were done to evaluate the effect of TQ on normal astrocytes and glioblastoma cell migration. For this purpose, cells were grown to confluence, wounded by scraping, and observed at t00 and t024 h (Fig. 2a). In untreated cells, the average migration speed for normal astrocytes was substantially lower  $(3.66\pm0.13 \ \mu\text{m/h})$  compared to the glioblastoma cells U87  $(8.55\pm0.29 \ \mu\text{m/h})$  and CCF-STTG1  $(6.78\pm0.20 \ \mu\text{m/h})$ . In the presence of TQ, the migration speed was reduced in a dose-dependent manner for U-87 and CCF-STTG1 cells (Fig. 2b) whereas no inhibition could be observed in normal astrocytes at all doses Fig. 1 TQ reduces cell viability of glioblastoma cells but not of normal astrocytes and fibroblasts. Cells were treated with the indicated concentrations of TQ for 24 h. Viable cells were determined by the trypan blue (black square) and MTS methods (grey square). a TQ starts to trigger cytotoxicity at the concentration of 50 µM in both U-87 and CCF-STTG1 glioblastoma cells. b Note that TQ did not significantly decrease normal BJ fibroblasts and normal human astrocytes viability at all concentrations tested in the study



tested thus establishing a specificity of TQ effect toward cancer cells. It is interesting to note that in control condition, the migration speed of glioblastoma cells is higher than those of normal astrocytes. In addition, we observed that TQ induced a round cellular shape in glioblastoma cells suggesting that TQ might impair cell adhesion.

Fig. 2 TO decreases the migration speed of U-87 and CCF-STTG1 cells but not of normal astrocytes. a Phase contrast microscopy images taken at t024 h of a wound healing assay performed on non-treated cells (0) and cells treated with 15  $\mu$ M of TQ. Dashed lines represent the border of the lesion made at t00. Of note, the slowed migration rate observed over 24 h of TQ exposure in glioblastoma but not their normal counterpart. b Quantification of migration speed shows a dose-dependent reduction in glioblastoma cell motility after 24 h of TQ treatment



### TQ decreased U-87 and CCF-STTG1 cell adhesion

To investigate whether TQ-induced change in cell morphology was due to impaired adhesion, we tested the adhesion of TQ-treated cells to fibronectin. The results showed that TQ induced a significant decrease in both U-87 and CCF-STTG1 cell adhesion (Fig. 3). Indeed, adhesion decreased by 51.94%, 63.83% and 72.69% as compared to control in U-87 cells and by 33.79%, 38.6%, and 47.88% in CCF-STTG1 cells, after addition of 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M and 50  $\mu$ M of TQ respectively. However, TQ displayed no effect on cell adhesion in normal astrocyte. As cell adhesion is dependent of focal

Fig. 3 TO decreases U-87 and CCF-STTG1 cell adhesion. a U-87 and CCF-STTG1 cells were treated with increasing concentrations of TO and allowed to attach for 30 min. Percentages of adherent cells were normalized to control. Glioblastoma cell adhesion decreased in a dosedependent manner over TQ treatment. b Control and TQtreated cells were labelled for focal adhesions and actin filaments using anti-FAK Ab (green) and phalloidin probe (red) respectively. Over 18 h of exposure to TQ, both focal adhesions and actin organization were disrupted in glioblastoma cells but not in their normal counterpart

contacts formation, which serve as traction points for actin based stress fibers, actin cytoskeletal organization was evaluated by immunofluorescence in both control and TQ-treated cells. As shown in Fig. 3, in control cells, FAK-labeled focal adhesion sites were clearly observed at the cell periphery together with well-organized stress fibers. In contrast, addition of 30  $\mu$ M TQ abolished focal adhesion structures which was associated with a disorganization of the actin network in both U-87 and CCF-STTG1 cell lines but not in normal astrocytes. These data showed that TQ-induced morphological changes in glioblastoma cells were due to the disruption of focal adhesions and actin cytoskeletal organization.



### TQ decreased FAK phosphorylation and expression in U-87 and CCF-STTG1 cells

FAK relays signals from integrin-clustering to intracellular actin filaments in order to control adhesion and cell motility [3]. The fact that TQ has induced focal adhesions and actin cytoskeleton disruption, prompted us to investigate whether FAK expression or phosphorylation were down-regulated by TQ treatment. For this purpose, western blot analyses were done using antibodies that recognize phosphorylated FAK at Tyr 397 and Tyr 925. As shown in Fig. 4a, cells treated with 30  $\mu$ M of TQ for 15 to 45 min revealed a time-

dependent decrease of both Tyr 397 and Tyr 925 phosphorylation. For U-87 cells, a decrease in tyrosine phosphorylation was observed after 15 min of treatment with a 21.72% and 80.15% reduction in Tyr 397 and Tyr 925 phosphorylation respectively. For CCF-STTG1 cells, the phosphorylation states of FAK significantly decreased after 30 min of treatment, with a reduction of 33.39% for Tyr 397 and 49.01% for Tyr 925. We next examined whether longer time exposure of glioblastoma cells to TQ could affect FAK expression and downstream signaling pathway. As observed in Fig. 4b, following 24 h of treatment, TQ induced a dosedependent decrease in FAK expression levels in both U-87

Fig. 4 Effects of TQ treatment on the phosphorylation and expression of FAK and ERK proteins in U-87 and CCF-STTG1 cells. a U-87 and CCF-STTG1 cells were treated with 30 µM of TQ for 15, 30 and 45 min. Western blots were performed using phospho-specific antibodies directed against FAK Tyr 397 and Tyr 925. Percentages of phosphorylation were normalized to control. The phosphorylation states of both Tyr 397 and Tyr 925 decreased timedependently after addition of 30 µM of TQ. b. Cells were incubated for 24 h with different concentrations of TQ. The level of total FAK and ERK expressions as well as the phosphorylation state of ERK were assessed by western blot. FAK expression was quantified by normalization to control. Note that FAK expression was reduced in both glioma cell lines after addition of 30 and 50 µM of TQ



and CCF-STTG1 cells (Fig. 4b). Moreover, it is well-known that FAK modulates ERK signaling pathway [4], therefore, to determine whether TQ could down-regulate ERK in glioblastoma cells, we probed for ERK1/2 phosphorlyation and expression after addition of different concentrations of TQ. As shown in Fig. 4b, while ERK expression remained stable, its phosphorylation states decreased over TQ treatment in both U-87 and CCF-STTG1 cells.

### TQ decreased U-87 and CCF-STTG1 cell invasion via reduced MMP-2 and MMP-9 secretion

As the FAK-ERK signaling pathway modulates metalloproteinases (MMPs) secretion in carcinoma cells from various origin [24, 25], we addressed whether TQ could down-regulate the secretion of two MMPs known to be regulated by the FAK pathway, namely MMP-2 and MMP-9 [26] in glioblastoma cells. Zymography analysis of both U-87 and CCF-STTG1 conditioned media treated or not during 24 h with different concentrations of TQ showed a dose-dependent decrease in both MMP-2 and MMP-9 secretion (Fig. 5a). Since the inhibition of MMPs secretion should lead to altered invasion processes, we next investigated whether TQ reduced U-87 and CCF-STTG1 cell invasion using modified Boyden chambers. Quantification of cells having passed the basement membrane to the lower chambers indicated that TQ significantly decreased U-87 and CCF-STTG1 cell invasion in a dose-dependent fashion (Fig. 5b). The percentage of inhibition was 27.66% and 54% for U-87 cells and 44.36%, 68.26% for CCf-STTG1 cells with 30 and 50  $\mu$ M of TQ respectively. Based on these findings we propose that TQ impaired glioblastoma cell invasion by altering the secretion of MMP-2 and MMP-9 via modulation of the FAK-ERK signaling pathway.

Taken together, these results suggest an essential role of TQ in the modulation of the FAK signaling pathway in glioblastoma cells, leading to impaired adhesion, migration and invasion processes, thus demonstrating a potential benefit from using TQ in glioblastoma treatment.

Fig. 5 TO reduces U-87 and CCF-STTG1 cell invasion. a U-87 and CCF-STTG1 cells were incubated in serum free media then treated or not with different concentrations of TQ. 24 h later, conditioned media were collected and subjected to zymography as detailed in the materials and methods section. Percentages of MMP-2 and MMP-9 secretion were normalized to control and revealed a dose-dependent decrease of both MMPs secretion with TQ treatment. b U-87 and CCF-STTG1 cells were seeded in the inner part of inserts in serum free conditions and were allowed to migrate through the ECM coated layer using FBS chemoattractive force. After overnight incubation, invasive cells were stained, extracted and  $OD^s$  were measured at  $\lambda_{560nm}$ . Percentages of invasive cells were normalized to control and showed a significant decrease in cell invasion with 30 µM and 50 µM of TQ



### Discussion

Limited studies are available regarding TQ effects in glioblastoma, and most of them are evaluating the pro-apoptotic potential of TQ [21, 23]. Along with previous work done on glioblastoma [21, 23], and other cancer cell types [27], we showed that TQ was cytotoxic to glioblastoma cells at the concentration of 50 µM, without significantly affecting normal astrocytes or fibroblasts viability (Fig. 1). These data is in accordance with previous findings describing the specific cytotoxic properties of TO that can exclusively target cancer cells without affecting their normal counterparts [19-21]. Therefore, this specificity of TQ could represent an interesting feature for testing TQ clinically, since high active doses of chemotherapeutic agents are often cytotoxic to normal cells. Moreover, cell motility and proteolytic activities play crucial roles in cancer metastasis. Thus, it is important to document the potential effect of TQ on the signalling pathways related to cell invasion. To our knowledge, the anti-invasive properties of TQ in glioblastoma have never been reported before. In order to investigate the effects of TQ on human glioblastoma cell adhesion, migration and invasion, TQ was used in this study at doses that did not significantly affect cell viability. Hence, we showed that TQ reduced in a dose-dependent manner the migration of both U-87 and CCF-STTG1 human glioblastoma cells with a half-maximal effect for both cell lines around 15 µM (Fig. 2). Migration requires the coordination of cell protrusion at the leading edge and retraction of the cell tail. Thus, reduced migration can be due to several processes including impaired adhesion, polarization, actinbased protrusion and focal adhesion dynamic. Therefore, we tested the effect of TQ on cell adhesion and observed a dosedependent decrease of U-87 and CCF-STTG1 cells ability to adhere on fibronectin-coated dishes whereas no effect could be detected in normal astrocytes (Fig. 3a). Importantly, the concentration of TQ required to inhibit glioma cell adhesion and migration at half-maximal are similar indicating that TQ might affect a common target. Of note, during this test, TQ was added to cells just before attachment and thus, the effect of TQ cannot be attributed here to the well-know effect of TQ on apoptosis [28-30].

Because cell migration involves both actin polymerization at the leading edge and the fine control of focal adhesion formation and dissociation, we investigated by immunofluorescence whether TQ affected these processes. As observed in Fig. 3b, TQ induced disruption of focal adhesion structures together with a disorganization of the actin cytoskeleton in glioblastoma but not in normal astrocyte. FAK, one of the major kinases of focal adhesions, is a critical regulator involved in focal adhesion turn-over [31]. FAK is also a pivotal signalling component of the molecular framework that induces the formation of cytoskeletal structures and membrane protrusions required during cell adhesion and motility [32, 33]. FAK tyrosine phosphorylation is associated with signals transduction, and many studies pointed out its role in promoting the migration and invasion of cancer cells [34, 35]. Our study revealed that TQ has induced a decrease of FAK phosphorylation at both Tyr 397, and Tyr 925 (Fig. 4a), which in turn may trigger altered migration rates as observed in Fig. 2. This is in agreement with several previous studies reporting that phosphorylation of FAK at Tyr 397 is associated with focal adhesion disassembly and thus regulates cell migration [30, 36]. Moreover, this is also in accordance with the decrease of focal adhesion turn-over observed in cells expressing FAK mutated at Tyr 925 [37, 38]. Of importance, in melanoma cells, this mutation led to a decrease in cell metastasis [39]. Finally, the correlation between TQ-induced reduction of FAK phosphorylation and TQ effects on cell migration was also recently highlighted in pancreatic cancer cells [40]. On the other hand, longer time-exposure of cells to TQ greatly inhibited FAK expression. This is in accordance with previous work showing FAK down-regulation after TQ treatment [41] However, as both transcriptional [42] and post-transcriptional [40] mechanisms were described for the inhibition of protein expressions by TQ, further studies might be needed to determine precisely the mechanism by which TQ down-regulated FAK expression in glioblastoma cells. Nevertheless, taken together, these data are in favor of TQ benefic effects in reducing cancer cells motility through FAK down-regulation.

Yet, it is intriguing to note that addition of 30 µM of TQ while inducing inhibition of FAK phosphorylation as well as FAK down-regulation was without effect on glioblastoma cell viability (Fig. 1). Indeed, FAK is well known to regulate survival pathways via a least two different ways. The first implicate binding of PI3K to FAK phosphorylated at Tyr397 leading to activation of Akt [43]. The second involves inhibition of the tumor suppressor p53 as a consequence of direct interaction between the N-terminal domain of FAK and the N-terminal domain of p53 [44]. Therefore, inhibition of FAK phosphorylation and expression should potentially lead to a decrease in cell viability. Nevertheless, mutations in the tensin homolog PTEN, a negative regulator of PI3K, leads to abolition of PTEN activity and to constitutive activation of the PI3K/Akt pathway. Such mutations in PTEN gene are found in most glioblastoma cells including U-87 [45, 46], which may explain in part the apparent insensitivity of FAK down-regulation in glioblastoma cell viability. This is in accordance with our previous studies showing no increase in U-87 cell death after inhibition of FAK by over expression of FAK mutated at Tyr 397, whereas cell migration was clearly decreased [36]. Of note, as the N-terminal domain of FAK is lacking in FRNK (Focal Related Non Kinase), the dominant negative form of FAK,

inhibition of FAK by FRNK over expression may result in increased apoptosis via lost of p53 inhibition which again was never observed in our studies [47]. Taken together, our results suggest that FAK down-regulation does not induce cell apoptosis in glioblastoma cells and therefore, TQ-mediated decrease in glioblastoma cell viability observed at doses over 50  $\mu$ M may involve PI3K and p53-independent pathways. This is in accordance with recent studies showing that TQ triggers glioblastoma cell apoptosis in a p53-independent pathway but via mitochondrial pathway [21] and/or induction of proteasome inhibition [23].

We also explored whether the TQ-driven FAK downregulation could affect glioblastoma cell invasion. Indeed, beside promoting cell adhesion and migration, FAK signaling plays a pivotal role in promoting glioblastoma invasion and MMPs production [10, 48, 49]. MMPs are a family of neutral endopeptidases that catalyze ECM components degradation [50]. Among them, MMP-2 and MMP-9 are being paid considerable attention as high levels of those MMPs are correlated with invasive phenotypes [51]. Invasion assay and zymography analysis of both U-87 and CCF-STTG1 cells revealed a decrease in cell invasion over exposure to TQ (Fig. 5b) together with a decrease in MMP-2 and MMP-9 secretion (Fig. 5a). Moreover, we have shown that TQ has reduced ERK phosphorylation (Fig. 4b). As FAK expression promotes MMP-2 and MMP-9 secretion through the ERK signaling pathway [24, 25, 52], we propose that TO, via the inhibition of FAK phosphorylation, decreased MMPs secretion leading to reduced invasion processes. The mechanism may involve specific inhibition of FAK phosphorylation at Tyr 925 as this phosphorylation site has been shown to be a binding site for Grb2 [53], thus leading to the ERK pathway activation [54, 55].

Finally, it should be emphasized that although ERK and MMPs are known to be down-stream molecules of the FAK pathway, an alternative explanation for our results would be that TQ, instead of exclusively targeting FAK, would have a broader action by down-regulating key molecules implicated in adhesion, migration and invasion signalling pathways. Further studies will be needed to solve this issue. Moreover, as we found that TQ affects both FAK expression and, at early time points, FAK phosphorylation, it would be also of importance to pinpoint the potential binding site of TQ in the FAK sequence. In conclusion, our study has shown that non-cytotoxic doses of TQ, the main active compound of nigella Sativa can reduce migration and invasion of U-87 and CCF-STTG1 glioblastoma cells in vitro, through a mechanism implicating the down-regulation of FAK, phospho-ERK, MMP-2 and MMP-9. This suggests TQ as a potential anti-neoplasic agent for glioblastoma management.

Acknowledgements This work was supported in part by grants from the Ligue Contre le Cancer (Comités de la région Alsace) to P. Rondé. K. Kolli-Bouhafs was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche.

### References

- Mangiola A, Anile C, Pompucci A, Capone G, Rigante L, De Bonis P (2010) Glioblastoma therapy: going beyond Hercules Columns. Expert Rev Neurother 10(4):507–514
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ (2010) Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin 60 (3):166–193
- Zhao J, Guan JL (2009) Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. Cancer Metastasis Rev 28(1–2):35–49
- Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D (2004) Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. Biochim Biophys Acta 1692(2–3):77–102
- Lark AL, Livasy CA, Dressler L, Moore DT, Millikan RC, Geradts J, Iacocca M, Cowan D, Little D, Craven RJ, Cance W (2005) High focal adhesion kinase expression in invasive breast carcinomas is associated with an aggressive phenotype. Mod Pathol 18 (10):1289–1294
- Lark AL, Livasy CA, Calvo B, Caskey L, Moore DT, Yang X, Cance WG (2003) Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. Clin Cancer Res 9(1):215–222
- Beierle EA, Massoll NA, Hartwich J, Kurenova EV, Golubovskaya VM, Cance WG, McGrady P, London WB (2008) Focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma: immunohistochemical and real-time PCR analyses. Clin Cancer Res 14(11):3299–3305
- Natarajan M, Hecker TP, Gladson CL (2003) FAK signaling in anaplastic astrocytoma and glioblastoma tumors. Cancer journal (Sudbury, Mass 9 (2):126–133
- Hecker TP, Grammer JR, Gillespie GY, Stewart J Jr, Gladson CL (2002) Focal adhesion kinase enhances signaling through the Shc/ extracellular signal-regulated kinase pathway in anaplastic astrocytoma tumor biopsy samples. Cancer Res 62(9):2699–2707
- Jones G, Machado J Jr, Tolnay M, Merlo A (2001) PTENindependent induction of caspase-mediated cell death and reduced invasion by the focal adhesion targeting domain (FAT) in human astrocytic brain tumors which highly express focal adhesion kinase (FAK). Cancer Res 61(15):5688–5691
- Treasure J (2005) Herbal medicine and cancer: an introductory overview. Semin Oncol Nurs 21(3):177–183
- Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R (2006) Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. Int J Biochem Cell Biol 38(8):1249–1253
- Padhye S, Banerjee S, Ahmad A, Mohammad R, Sarkar FH (2008) From here to eternity - the secret of Pharaohs: Therapeutic potential of black cumin seeds and beyond. Canc Ther 6(b):495–510
- Banerjee S, Padhye S, Azmi A, Wang Z, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH, Mohammad RM (2010) Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. Nutr Cancer 62 (7):938–946
- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA (2008) Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats. J Ayub Med Coll Abbottabad 20 (2):25–27
- Gali-Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El-Hajj Z, Diestel A, Evert M, El-Najjar N, Peters B, Jurjus A, Roessner A, Schneider-Stock R (2008) Thymoquinone reduces mouse colon

tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. J Cell Mol Med 12(1):330–342

- 17. Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H (2010) Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. J Exp Clin Cancer Res 29:87
- Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M (2008) Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. Mol Cancer Ther 7(7):1789–1796
- Ivankovic S, Stojkovic R, Jukic M, Milos M, Milos M, Jurin M (2006) The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. Exp Oncol 28(3):220–224
- 20. El-Najjar N, Chatila M, Moukadem H, Vuorela H, Ocker M, Gandesiri M, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H (2010) Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. Apoptosis 15(2):183–195
- 21. Gurung RL, Lim SN, Khaw AK, Soon JF, Shenoy K, Mohamed Ali S, Jayapal M, Sethu S, Baskar R, Hande MP (2010) Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. PLoS One 5(8):e12124
- 22. Rondé P, Giannone G, Gerashymova I, Stoeckel H, Takeda K, Haiech J (2000) Mechanism of calcium oscillations in migrating human astrocytoma cells. Biochimica et Biophysica Acta (Molecular Cell Research) 1498:273–280
- Cecarini V, Quassinti L, Di Blasio A, Bonfili L, Bramucci M, Lupidi G, Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Angeletti M, Eleuteri AM (2010) Effects of thymoquinone on isolated and cellular proteasomes. FEBS J 277(9):2128–2141
- 24. Xu HY, Qian AR, Shang P, Xu J, Kong LM, Bian HJ, Chen ZN (2007) siRNA targeted against HAb18G/CD147 inhibits MMP-2 secretion, actin and FAK expression in hepatocellular carcinoma cell line via ERK1/2 pathway. Cancer Lett 247(2):336–344
- 25. Mon NN, Hasegawa H, Thant AA, Huang P, Tanimura Y, Senga T, Hamaguchi M (2006) A role for focal adhesion kinase signaling in tumor necrosis factor-alpha-dependent matrix metalloproteinase-9 production in a cholangiocarcinoma cell line, CCKS1. Cancer Res 66(13):6778–6784
- 26. Mon NN, Ito S, Senga T, Hamaguchi M (2006) FAK signaling in neoplastic disorders: a linkage between inflammation and cancer. Ann N Y Acad Sci 1086:199–212
- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK (2003) In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. Int J Oncol 22(1):107–113
- Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R (2004) Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. Int J Oncol 25 (4):857–866
- 29. El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA (2005) Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. Int J Cancer 117(3):409–417
- 30. Abusnina A, Alhosin M, Keravis T, Muller CD, Fuhrmann G, Bronner C, Lugnier C (2011) Down-regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1A is the key event of p73 and UHRF1 deregulation in thymoquinone-induced acute lymphoblastic leukemia cell apoptosis. Cell Signal 23(1):152–160
- Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF (2004) FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. Nat Cell Biol 6(2):154–161
- Schaller MD (2010) Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. J Cell Sci 123(Pt 7):1007–1013

- Parsons JT (2003) Focal adhesion kinase: the first 10 years. J Cell Sci 116(Pt 8):1409–1416
- 34. Grisaru-Granovsky S, Salah Z, Maoz M, Pruss D, Beller U, Bar-Shavit R (2005) Differential expression of protease activated receptor 1 (Par1) and pY397FAK in benign and malignant human ovarian tissue samples. Int J Cancer 113(3):372–378
- 35. Aronsohn MS, Brown HM, Hauptman G, Kornberg LJ (2003) Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. Laryngoscope 113(11):1944–1948
- 36. Hamadi A, Bouali M, Dontenwill M, Stoeckel H, Takeda K, Ronde P (2005) Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. J Cell Sci 118 (Pt 19):4415–4425
- 37. Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ, Serrels B, Metcalf CA 3rd, Sawyer TK, Frame MC (2005) Identification of Srcspecific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. Cancer Res 65(4):1335– 1342
- Deramaudt TB, Dujardin D, Hamadi A, Noulet F, Kolli K, De Mey J, Takeda K, Ronde P (2011) FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. Mol Biol Cell 22(7):964–975
- 39. Kaneda T, Sonoda Y, Ando K, Suzuki T, Sasaki Y, Oshio T, Tago M, Kasahara T (2008) Mutation of Y925F in focal adhesion kinase (FAK) suppresses melanoma cell proliferation and metastasis. Cancer Lett 270(2):354–361
- 40. Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Smith LM, Das S, Arafat HA, Batra SK (2010) Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies. Mol Cancer Ther 9 (5):1419–1431
- 41. Yi T, Cho SG, Yi Z, Luo W, Wang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M (2008) Thymoquinone inhibits angiogenesis and prostate tumor growth by suppressing MAPK signaling pathways. The FASEB Journal 22:654.1
- 42. Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC (2010) Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. Experimental biology and medicine (Maywood) 235(6):751–760
- Chen HC, Appeddu PA, Isoda H, Guan JL (1996) Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem 271 (42):26329–34
- 44. Golubovskaya VM, Finch R, Cance WG (2005) Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the Nterminal transactivation domain of p53. J Biol Chem 280 (26):25008–21
- 45. Singh G, Chan AM (2001) Post-translational modifications of PTEN and their potential therapeutic implications. Curr Cancer Drug Targets 11(5):536–47
- 46. Gu J, Tamura M, Pankov R, Danen EH, Takino T, Matsumoto K, Yamada KM (1999) Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. J Cell Biol 146:389–403
- 47. Giannone G, Rondé P, Gaire M, Haiech J, Takeda K (2002) Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells. J Biol Chem 277:26364– 26371
- 48. Hu B, Jarzynka MJ, Guo P, Imanishi Y, Schlaepfer DD, Cheng SY (2006) Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the alphavbeta1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway. Cancer Res 66(2):775–783

- 49. Lu W, Zhou X, Hong B, Liu J, Yue Z (2004) Suppression of invasion in human U87 glioma cells by adenovirus-mediated co-transfer of TIMP-2 and PTEN gene. Cancer Lett 214 (2):205–213
- 50. Yip D, Ahmad A, Karapetis CS, Hawkins CA, Harper PG (1999) Matrix metalloproteinase inhibitors: applications in oncology. In- vest New Drugs 17(4):387–399
- Uhm JH, Dooley NP, Villemure JG, Yong VW (1997) Mechanisms of glioma invasion: role of matrixmetalloproteinases. Can J Neu- rol Sci 24(1):3–15
- Park JB, Kwak HJ, Lee SH (2008) Role of hyaluronan in glioma invasion. Cell Adh Migr 2(3):202–207

- Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P (1994) Integrin- mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 bind- ing to focal adhesion kinase. Nature 372(6508):786–791
- 54. Schlaepfer DD, Hunter T (1997) Focal adhesion kinase overex- pression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mito- gen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. J Biol Chem 272(20):13189–13195
- 55. Schlaepfer DD, Jones KC, Hunter T (1998) Multiple Grb2- mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mito- gen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinaseinitiated tyrosine phosphorylation events. Mol Cell Biol 18(5):2571–2585

### Effet de la thymoquinone sur la dégradation des protéines α et β tubuline dans les cellules cancéreuses humaines et dans les fibroblastes normaux humains.

### Résumè (Publication 7)

Dans cette étude nous avons évalué l'effet de la thymoquinone (TQ) sur l'expression de la tubuline  $\alpha / \beta$  dans les cellules d'astrocytomes humains (la lignée U87) et dans les cellules jurkat (cellules Leucémiques).

Nous avons montré que la thymoquinone induit une dégradation de la tubuline  $\alpha / \beta$  d'une manière concentration et temps dépendante dans les lignées U87 et dans les cellules jurkat *(cellules Leucémiques)*. Cette dégradation est associée à une augmentation de l'expression du gène suppresseur de tumeur p73. La TQ n'a aucun effet sur l'expression de la tubuline  $\alpha / \beta$  dans les fibroblastes humains normaux. La TQ exerce un effet sélectif envers la tubuline  $\alpha / \beta$  dans les cellules cancéreuses est pourrait représenter un nouveau médicament anti-microtubulaire

Anti-neoplastic agent thymoquinone induces degradation of  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts. Mahmoud Alhosin, Abdulkhaleg Ibrahim, Abdelaziz Boukhari, Tanveer Sharif, Jean-Pierre Gies & Cyril Auger, Valérie B. Schini-Kerth. Invest. New Drugs 2011, 10637-011-9734-1.

# Publication 7

🖄 Springer

🖄 Springer

### PRECLINICAL STUDIES

### Anti-neoplastic agent thymoquinone induces degradation of $\alpha$ and $\beta$ tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts

Mahmoud Alhosin. Abdulkhaleg Ibrahim. Abdelaziz Boukhari. Tanveer Sharif. Jean-Pierre Gies. Cyril Auger. Valérie B. Schini-Kerth

Received: 1 July 2011 / Accepted: 9 August 2011 © Springer Science+Business Media, LLC 2011

Summary The microtubule-targeting agents derived from natural products, such as vinca-alkaloids and taxanes are an important family of efficient anti-cancer drugs with therapeutic benefits in both haematological and solid tumors. These drugs interfere with the assembly of microtubules of  $\alpha/\beta$  tubulin heterodimers without altering their expression level. The aim of the present study was to investigate the effect of thymoquinone (TQ), a natural product present in black cumin seed oil known to exhibit putative anti-cancer activities, on  $\alpha/\beta$  tubulin expression in human astrocytoma cells (cell line U87, solid tumor model) and in Jurkat cells (T lymphoblastic leukaemia cells). TQ induced a concentration- and time-dependent degradation of  $\alpha/\beta$ tubulin in both cancer cell types. This degradation was associated with the up-regulation of the tumor suppressor p73 with subsequent induction of apoptosis. Interestingly, TQ had no effect on  $\alpha/\beta$  tubulin protein expression in normal human fibroblast cells, which were used as a noncancerous cell model. These data indicate that TQ exerts a

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10637-011-9734-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Alhosin · A. Ibrahim · A. Boukhari · T. Sharif · J.-P. Gies · C. Auger · V. B. Schini-Kerth CNRS UMR 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

V. B. Schini-Kerth (<sup>ste</sup>) CNRS UMR 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 Illkirch, France e-mail: valerie.schini-kerth@unistra.fr selective effect towards  $\alpha/\beta$  tubulin in cancer cells. In conclusion, the present findings indicate that TQ is a novel anti-microtubule drug which targets the level of  $\alpha/\beta$  tubulin proteins in cancer cells. Furthermore, they highlight the interest of developing anti-cancer therapies that target directly tubulin rather than microtubules dynamics.

Keywords Microtubule · Thymoquinone · Apoptosis · Tumor suppressor gene p73 · Natural product

### Introduction

Microtubules, the major cytoskeleton components in cells, are composed of  $\alpha/\beta$  tubulin subunits. This structure is considered as one of the best targets in cancer chemotherapy [1]. Several natural compounds can target and inhibit successfully the normal function of microtubules [2]. The vinca-alkaloids and the taxanes are among the most important anti-microtubule drugs [2]. Indeed, microtubuletargeting drugs (MTDs) interfere with the assembly of microtubules of  $\alpha/\beta$  tubulin heterodimers without altering their expression level [3]. Although MTDs have clinical therapeutic benefits against haematological and solid tumors, the development of resistance to these drugs, their specificity towards tumors, and the induction of neutropenia, myeloid and neurological toxicities are the major problems observed during their clinical applications [4-10]. Deficiency of MTDs-induced apoptotic pathways in different cancers has been suggested as a mechanism of resistance to these drugs [11]. In this context, it has been suggested that p53 might be a guardian of microtubules composition and that mutations in p53 are likely to contribute to the development of resistance to MTDs [11]. Thus, increasing the tissue

specificity, reducing the side effects, especially the peripheral neuropathy and leukopenia, are major objectives in the current research for new MTDs.

Many studies have shown that thymoguinone (TO), a natural product present in black cumin seed oil with antiinflammatory and anti-cancer activities, is a potent cytotoxic agent against many types of human cancer cells [12, 13]. It has been reported that TQ exerts its anti-cancer effects through the inhibition of cell growth, cell cycle arrest with subsequent apoptosis [14-17]. TQ can induce apoptosis in cancer cells by p53-dependent and independent pathways [12, 16]. The TQ-induced apoptosis in p53-null myeloblastic leukemia and human osteosarcoma cells involves an increase in the Bax/Bcl2 ratio and the activation of caspases [18, 19]. Recently, we have shown that TQ induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell line (Jurkat cells), a p53-deficient cell line, through activation of the tumor suppressor p73, the structural and functional homolog of p53, which targets the anti-apoptotic protein UHRF1 (Ubiquitin-like PHD Ring Finger 1) [12]. Unlike p53, which is mutated in 50% of cancer cells, the mutations of the p73 gene are very rare (less than 1%), making it as an alternative strategy for anti-cancer treatment, especially for those where p53 is deficient or mutated [20, 21]. Indeed, several studies have proposed that p73 is a novel promising target for cancer therapy [22–26].

The present study has indicated that TQ induces the degradation of  $\alpha/\beta$  tubulin in human astrocytoma cells (cell line U87) and in the p53-deficient Jurkat cell line. This degradation is associated with p73 up-regulation in both cancer cell lines. Interestingly, TQ had no effect on  $\alpha/\beta$  tubulin protein level in normal human fibroblast cells. Altogether, the present findings suggest that TQ is a new MTD exhibing specificity towards cancer cells.

### Material and methods

### Cell culture and treatment

The human astrocytoma cells (line U87, WHO grade IV) and human T lymphocyte cell line Jurkat were obtained from the America Type Culture Collection (Mannassa, VA, USA). Cell lines were maintained in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, and were grown in EMEM (Biowhitaker, Lonza, Belgium) for human astrocytoma cells and RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) for Jurkat cells and human fibroblast cells. Both media were supplemented with 15% (v/v) fetal calf serum (FCS, Biowhitaker,), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin (Sigma St. Louis, MO). For all treatments, a 100 mM solution of TQ (Sigma–Aldrich, St) was prepared in 100% DMSO (Dimethylsulfoxide; Millipore S.A.S.,

Molsheim, France) and appropriate working concentrations were prepared with cell culture medium. The final concentration of DMSO was less than 0.1% in both control and treated conditions.

### Western blot analysis

Cells were treated with TQ at different concentrations and incubated for the indicated time. Cells were then harvested and centrifuged at 200 g for 5 min at room temperature. The pellets were resuspended in RIPA buffer (25 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing different protease inhibitors (Sigma-Aldrich) and incubated on ice for 20 min. The cell suspensions were then sonicated three times (30 s each) and the supernatants containing the proteins were collected after centrifugation at 10,000g for 16 min at 4°C. The protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France), as previously described [27]. Immunoblot was performed using either a mouse monoclonal anti-ß tubulin antibody (Sigma–Aldrich), a purified monoclonal anti- $\alpha$ tubulin (Clone 10D8) antibody (Biolegend, San Diago, CA), a mouse monoclonal anti-p73 antibody (BD Biosciences Pharmingen), a mouse monoclonal anti-UHRF1 antibody (Proteogenix, Oberhausbergen, France), or a mouse monoclonal anti- $\beta$  actin antibody (Abcam, Paris, France), according to the manufacturer's instructions.

### Apoptosis assay

For detection of apoptosis, the annexin V-binding capacity of treated cells was examined using the annexin V Binding Guava Nexin<sup>®</sup> Assay by capillary cytometry (Guava Easycyte Plus HP system, with absolute cell count and six parameters) following the manufacturer's recommendations (Guava Technologies Inc, Hayward, CA, USA). Guava Nexin<sup>®</sup> Assay utilizes annexin V-Phycoerythrin (PE) to detect phosphatidylserine (PS) on the external membrane of apoptotic cells. The cell impermeant dye, 7-Amino-Actinomycin (7AAD), is used in the Guava Nexin<sup>®</sup> Assay as an indicator of cell membrane structural integrity. 7-AAD is excluded from viable cells as well as early apoptotic cells. Jurkat cells were seeded into 6-multiwell plates at a density of  $2 \times 10^6$  cells/well, grown for 24 h and exposed to TQ at different concentrations for 24 h. Jurkat cells were stained directly in the 96-well microplate with 100 µl of Guava Nexin Reagent, a pre-made cocktail containing annexin V-PE and 7-AAD in buffer, in 200 µl final volume. After 20 min incubation at room temperature, the samples were analysed using Guava® System.

### Statistical analysis

Data are presented in a bar graph form, expressed as means  $\pm$ SEM from at least three independent experiments. Statistical analyses were performed using the one-way ANOVA. Significance levels were defined as \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001 (versus the corresponding untreated group).

### Results

## TQ induces a concentration-dependent degradation of $\alpha/\beta$ tubulin associated with p73 up-regulation in human astrocytoma cells (line U87)

We first investigated the effect of TQ on  $\alpha/\beta$  tubulin and p73 proteins in human astrocytoma cells (line U87 MG, Fig. 1). For this purpose, human astrocytoma cells were exposed to different concentrations of TQ for 24 h. We observed that TQ induces a concentration-dependent  $\alpha/\beta$ tubulin down-regulation in U87 MG cells (Fig. 1). Indeed, TQ at 100  $\mu$ M caused a pronounced decrease in  $\alpha$  tubulin level, while  $\beta$  tubulin was undetectable (Fig. 1). TQinduced  $\alpha/\beta$  tubulin degradation in astrocytoma cells was associated with a concentration-dependent p73 upregulation which started at 50  $\mu$ M suggesting that  $\alpha/\beta$ tubulin degradation is a downstream effect of p73 upregulation in the mechanism of action of TQ. These results show that TQ induced  $\alpha/\beta$  tubulin down-regulation associated with the up-regulation of p73 in human astrocytoma cells (line U87).



Fig. 1 Effects of TQ on  $\alpha/\beta$  tubulin and p73 expression in human astrocytoma cells (cell line U87). Cells were exposed to TQ at the indicated concentration and incubated for 24 h. Immunoblot analyses were performed as described in "Material and methods" with different antibodies. Specific bands were detected with their expected apparent molecular weight. All membranes were reblotted with an anti  $\beta$  actin probe to ensure equal protein loading and transfer. The data are representative of at least three independent experiments

TQ induces a concentration- and time-dependent degradation of  $\alpha/\beta$  tubulin in acute lymphoblastic leukaemia cells (Jurkat cell line)

We have investigated the effect of TQ on the expression of  $\alpha/\beta$  tubulin in the p53-deficient Jurkat cell line. Figure 2a shows that TQ induced  $\beta$  tubulin downregulation and the appearance of a lower molecular weight form of  $\alpha$  tubulin starting at 10  $\mu$ M. Interestingly, at 50  $\mu$ M of TQ,  $\alpha/\beta$  tubulin protein level became undetectable (Fig. 2a). The apoptotic effect of TO in Jurkat cells was also studied under the same experimental conditions. Cells were exposed to different concentration of TQ for 24 h and then apoptosis was assessed as described in "Material and methods". As shown in Fig. 2b, increasing concentrations of TQ induced an increasing number of apoptotic cells. TQ began to trigger apoptosis at 10  $\mu$ M, a concentration where  $\alpha/\beta$  tubulin proteins were down-regulated. TQ at 50 µM, induced approximately apoptosis of 90% of cells (Fig. 2b), a response which was associated with a total loss of  $\alpha/\beta$ tubulin proteins (Fig. 2a). In our previous study we have shown that p73 is expressed at a low level in untreated Jurkat cells and that TQ induced a marked up-regulation of its expression starting at concentrations of or greater than 10 µM [12]. Taken together, these results indicate that TQ like in human astrocytoma cells induced  $\alpha/\beta$ tubulin down-regulation in acute lymphoblastic leukaemia cells and that this effect is associated with activation of the tumor suppressor p73 leading subsequently to apoptosis.

## TQ has no effect on $\alpha/\beta$ tubulin protein expression in normal human fibroblast cells as compared to Jurkat cells

In order to determine the chronology of the molecular events induced by TQ leading to down-regulation of  $\alpha/\beta$ tubulin proteins, we analyzed the time-course effect of TQ in Jurkat cells at 50  $\mu$ M (concentration at which  $\alpha/\beta$ tubulin proteins were completely depleted, Fig. 2a). Figure 3a shows that TQ induced a rapid  $\alpha/\beta$  tubulin down-regulation in Jurkat cells at 3 h associated with a p73 up-regulation, this decrease in the  $\alpha/\beta$  tubulin level was more pronounced at 6 h. In the next step, we have investigated the effect of TQ on  $\alpha/\beta$  tubulin protein in normal human fibroblast cells as a non-cancerous cell model (Fig. 3b). Interestingly, in the same conditions, TQ had no effect on  $\alpha/\beta$  tubulin protein expression in normal human fibroblast cells (Fig. 3b), even after 12 h of treatment (data not shown). All these findings indicate that TQ degrades  $\alpha/\beta$  tubulin proteins in Jurkat cells without affecting their level in normal human fibroblast cells.





Fig. 2 Effects of TQ on  $\alpha/\beta$  tubulin expression and apoptosis in Jurkat cells. a Cells were exposed to TQ at different concentrations and incubated for 24 h. Immunoblot analyses were performed as described in "Material and methods" with different antibodies. The data are representative of at least three independent experiments. b Cell apoptosis rate was assessed by capillary cytometry using the annexin V-Phycoerythrin (PE) and 7-Amino-Actinomycin (7AAD) staining assay. Events in each of the four quadrants were: Lower-left quadrant: viable cells, not undergoing detectable apoptosis (Annexin

### Discussion

Because of their essential role in cell proliferation, microtubules are considered as one of the best targets for the development of anti-cancer drugs [2, 28]. It has been suggested that targeting tubulin level directly without manipulating microtubules dynamics could be an additional approach to induce apoptosis in cancer cells [28]. In the present study, we evaluated the effect of TQ on  $\alpha/\beta$  tubulin protein level in human astrocytoma cells (line U87) and in p53-deficient acute lymphoblastic leukaemia cell line (Jurkat cells). Our results showed that TQ induces a concentration- and time-dependent degradation of  $\alpha/\beta$ tubulin associated with the up-regulation of tumor suppressor p73 in both cancer cell lines. In human astrocytoma cells, TQ induced  $\alpha/\beta$  tubulin down-regulation at 100  $\mu$ M

V-PE negative and 7-AAD negative cells). Lower-right quadrant: cells in the early stage of apoptosis (Annexin V-PE positive and 7-AAD negative cells). Upper right quadrant: cells in the late apoptotic or dead (Annexin V-PE positive and 7-AAD positive cells, their number, expressed as percentage relative to the total cell number, is indicated on the right). Upper-left quadrant: mostly nuclear debris (Annexin V-PE negative and 7-AAD positive). The data are representative of at least three independent experiments

while in Jurkat cells this effect started at 10 µM suggesting that leukaemia cells are more sensitive to TQ than astrocytoma cells. Interestingly, TQ had no effect on the expression of  $\alpha/\beta$  tubulin protein in normal human fibroblast cells as compared to Jurkat cells. The human astrocytoma cell line (U87 MG) is a high-grade invasive form of astrocytic brain tumors with a mean survival time of less than 1 year. As microtubules are essential components for cell division and intracellular transport, it is reasonable to suggest that  $\alpha/\beta$  tubulin degradation which was observed in TQ-treated human astrocytoma cells is likely to limit tumor cells' invasiveness. Indeed, previous studies have shown that TQ reduced colon tumor cell invasion as well as significantly inhibited the invasion of lung cancer cell [29, 30]. Presently, we dont have an explanation why TQ selectively induced  $\alpha/\beta$  tubulin

Invest New Drugs



Fig. 3 Time-course of the effects of TQ on  $\alpha/\beta$  tubulin and p73 expression in Jurkat cells and in normal human fibroblast cells. Jurkat cells (a) and normal human fibroblast cells (b) were exposed to 50  $\mu$ M of TQ for the indicated times. a, b show representative immunoblots. Similar observations were made in three independent experiments

degradation in cancer cells without affecting their level in normal cells. Since  $\alpha/\beta$  tubulin proteins are essential for cell proliferation, it is possible that because cancer cells multiply rapidly they are more sensitive to TQ compared to normal-growing cells. In agreement with such a hypothesis, we observed that TQ induced a dramatic decrease in the expression of UHRF1, an anti-apoptotic protein, which is over-expressed in numerous cancers and essential for cell proliferation [12, 13] in Jurkat cells without affecting its level in normal human fibroblast cells (Fig. 1A-B, supplementary data). Since previous studies have shown that TQ induces p73 up-regulation-dependent UHRF1 downregulation [12, 14] and that UHRF1 down-regulation induces cell cycle arrest in G2/M and apoptosis [31], it is likely that TO-induced p73 up-regulation in the present study leads to UHRF1 and  $\alpha/\beta$  tubulin degradation resulting ultimately in extensive apoptosis. Although the present study indicates that  $\alpha/\beta$  tubulin proteins are selectively degraded in human astrocytoma cells and leukaemia cells, the mechanism underlying the inhibitory effect of TQ remains to be clarified. Some studies have shown that MTDs such as paclitaxel (taxol) can induce caspaseindependent mitotic death (CIMD) by up-regulating of p73 but not its homolog p53 [32-35]. In addition, high

concentrations of TQ also induced the up-regulation of p73 with the subsequent induction of apoptosis independently of caspase 3 activation in Jurkat cells [12]. Thus, TQ might be able to induce the degradation of  $\alpha/\beta$  tubulin proteins through a caspase-independent pathway, which is activated by the up-regulation of p73. Furthermore, isothiocyanates (ITCs), one of the best chemopreventive small molecules, have been shown to induce a selective degradation of  $\alpha/\beta$  tubulin and that this degradation is initiated by their interaction resulting in the ubiquitination of  $\alpha/\beta$ tubulin and their subsequent degradation by the proteasome [36]. It has also been shown that the small molecule T0070907 (a PPAR inhibitor) is able to decrease the protein level of  $\alpha/\beta$  tubulin by activation of the proteasome pathway [37]. Since TQ is a small drug-like molecule [38, 39], it is likely that TQ decreases  $\alpha/\beta$  tubulin level in cancer cells by increasing the rate of proteasomal degradation rather than by interfering with its synthesis. The present findings suggest that TQ is an attractive MTD with potent anticancer-activity, associated to low cytotoxic effects on normal human cells and which also has antiinflammatory and neuroprotective activities as well as a sensitizing effect on cancer cells resistant to chemotherapy [15, 40-44]. In conclusion, we have shown that TQ causes in cancer cells  $\alpha/\beta$  tubulin degradation associated with p73 up-regulation. These data support the idea that small molecules can be used to decrease  $\alpha/\beta$  tubulin levels, and suggest that TQ might act as a novel and potent antimicrotubule drug.

Acknowledgments Abdulkhaleg Ibrahim is supported by a fellowship from the Libyan Higher Education Ministry and Tanveer Sharif from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), France. We thank Dr Dominique Wachsmann and Dr Ghada Alsaleh, University of Strasbourg, France for kindly gift for providing us normal human fibroblast cells.

#### References

- Zhou J, Giannakakou P (2005) Targeting microtubules for cancer chemotherapy. Curr Med Chem Anticancer Agent 5:65–71. doi:10.2174/1568011053352569
- Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. Nat Rev Cancer 4:253–265. doi:10.1038/nrc1317
- Dumontet C, Jordan MA (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov 9:790–803. doi:10.1038/nrd3253
- Huisman MT, Chhatta AA, van Tellingen O, Beijnen JH, Schinkel AH (2005) MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. Int J Cancer 116:824–829. doi:10.1002/ijc.21013
- Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, Kruh GD (2004) Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. Cancer Res 64:4927–4930. doi:10.1158/0008-5472. CAN-03-3111

- Canta A, Chiorazzi A, Cavaletti G (2009) Tubulin: a target for antineoplastic drugs into the cancer cells but also in the peripheral nervous system. Curr Med Chem 16:1315–1324
- Argyriou AA, Koltzenburg M, Polychronopoulos P, Papapetropoulos S, Kalofonos HP (2008) Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. Crit Rev Oncol Hematol 66:218–228. doi:10.1016/j. critrevonc.2008.01.008
- Vats T, Buchanan G, Mehta P, Ragab A, Hvizdale E, Nitschke R, Link M, Beardsley GP, Maybee D, Krischer J (1992) A study of toxicity and comparative therapeutic efficacy of vindesineprednisone vs. vincristine-prednisone in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. Invest New Drugs 10:231–234
- 9. Bellmunt J, Théodore C, Demkov T, Komyakov B, Sengelov L, Daugaard G, Caty A, Carles J, Jagiello-Gruszfeld A, Karyakin O, Delgado FM, Hurteloup P, Winquist E, Morsli N, Salhi Y, Culine S, von der Maase H (2009) Phase III trial of vinflunine plus best supportive care compared with best supportive care alone after a platinum-containing regimen in patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelial tract. J Clin Oncol 27:4454– 4461. doi:10.1200/JCO.2008.20.5534
- Mielke S, Sparreboom A, Mross K (2006) Peripheral neuropathy: a persisting challenge in paclitaxel-based regimes. Eur J Cancer 42:24–30. doi:10.1016/j.ejca.2005.06.030
- Galmarini CM, Kamath K, Vanier-Viornery A, Hervieu V, Peiller P, Falette N, Puisieux A, Ann Jordan M, Dumontet C (2003) Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. Br J Cancer 88:1793–1799. doi:10.1038/sj.bjc.6600960
- Alhosin M, Abusnina A, Achour M, Sharif T, Muller CM, Peluso JP, Chataigneau T, Lugnier C, Schini-Kerth VB, Bronner C, Fuhrmann G (2010) Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. Biochem Pharmacol 79:1251–1260. doi:10.1016/j. bcp.2009.12.015
- Alhosin M, Sharif T, Mousli M, Etienne-Selloum N, Fuhrmann G, Schini-Kerth VB, Bronner C (2011) Down-regulation of UHRF1, associated with re-expression of tumor suppressor genes, is a common feature of natural compounds exhibiting anti-cancer properties. J Exp Clin Cancer Res 30:41. doi:10.1186/1756-9966-30-41
- 14. Abusnina A, Alhosin M, Keravis T, Muller CM, Fuhrmann G, Bronner C, Lugnier C (2011) Down-regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1A is the key event of p73 and UHRF1 deregulation in thymoquinone-induced acute lymphoblastic leukemia cell apoptosis. Cell Signal 23:152–160. doi:10.1016/ j.cellsig.2010.08.015
- Banerjeea S, Padhyea S, Azmia A, Wanga Z, Philipa PA, Kucukb O, Sarkara FH, Mohammada RM (2010) Review on Molecular and Therapeutic Potential of Thymoquinone in Cancer. Nutrition and Cancer 62:938–946. doi:10.1080/01635581.2010.509832
- Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R (2006) Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. Int J Biochem Cell Biol 38:1249–1253. doi::10.1016/ j.biocel.2005.10.009
- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK (2003) In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. Int J Oncol 22:107–113
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA (2005) Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. Int J Cancer 117:409–417. doi:10.1002/ijc.21205
- Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H (2007) Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase

activation in human osteosarcoma cells. Cancer Biol Ther  $6{:}160{-}169{.}$  doi:10.4161/cbt.6.2.3575

- Irwin MS, Kaelin WG (2001) Role of the newer p53 family proteins in malignancy. Apoptosis 6:17–29. doi:10.1023/ A:1009663809458
- Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH (2002) p73: Friend or foe in tumorigenesis. Nat Rev Cancer 2:605–615. doi:10.1038/nrc861
- 22. Kravchenko JE, Ilyinskaya GV, Komarov PG, Agapova LS, Kochetkov DV, Strom E, Frolova EI, Kovriga I, Gudkov AV, Feinstein E, Chumakov PM (2008) Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73dependent salvage pathway. Proc Natl Acad Sci 105:6302–6307. doi:10.1073/pnas.0802091105
- Bykov VJ, Zache N, Stridh H, Westman J, Bergman J, Selivanova G, Wiman KG (2005) PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. Oncogene 24:3484–3491. doi:10.1038/sj.onc.1208419
- 24. Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, Schwartz GK (2007) Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. Oncogene 26:3473–3481. doi:10.1038/sj.onc.1210136
- Peirce SK, Findley HW (2009) The MDM2 antagonist nutlin-3 sensitizes p53-null neuroblastoma cells to doxorubicin via E2F1 and TAp73. Int J Oncol 34:1395–1402. doi:10.3892/ ijo\_00000267
- 26. Sampath D, Calin GA, Puduvalli VK, Gopisetty G, Taccioli C, Liu CG, Ewald B, Liu C, Keating MJ, Plunkett W (2009) Specific activation of microRNA106b enables the p73 apoptotic response in chronic lymphocytic leukemia by targeting the ubiquitin ligase Itch for degradation. Blood 113:3744–3753. doi:10.1182/blood-2008-09-178707
- 27. Achour M, Jacq X, Rondé P, Alhosin M, Charlot C, Chataigneau T, Jeanblanc M, Macaluso M, Giordano A, Hughes AD, Schini-Kerth VB, Bronner C (2008) The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. Oncogene 27:2187–2197. doi:10.1038/sj.onc.1210855
- Schaefer KL (2008) PPARgamma Inhibitors as Novel Tubulin-Targeting Agents. PPAR Res 2008:785405. doi:10.1155/2008/ 785405
- 29. Gali-Muhtasib H, Kuester D, Mawrin C, Bajbouj K, Diestel A, Ocker M, Habold C, Foltzer-Jourdainne C, Schoenfeld P, Peters B, Diab-Assaf M, Pommrich U, Itani W, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R (2008) Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells. Cancer Res 68:5609–5618. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0884
- 30. Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H (2010) Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. J Exp Clin Cancer Res 29:87. doi:10.1186/1756-9966-29-87
- Tien AL, Senbanerjee S, Kulkarni A, Mudbhary R, Goudreau B, Ganesan S, Sadler KC, Ukomadu C (2011) UHRF1 depletion causes a G2/M arrest, activation of DNA damage response and apoptosis. Biochem J 435:175–185. doi:10.1041/BJ20100840
- DeLuca JG, Moree B, Hickey JM, Kilmartin JV, Salmon ED (2002) hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. J Cell Biol 159:549–555. doi:10.1083/jcb.200208159
- Woods CM, Zhu J, McQueney PA, Bollag D, Lazarides E (1995) Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53independent apoptotic pathway. Mol Med 1:506–526
- Niikura Y, Dixit A, Scott R, Perkins G, Kitagawa K (2007) BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate. J Cell Biol 178:283–296. doi:10.1083/jcb.200702134

- Kitagawa K, Niikura Y (2008) Caspase-independent mitotic death (CIMD). Cell Cycle 7:1001–1005. http://dx.doi.org/10.4161/ cc.7.8.5720
- 36. Mi L, Gan N, Cheema A, Dakshanamurthy S, Wang X, Yang DC, Chung FL (2009) Cancer preventive isothiocyanates induce selective degradation of cellular alpha- and beta-tubulins by proteasomes. J Biol Chem 284:17039–17051. doi:10.1074/jbc.M901789200
- Harris G, Schaefer KL (2009) The microtubuletargeting agent T0070907 induces proteasomal degradation of tubulin. Bio- chem Biophys Res Commun 388:345–349. doi:10.1016/j. bbrc.2009.08.009
- Reindl W, Yuan J, Krämer A, Strebhardt K, Berg T (2008) Inhibition of polo-like kinase 1 by blocking polo-box domain- dependent protein-protein interactions. Chem Bio 1 15:459–466. doi:10.1016/j.chembiol.2008.03.013
- 39. Effenberger-Neidnicht K, Breyer S, Mahal K, Diestel R, Sasse F, Schobert R (2011) Cellular localisation of antitumoral 6-alkyl thymoquinones revealed by an alkyne-azide click reaction and the streptavidin-biotin system. ChemBioChem 12:1237–1241. doi:10.1002/cbic.201000762

- Tekeoglu I, Dogan A, Ediz L, Budancamanak M, Demirel A (2007) Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. Phytother Res 21:895–897. doi:10.1002/ptr.2143
- 41. Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA (2009) Anti- inflammatory effects of the Nigella sativa seed extract, thymoqui- none, in pancreatic cancer cells. HPB (Oxford) 11:373–381. doi:10.1111/j.1477-2574.2009.00059.x
- Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN (2006) Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. Eur J Pharmacol 543:40–47. doi:10.1016/j. ejphar.2006.05.046
- 43. Kanter M (2011) Protective effects of thymoquinone on the
  - neuronal injury in frontal cortex after chronic toluene exposure. J Mol Histol 42:39–46. doi:10.1007/s10735-010-9305-3
- 44. Gurung RL, Lim SN, Khaw AK, Soon JF, Shenoy K, Mohamed Ali S, Jayapal M, Sethu S, Baskar R, Hande MP (2010) Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. PLoS One 5:e12124. doi:10.1371/journal.pone.0012124

Discussion générale et perspectives

Dans ce travail nous avons montré que les mastocytes favorisent la prolifération et la migration des astrocytomes humains. Cet effet nécessite un contact direct entre les deux types cellulaires et suggère de ce fait que l'infiltration précoce de mastocytes au sein des tumeurs serait bénéfique pour le développement tumoral et néfaste pour les patients atteints d'un cancer. Ces données confirment des études épidémiologiques faisant état d'un lien étroit entre l'inflammation et le développement des cancers.

Grâce à une technique de coculture mastocytes/astrocytomes et/ou mastocytes/astrocytes nous avons montré que les mastocytes induisent la prolifération des astrocytomes humains de grade IV (U87, CCF-STTG1) et n'ont pas d'effet sur les lignées de grade III (U373 et SW-1783) ni sur les astrocytes normaux humains. Cet effet prolifératif nécessite un contact direct entre les deux types cellulaires car les mastocytes n'ont pas d'effet sur les lignées cancéreuses dans un modèle de coculture (inserts avec un diamètre de pore de 0,4µm) qui empêche le contact direct entre les deux types cellulaires. Ces observations suggèrent vraisemblablement l'implication de protéines d'adhérence cellulaire dans l'effet prolifératif des astrocytomes induit par les mastocytes. D'autre part, nous avons montré que les mastocytes induisent une augmentation de la migration des cellules U87, CCF-STTG1, U373 mais pas des astrocytes normaux humains. Dans le but de clarifier l'effet prolifératif et migratoire observé sur les lignées d'astrocytomes humains nous avons procédé à l'identification de produits pro- et anti-inflammatoires secrétés par ces lignées cancéreuses qui pourraient être à l'origine de ces effets. Des expériences de cytokine antibody array révèlent qu'en présence des mastocytes les lignées de grade IV (U87 et CCF-STGG1) libèrent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IFNy, GM-CSF : granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1) et anti-inflammatoires (IL-7, IL-10, IL-15), tandis que les lignées de grade III (U373 et SW-1783) ne secrètent pas de cytokines. De plus les mastocytes favorisent également la sécrétion des métalloprotéinases par les lignées U87, CCF-STTG1 et U373 et tout particulièrement la MMP-3 et les TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-4. Ces cytokines et métalloprotéinases pourraient participer de concert aux effets prolifératifs (Figure 30) (publication 1 : soumise).



### Figure 30 : L'effet des mastocytes sur les astrocytomes humains.

Les mastocytes stimulent la prolifération et la migration des astrocytomes ainsi que la sécrétion de cytokines et de métalloprotéinases. Ces produits libérés pourraient favoriser le développement des astrocytomes via une activité autocrine pro-mitotique et pro-migratoire.

Comme nous l'avons montré, l'effet prolifératif de lignées d'astrocytomes induit par les mastocytes nécessite un contact direct entre les deux types cellulaires. Ceci suggère des interactions cellule-cellule et l'implication de molécules d'adhérence. Aussi avons-nous ciblé le couple récepteur CD47/protéine SIRPα impliqué dans le contrôle de la balance prolifération/apoptose et le couple récepteur CD40/protéine CD40L notamment impliqué dans la sécrétion de médiateurs inflammatoires.

Le récepteur CD47, ou IAP (Integrin-Associated Protein), est une glycoprotéine ubiquitaire de 50kDa composée de 5 segments transmembranaires, qui appartient à la superfamille des Immunoglobulines. Le rôle du CD47 au sein des cellules tumorales est sujet à controverse. En effet, les premiers travaux effectués dans ce cadre ont suggéré que l'activation du CD47 induit l'apoptose des cellules leucémiques B et T (Mateo et al., 1999 ; Manna and Frazier, 2003) ou des cellules tumorales mammaires. D'autres travaux suggèrent que le récepteur CD47 induit la prolifération cellulaire et attribuent au récepteur CD47 un role protecteur dans l'apoptose induite par la doxorubicine ou par les céramides (Rath et al., 2006 a,b). Nous avons montré que l'activation du CD47 par le peptide agoniste 4N1 induit une augmentation de la prolifération des cellules U87 et U373. L'activation du CD47 dans les astrocytes normaux ne stimule pas leur prolifération. Des anticorps bloquants dirigés contre le CD47 (B6H12 et 2D3) induisent une diminution de la prolifération des lignées U87 et U373. Ceci suggère que le récepteur *CD47 est constitutivement activé* dans les astrocytomes. Ces résultats sont compatibles avec des études décrivant l'expression des ligands endogènes du récepteur CD47 comme la protéine SIRP $\alpha$  et la trombospondine-1 (TSP-1) dans les
astrocytomes (Chen et al., 2004; Kawataki et al., 2000). Dans les tissus du cerveau normal, la TSP-1 n'est pas exprimée (ou faiblement exprimée) alors que les glioblastomes expriment des niveaux élevés de TSP-1. De plus, cette surexpression de TSP-1 est corrélée avec le degré de malignité (Kawataki et al., 2000). L'augmentation de l'expression du CD47 dans des neurones en culture favorise la formation de neurites, leur ramification et la formation de filopodes et d'épines (Miyashita et al., 2004; Murata et al., 2006). L'interaction du récepteur CD47 avec la TSP-1 ou le 4N1 (peptide agoniste du récepteur CD47) favorise la prolifération et la migration des cellules du muscle lisse vasculaire (Lymn et al., 2002). En outre, l'activation du récepteur CD47 stimule l'adhérence et la propagation des cellules du mélanome et des cellules épithéliales intestinales (Gao et al., 1996; Barazi et al., 2002; Broom et al., 2009) ainsi que la prolifération des cellules du cancer du sein (Congote and Temmel, 2004). L'ensemble de nos données et celles publiées dans la littérature suggèrent que le rôle du récepteur CD47 dans la croissance cellulaire peut être différent selon la lignée cellulaire ou le type cellulaire considéré.

Nous avons aussi pu identifier le couplage du récepteur CD47 avec les différentes sousunités des protéines G. En effet, les résultats d'immunprécipitation et de Western blot confirment un couplage de CD47 avec la sous-unité  $G\alpha q$  et le dimère  $G\beta \gamma$  dans la lignée U373 et avec le dimère G $\beta\gamma$  dans la lignée U87. A notre grande surprise les voies de signalisation cellulaire qui impliquent le dimère Gβγ ne révèlent ni mobilisation de calcium ni synthèse de l'AMPc. Cependant, l'activation du récepteur CD47 induit une augmentation de la phosphorylation de la protéine Akt dans les astrocytomes (U87 et U373) mais pas dans les astrocytes normaux. La voie PI3-K/Akt semble jouer un rôle clé dans la prolifération de ces cellules tumorales (Figure 31) (publication 2 : Glia 2011, 59 : 308-319). Nous pouvons donc imaginer que l'activation constitutive du récepteur CD47 dans les astrocytomes, induirait une hyperphosphorylation de la protéine Akt. Une fois activée, la protéine Akt phosphoryle à son tour des kinases et des facteurs de transcription en aval. Dans le but de comprendre le déclenchement de l'effet prolifératif induit par CD47 j'ai ciblé la protéine UHRF1 (Ubiquitinlike containing PHD and RING Finger Domain-1), répresseur de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (qui provoque une perte du contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire), qui est notamment surexprimée dans divers cancers (Jenkins et al., 2005). Nous avons montré que UHRF-1 est surexprimée dans les astrocytomes par rapport aux astrocytes normaux. L'activation du récepteur CD47 par l'agoniste 4N1 augmente l'expression de UHRF-

1 dans les lignées U87 et CCF-STGG1 tandis que le blocage du récepteur CD47 par l'anticorps B6H12 induit une diminution d'expression de UHRF-1 et une surexpression de p16<sup>INK4A</sup>, une protéine suppressive de tumeur présente dans les astrocytomes. De manière intéressante aucune modulation d'expression de ces protéines n'est observée lors de l'activation ou du blocage du récepteur CD47 dans les astrocytes normaux. Nous avons également démontré que l'activation de CD47 augmente l'expression du facteur de transcription NF-κb, qui joue un rôle clé dans l'activation de nombreux gènes intervenant dans la croissance cellulaire (cytokines et leur récepteurs), et des ARNm de cytokines (IL-6, IL-7) et MCP-1. L'expression de NF-κb est diminuée par blocage du CD47 par l'anticorps B6H12 **(Figure 31).** 

Ces résultats confirment d'une part le fait que <u>CD47 est constitutivement activé</u> dans les astrocytomes et d'autre part <u>l'implication de UHRF1</u> dans le déclenchement de la prolifération induite par le récepteur CD47. De plus <u>l'implication de NF-κB</u> laisseraient penser que cette prolifération pourrait évoluer sur un fond inflammatoire entretenu/induit par le récepteur CD47 (publication 1 et 3 soumises).

Après avoir caractérisé la voie de signalisation du récepteur CD47 aboutissant au développement des astrocytomes, nous avons évalué la contribution de son partenaire le récepteur SIRPα : *Signal Regulatory Protein* dans l'effet prolifératif des astrocytomes humains induit par les mastocytes. En coculture mastocytes/astrocytomes nous observons une diminution non seulement de l'expression de CD47 mais également de son ligand SIRPα dans les lignées U87 et CCF-STGG1. Nous démontrons également une potentialisation de la prolifération tumorale induite par les mastocytes en présence d'un anticorps bloquant (SE7C2) dirigé contre SIRPα des astrocytomes. L'augmentation de la prolifération induite par les mastocytes ou/et par SE7C2 est accompagnée par une phosphorylation de protéines de la voie des MAPK à savoir Akt et ERK et p70SK (protéine du cycle cellulaire qui favorise le passage de la phase G1 à la phase S). Ces observations corroborent les résultats d'autres équipes qui ont montré que l'activation de SIRPα induit une signalisation intracellulaire inhibitrice par activation des motifs SHP-1 et SHP-2 des phosphatases PTPN6 et PTP11 *(Wang et al. 2008 ; Kapoor et al. 2010; Alblas et al. 2005).* 

Ces résultats semblent indiquer que la prolifération des astrocytomes induite par les mastocytes serait due à l'activation d'une voie de <u>signalisation inhibitrice</u> impliquant d'une part un <u>rétrocontrôle négatif de l'expression membranaire de CD47 et SIRPa</u> et d'autre part

## une activation par <u>hyperphosphorylation</u>, de protéines cytosoliques comme Akt, ERK et p70SK (publication 4 en préparation).

Enfin, nous avons ciblé le récepteur CD40 et son ligand (CD40L), afin de mieux comprendre sa contribution dans le développement des astrocytomes humains en coculture avec les mastocytes. Des études ont montré que l'interaction CD40 et son ligand CD40L favorise l'expression de cytokines pro-inflammatoires, chemiokines, métalloprotéinases, facteurs de croissance et de molécules d'adhérence, principalement par le biais de la stimulation de NFκB (*Chatzigeorgiou et al., 2009*). Ces observations suggèrent une implication potentielle de ces glycoprotéines dans la sécrétion de métalloproteinases et de cytokines que nous observons dans notre modèle de cocultures « mastocyte-astrocytome » (*publication 1, soumise*). Nous avons clairement montré que l'activation du récepteur CD40 par son ligand CD40L favorise la prolifération des lignées d'astrocytomes. Cette prolifération est bloquée de manière dose dépendante par un anticorps (SC-974) dirigé contre le récepteur CD40.

L'activation du récepteur CD40 active le facteur de transcrition NF-kb et augmente l'expression des ARNm de cytokines et particulièrement de l'interleukine-6. L'IL-6 est clairement impliquée dans la prolifération induite par le récepteur CD40. En effet, le traitement des astrocytomes avec des concentrations croissantes d'IL-6 favorise leur prolifération de manière dose-dépendante, alors que le prétraitement avec un antagoniste de l'IL-6 (MAB206) inhibe l'effet prolifératif du ligand CD40L. Ceci suggère que l'effet prolifératif du récepteur CD40 est clairement médié par l'IL-6. Par contre, dans les astrocytes normaux l'activation ou le blocage du récepteur CD40 n'ont aucun effet sur l'expression des ARNm de l'IL-6 et sur la prolifération. Cette différence de comportement entre astrocytes et astrocytomes pourrait être expliquée par le taux d'expression du ligand CD40L. En effet, alors que les résultats de Western blot suggèrent un taux d'expression du récepteur CD40 similaire dans les astrocytomes et les astrocytes normaux, l'expression du ligand CD40L serait moins importante dans les astrocytes normaux en comparaison avec les astrocytomes. La surexpression de CD40L dans les astrocytomes pourrait entretenir une activation permanente de NF-KB et donc une activation par hyperactivation des gènes cibles en particulier ceux des cytokines et des chimiokines. Ces résultats nous permettent de proposer une implication de CD40/CD40L dans la stimulation de la prolifération tumorale induite par les mastocytes (Figure 31). Il reste à confirmer ces résultats en présence de mastocytes (modèle de coculture : mastocytes/astrocytomes ou astrocytes), en utilisant un antagoniste du récepteur CD40 ou en inactivant le gène du récepteur par des siRNA.



Figure 31 : Représentation de différentes interactions moléculaires entre les mastocytes et les astrocytomes et leurs voies de signalisation qui contribuent au développement des astrocytomes.

Mes travaux de thèse montrent que les mastocytes induisent une prolifération des astrocytomes. Cette prolifération serait favorisée par l'activation d'une voie de signalisation impliquant d'une part un rétrocontrôle négatif de l'expression membranaire de CD47 et SIRPα et d'autre part une activation par hyperphosphorylation, de protéines cytosoliques

comme Akt, ERK et p70SK. L'interaction mastocytes-astrocytomes favorise également la libération de cytokines pro- et anti-inflammmatoires qui entretiennent un fond inflammatoire bénéfique dans le phénomène de cancérogenèse. Il s'agit maintenant de valider ces observations sur un modèle de coculture homologue et dans un second temps il faudra confirmer ces résultats par des études in vivo.

Pour conforter le rôle du récepteur CD47, nous envisageons d'utiliser des lignées d'astrocytomes dans lesquelles le gène du récepteur aura été désactivé par des siRNA dans le but d'étudier leur comportement en présence de mastocytes. Une surexpression de ce récepteur par des plasmides pourra également être envisagée dans le but de confirmer le rôle de ce récepteur.

La même approche pourra être menée pour SIRPα et le couple CD40/CD40L. L'implication du récepteur CD40 doit encore être confirmée dans un modèle de coculture astrocytomes/mastocytes en utilisant des antagonistes et/ou des siRNA.

Nos résultats montrent également que les mastocytes favorisent la migration des astrocytomes. Ces résultats seront confirmés en utilisant des modèles d'invasion et de migration cellulaire (modèle de la blessure ou scratch, les chambres de Boyden avec un matrigel). Les travaux futurs se concentreront également sur l'identification des facteurs chémotactiques sécrétés par les mastocytes (cytokines et chimiokines) et les différentes métalloprotéinases qui pourraient favoriser l'invasion et la migration des cellules tumorales.

Après une meilleure compréhension de différentes interactions mastocytes-astrocytomes *in vitro*, l'ensemble de ces résultats sera confirmé par des études *in vivo*. En utilisant des modèles animaux murins, nous pourrons évaluer l'impact de l'axe CD47/SIRP- $\alpha$  /TSP sur la croissance tumorale *in vivo*. Les lignées d'astrocytomes seront inoculées au sein du cerveau de souris qui expriment le récepteur CD47 (souris C57/BL6 CD47<sup>+/+</sup>) et des souris dépourvues de CD47 (souris CD47<sup>-/-</sup>), puis le comportement des cellules cancéreuses sera évalué. La taille de la tumeur, sa vascularisation, son caractère métastatique ainsi que l'avancement de la réponse immunitaire sont autant de paramètres fondamentaux qu'il s'agira de déterminer afin de confirmer la pertinence de l'étude.

Le rôle des mastocytes dans le développement des astrocytomes sera aussi confirmer *in vivo* en utilisant des souris Swiss ou *kit<sup>W/W-v</sup>* déficientes en mastocytes. Des mutations au niveau du locus W (locus codé pour le récepteur c-kit, un récepteur du facteur de croissance et de différenciation des mastocytes : le *SCF*) induise la production d'un c-kit tronqué et non

fonctionnel. Ces souris sont défiscientes en mastocytes. Cependant, ces mutations c-kit entraînent une anémie et une stérilité. En revanche, ces problèmes n'atteignent pas les souris *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* portant la mutation d'inversion W-sash (W-sh) qui seraient donc des modèles plus aisés à manipuler. Ces souris ont une déficience profonde de mastocytes dans tous les tissus mais des taux de cellules hématopoïétiques et lymphoïdes différenciées normaux (Grimbaldeston et al., 2005). Un modèle similaire a été décrit chez le rat par Onoue et al. (1993) et Nakarna et al. (1998). Il s'agit des rats  $W^s/W^s$  (white spotting) qui présentent une délétion dans la région codant pour le domaine kinase du c-kit. Ce modèle nous semble préférable aux modèles de souris pour conserver une cohérence d'espèce par rapport à nos précédentes études in vitro (mastocytes péritonéaux de rat).

En conclusion, La réaction inflammatoire est naturelle et très utile à l'organisme. Elle accompagne la réaction immunitaire, la rend plus spécifique et contribue à l'élimination de l'agent pathogène. Cette réaction est strictement contrôlée par de nombreuses cellules et molécules inflammatoires. Lorsque la réponse est inadaptée ou mal contrôlée les cellules de l'inflammation sont constamment sollicitées et déversent un lot de facteurs de croissance potentiellement cancérigènes et favorables au développement tumoral. Les mécanismes moléculaires et cellulaires reliant l'inflammation et le cancer restent largement méconnus. Dans les tous premiers jours du développement d'un cancer notre système immunitaire reconnaît les cellules cancéreuses non pas comme des cellules anormales à éliminer mais comme des cellules de notre organisme à protéger. En effet, l'apparition des toutes premières cellules cancéreuses déclenche immédiatement une réponse de certaines cellules immunitaires, des «lymphocytes T régulateurs». Ces cellules se dirigent rapidement vers la tumeur, reconnaissent sur les cellules cancéreuses des molécules qui existent par ailleurs dans les tissus normaux. Puis, ces cellules immunitaires bloquent l'action d'autres lymphocytes, dits «effecteurs», les empêchant ainsi d'attaquer et de détruire les cellules cancéreuses. Ces dernières développent de subtils mécanismes d'échappement. En effet, Les cellules tumorales sous-expriment certaines de leurs protéines de surface, impliquées dans la reconnaissance par le système immunitaire. Elles peuvent également réguler négativement la prolifération des lymphocytes T anti-tumoraux, en favorisant la croissance d'une population de lymphocytes T régulateurs. Plusieurs cellules inflammatoires notamment les mastocytes ont des rôles controversés envers les tumeurs, leur rôle bénéfique ou néfaste dépend du type du cancer. Une meilleure compréhension du rôle de ces cellules (produits libérés) et des différentes interactions cellules inflammatoires-cellules cancéreuses (interactions moléculaires : protéines membranaires, récepteurs...) permettrait de cibler et d'améliorer les traitements des tumeurs. En effet, plusieurs études cliniques encore décevantes obtenues chez l'homme confirment la complexité du système tumoral. L'analyse dynamique et fonctionnelle du micro-environnement tumoral, dont notre connaissance aujourd'hui n'est que très hypothétique et fragmentaire, demeure un enjeu majeur pour le développement des traitements de tumeurs. C'est dans ce contexte qu'il faut orienter les efforts en décryptant l'interaction fonctionnelle entre les deux systèmes, le système immunitaire de l'hôte et le système tumoral, en ciblant les cellules inflammatoires qui sont en contact direct avec les cellules tumorales, celles qui résident dans les tissus, comme les mastocytes par exemple. Il convient donc d'identifier les stimuli induisant des réactions néfastes afin de fournir les outils adaptés, tant en matière de prévention que de thérapeutique.

## Bibliographie

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006; **7** (1): 41-53.
- Abraham SN and St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2010; **10** (6): 440-452.
- Adams JC and Lawler J. The thrombospondins. Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36 (6): 961-968.
- Adamson DC, Rasheed BA, McLendon RE, Bigner DD. Central nervous system. *Cancer Biomark.* 2011; 9 (1-6): 193-210.
- Alblas J, Honing H, de Lavalette CR, Brown MH, Dijkstra CD, van den Berg TK. Signal regulatory protein alpha ligation induces macrophage nitric oxide production through JAK/STAT- and phosphatidylinositol 3-kinase/Rac1/NAPDH oxidase/H2O2-dependent pathways. *Mol Cell Biol.* 2005; 25 (16): 7181-7192.
- Algra AM and Rothwell PM. Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparaison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Lancet Oncol.* 2012; doi: 10.1016/S1470-2045(12)70112-2.
- Ali G, Boldrini L, Lucchi M, Mussi A, Corsi V, Fontanin, G. Tryptase mast cells in malignant pleural mesotheliomas as an independent favourable prognostic factor. *J Thorac. Oncol.* 2009; **4**: 348-354.
- Ali H, Leung KB, Pearce FL, Hayes NA, Foreman JC. Comparison of the histaminereleasing action of substance P on mast cells and basophils from different species and tissues. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1986; **79** (4): 413-418.
- Almholt K and Johnsen M. Stromal cell involvement in cancer. Cancer Res. 2003; 162: 31-42.
- Amini RM, Aaltonen K, Nevanlinna H, Carvalho R, Salonen L, Heikkilä P, Blomqvist C. Mast cells and eosinophils in invasive breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2007; **7**: 165-169.
- Andersson AC, Henningsson S, Lundell L, Rosengren E, Sundler F. Diamines and polyamines in DMBA-induced breast carcinoma containing mast cells resistant to compound 48/80. Agents Actions. 1976; 6 (5): 577-583.
- Armant M, Avice MN, Hermann P, Rubio M, Kiniwa M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. J Exp Med. 1999; 190 (8): 1175-1182.
- Avice MN, Rubio M, Sergerie M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J Immunol*. 2000; **165** (8): 4624-4631.
- Bailey C, Negus R, Morris A, Ziprin P, Goldin R, Allavena P, Peck D, Darzi A. Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2007; 24 (2): 121-130.
- Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H. Epidemiology of glioblastoma. *Neurochirurgie*. 2010; 56 (6): 433-40.
- Balkwill F and Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet*. 2001; **357** (9255): 539-545.

Balkwill F. Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer. 2004; 4 (7): 540-550.

- Barazi HO, Li Z, Cashel JA, Krutzsch HC, Annis DS, Mosher DF, Roberts DD. Regulation of integrin function by CD47 ligands. Differential effects on alpha vbeta 3 and alpha 4beta1 integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem.* 2002; **277** (45): 42859-42866.
- Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L, Bauchet F, Fabbro M, Campello C, Capelle L, Durand A, Trétarre B, Frappaz D, Henin D, Menei P, Honnorat J, Segnarbieux F. French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases. J Neurooncol. 2007; 84 (2): 189-199.
- Benyon R, Robinson C, Church MK. Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. Br J Pharmacol. 1989; 97: 898-904.
- Bienenstock J, Tomioka M, Matsuda H, Stead RH, Quinonez G, Simon GT, Coughlin MD, Denburg JA. The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1987; 82 (3-4): 238-243.
- Billottet C and Jouanneau J. Tumor-stroma interactions. Bull Cancer. 2008; 95 (1): 51-56.
- **Bischoff SC.** Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol.* 2007; **7**: 93-104.
- Boesiger J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF, Galli SJ. Mast cells can secrete vascular permeability factor/ vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med*. 1998; **188** (6): 1135-1145.
- **Boyce JA.** Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev.* 2007; **217**: 168-185.
- **Bradl M and Lassmann H.** Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; **119** (1): 37-53.
- **Bredesen DE.** Toward a mechanistic taxonomy for cell death programs. *Stroke*. 2007; **38** (2): 652-660.
- Brooke G, Holbrook JD, Brown MH, Barclay AN. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family. J Immunol. 2004; 173 (4): 2562-25670.
- Broom OJ, Zhang Y, Oldenborg PA, Massoumi R, Sjölander A. CD47 regulates collagen linduced cyclooxygenase-2 expression and intestinal epithelial cell migration. *PLoS One.* 2009; **4** (7): 6371-6380.
- Brown EJ and Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*. 2001; **11** (3): 130-135.
- **Bucala R and Donnelly SC.** Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer. *Immunity.* 2007; **26** (3): 281-295.
- **Carraway R, Cochrane DE, Lansman JB, Leeman SE, Paterson BM, Welch HJ.** Neurotensin stimulates exocytotic histamine secretion from rat mast cells and elevates plasma histamine levels. *J Physiol.* 1982; **323**: 403-314.

- Catani L, Sollazzo D, Ricci F, Polverelli N, Palandri F, Baccarani M, Vianelli N, Lemoli RM. The CD47 pathway is deregulated in human immune thrombocytopenia. *Exp Hematol.* 2011; **39** (4): 486-4894.
- **Cavaliere R, Lopes MB, and Schiff D.** Low-grade gliomas: an update on pathology and therapy. *Lancet neurology*. 2005; **4** (11): 760-770.
- **Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E**. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors*. 2009; **35** (6): 474-483.
- **Chen TT, Brown EJ, Huang EJ, Seaman WE.** Expression and activation of signal regulatory protein alpha on astrocytomas. *Cancer Res.* 2004; **64** (1): 117-127.
- Chin AC, Fournier B, Peatman EJ, Reaves TA, Lee WY, Parkos CA. CD47 and TLR-2 cross-talk regulates neutrophil transmigration. *J Immunol.* 2009; **183** (9): 5957-5963.
- Chinot O, Soulier P, Frenay M. Chemotherapy and targeted treatments in glioblastomas. *Neurochirurgie*. 2010; 56 (6): 491-508.
- Chow CW, Klug GL, Lewis EA. Subependymal giant-cell astrocytoma in children. An unusual discrepancy between histological and clinical features. J Neurosurg. 1988; 68 (6): 880-883.
- Chung J, Wang XQ, Lindberg FP, Frazier WA. Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in alpha2beta1-mediated platelet activation. *Blood*. 1999; 94 (2): 642-648.
- **Cinel L, O'Hara B, Prestipino A.** Superficial myofibroblastoma of the lower female genital tract in the uterine cervix showing focal pseudosarcomatous morphology. *Pathology*. 2009; **41** (7): 691-703.
- **Congote LF and Temmel N.** The C-terminal 26 residue peptide of serpin A1 stimulates proliferation of breast and liver cancer cells: role of protein kinase C and CD47. *FEBS Lett.* 2004; **576** (3): 343-347.
- Coussens LM and Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002; 420 (6917): 860-867.
- Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.* 1999; **13** (11): 1382-1397.
- Dabiri S, Huntsman D, Makretsov N, Cheang M, Gilks B, Bajdik C, Gelmon K, Chia S, Hayes
  M. The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. *Mod Pathol.* 2004; 17 (6): 690-695.
- D'Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P. Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. Am J Pathol. 2001; 158 (6): 2031-2041.
- Dawicki W, Marshall JS. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol*. 2007; **19** (1): 31-38.
- De Carli E, Wang X, Puget S. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009; **360** (21): 2248-2249.

- **De Simone R, Alleva E, Tirassa P, Aloe L.** Nerve growth factor released into the bloodstream following intraspecific fighting induces mast cell degranulation in adult male mice. *Brain Behav Immun.* 1990; **4** (1): 74-81.
- Delmas Y, Viallard JF, Villeneuve J, Grosset C, Pasquet JM, Déchanet-Merville J, Nurden P, Pellegrin JL, Rosenbaum J, Combe C, Nurden AT, Ripoche J. Platelet-associated CD154: a new interface in haemostasis and in the inflammatory reaction. *Med Sci.* 2005; **21** (10): 825-831.
- **Demchenko AP, Mély Y, Duportail G, Klymchenko AS**. Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. *Biophys J*. 2009; **96** (9): 3461-3470.
- Demitsu T, Inoue T, Kakurai M, Kiyosawa T, Yoneda K, Manabe M. Activation of mast cells within a tumor of angiosarcoma: ultrastructural study of five cases. J Dermatol. 2000; 29: 280-289.
- Diaconu NC, Kaminska R, Naukkarinen A, Harvima RJ, Harvima IT. The increase in tryptaseand chymase-positive mast cells is associated with partial inactivation of chymase and increase in protease inhibitors in basal cell carcinoma. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2007; 21 (7): 908-915.
- Dietrich J, Cella M, Seiffert M, Bühring HJ, Colonna M. Cutting edge: signal regulatory protein beta 1 is a DAP12 associated-activating receptor expressed in myeloid cells. *J Immunol.* 2000; **164** (1): 9-12.
- Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. J Clin Oncol. 2008; 26 (27): 4410-4117.
- **Dorahy DJ, Thorne RF, Fecondo JV, Burns GF.** Stimulation of platelet activation and aggregation by a carboxyl-terminal peptide from thrombospondin binding to the integrin-associated protein receptor. *J Biol Chem.* 1997; **272** (2): 1323-1330.
- **Dutertre G, Hoang-Xuan K, Ricard D.** Tumeurs intracrâniennes de l'adulte. *EMC, Traité de Médecine Akos*. 2010 ; 5-1001.
- Esposito P, Chandler N, Kandere K, Basu S, Jacobson S, Connolly R, Tutor D, Theoharides TC. Corticotropin-releasing hormone and brain mast cells regulate blood-brain-barrier permeability induced by acute stress. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; **303** (3): 1061-1066.
- Fannon M, Forsten-Williams K, Dowd CJ, Freedman DA, Folkman J, Nugent MA. Binding inhibition of angiogenic factors by heparan sulfate proteoglycans in aqueous humor: potential mechanism for maintenance of an avascular environment. FASEB J. 2003; 17 (8): 902-904.
- Ferguson M, Dalve-Endres AM, McRee RC, Langlais PJ. Increased mast cell degranulation within thalamus in early pre-lesion stages of an experimental model of Wernicke's encephalopathy. J Neuropathol Exp Neurol. 1999; 58 (7): 773-783.
- Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C, Bouvier C. Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol*. 2008 ; 164 (6-7): 505-515.

- **Figarella-Branger D, Maues de Paula A, Colin C, and Bouvier C.** Histomolecular classification of adult diffuse gliomas: the diagnostic value of immunohistochemical markers. *Revue neurologique*. 2011; **167** (10): 683-690.
- Fix JD. Neuro-anatomie. 2007; Editions Lippincott Williams & Wilkins.
- Flinsenberg TW, Compeer EB, Boelens JJ, Boes M. Antigen cross-presentation: extending recent laboratory findings to therapeutic intervention. *Clin Exp Immunol*. 2011; 165 (1): 8-18.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009; **16** (3): 183-194.
- Fridman WH, Mlecnik B, Bindea G, Pagès F, Galon J. Immunosurveillance in human nonviral cancers. *Curr Opin Immunol*. 2011; 23 (2): 272-278.
- Furnari Frank B, Fenton Tim, M Bachoo Robert, Mukasa Akitake, Stommel Jayne M, Stegh Alexander, Hahn William C, Ligon Keith L, Louis David N, Brennan Cameron, Chin Lynda, DePinho Ronald A, and Cavenee Webster K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007; **21** (21): 2683-2710.
- **Gabrilovich DI and Nagaraj S.** Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009; **9** (3): 162-1674.
- Galli J, Grimbaldeston M, Tsa M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2008; **8**: 478-486.
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptative immune responses. *Nat. Immunol.* 2005; 6: 135-142.
- **Gao AG and Frazier WA.** Identification of a receptor candidate for the carboxyl-terminal cell binding domain of thrombospondins. *J Biol Chem.* 1994; **269** (47): 29650-29657.
- Gao AG, Lindberg FP, Finn MB, Blystone SD, Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem*. 1996; 271 (1): 21-24.
- **García-Rodríguez LA and Huerta-Alvarez C.** Reduced risk of colorectal cancer among longterm users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. Epidemiology. 2001; **12** (1): 88-93.
- Gilbert MR and Lang FF. Management of patients with low-grade gliomas. *Neural Clin*. 2007; 25 (4): 1073-88.
- Gilfillan AM and Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6 (3): 218-230.
- **Gomes AQ, Martins DS, Silva-Santos B.** Targeting γδ T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res.* 2010; **70** (24): 10024-10027.
- **González-Pérez A, García Rodríguez LA, López-Ridaura R.** Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs on cancer sites other than the colon and rectum: ameta-analysis. *BMC Cancer*. 2003; **3**: 28.

- Gooch JL, Lee AV, Yee D. Interleukin 4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1998; **58** (18): 4199-4205.
- Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, Stanley ER, Segall JE, Condeelis JS. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* 2005; 65 (12): 5278-5283.
- Gounaris E, Erdman SE, Restaino C, Gurish MF, Friend DS, Gounari F, Lee DM, Zhang G, Glickman JN, Shin K, Rao VP, Poutahidis T, Weissleder R, McNagny KM, Khazaie K. Mast cells are en essential hematoôietic component for polyp development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; **104** (50): 19977-19982.
- **Gozuacik D and Kimchi A.** Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004; **23** (16): 2891-2906.
- Grimbaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ. Mast cell-deficient Wsash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. Am J Pathol. 2005; 167 (3): 835-848.
- Grimbaldeston MA, Metz M, Yu M, Tsai M, Galli SJ. Effector and potential immunoregulatory roles of mast cells in IgE-associated acquired immune responses. *Curr Opin Immunol.* 2006; **18** (6): 751-760.
- Grützkau A, Krüger-Krasagakes S, Baumeister H, Schwarz C, Kögel H, Welker P, Lippert U, Henz BM, Möller A. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell*. 1998; **9** (4): 875-884.
- Gururangan S, Chi SN, Young Poussaint T, Onar-Thomas A, Gilbertson RJ, Vajapeyam S, Friedman HS, Packer RJ, Rood BN, Boyett JM, Kun LE. Lack of efficacy of bevacizumad plus irinotecan in children with recurrent malignant glioma and diffuse brainstem glioma: a pediatric brain tumor consortium study. J Clin Oncol. 2010; 28 (18): 3069-3075.
- Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; **144** (5): 646-674.
- Harari O and Liao JK. Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des.* 2004; **10** (8): 893-908.
- Hart PH, Grimbaldeston MA, Finlay-Jones JJ. Mast cells in UV-B-induced immunesuppression. J Photochem Photobiol B. 2000; 55 (2-3): 81-87.
- Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. Acta Neuropathol. 2010; 120 (6): 707-718.
- Hayashi A, Ohnishi H, Okazawa H, Nakazawa S, Ikeda H, Motegi S, Aoki N, Kimura S, Mikuni M, Matozaki T. Positive regulation of phagocytosis by SIRPbeta and its signaling mechanism in macrophages. J Biol Chem. 2004; 279 (28): 29450-29460.

- Hermann P, Armant M, Brown E, Rubio M, Ishihara H, Ulrich D, Caspary RG, Lindberg FP, Armitage R, Maliszewski C, Delespesse G, Sarfati M. The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23. J Cell Biol. 1999; 144 (4): 767-775.
- Hinrichs U, Rutteman GR, Nederbragt H. Stromal accumulation of chondroitin sulphate in mammary tumours of dogs. *Br J Cancer*. 1999; **80** (9): 1359-1365.
- Holopainen T, Bry M, Alitalo K, Saaristo A. Perspectives on lymphangiogenesis and angiogenesis in cancer. *J Surg Oncol.* 2011; **103** (6): 484-488.
- Huang B, Lei Z, Zhang GM, Li D, Song C, Li B, Liu Y, Yuan Y, Unkeless J, Xiong H, Feng ZH. SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. *Blood*. 2008; **112** (4): 1269-1279.
- Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. J Exp Med. 1998; 188 (12): 2357-2368.
- Irani AM and Schwartz LB. Neutral proteases as indicators of human mast cell heterogeneity. *Monogr Allergy*. 1990; 27: 146-162.
- Jenkins Y, Markovtsov V, Lang W, Sharma P, Pearsall D, Warner J, Franci C, Huang B, Huang J, Yam GC, Vistan JP, Pali E, Vialard J, Janicot M, Lorens JB, Payan DG, Hitoshi Y. Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth. *Mol Biol Cell*. 2005; **16** (12): 5621-5629.
- Joyce JA and Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009; **9** (4): 239-252.
- Jutel M, Klunker S, Akdis M, Małolepszy J, Thomet OA, Zak-Nejmark T, Blaser K, Akdis CA. Histamine upregulates Th1 and downregulates Th2 responses due to different patterns of surface histamine 1 and 2 receptor expression. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001; **124** (1-3): 190-202.
- Kandere-Grzybowska K, Letourneau R, Kempuraj D, Donelan J, Poplawski S, Boucher W, Athanassiou A, Theoharides TC. IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from mast cells. *J Immunol*. 2003; **171** (9): 4830-4836.
- **Kapoor GS and O'Rourke DM.** SIRPalpha1 receptors interfere with the EGFRvIII signalosome to inhibit glioblastoma cell transformation and migration. *Oncogene*. 2010; **29** (29): 4130-4144.
- Kawataki T, Naganuma H, Sasaki A, Yoshikawa H, Tasaka K, Nukui H. Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta expression with malignancy of glioma. *Neuropathology*. 2000; **20** (3): 161-169.
- Keith IM, Jin J, Neal D Jr, Teunissen BD, Moon TD. Cell relationship in a wistar rat model of spontaneous prostatitis. *J Urol*. 2001; **166** (1): 323-328.
- Khazaie K, Blatner NR, Khan MW, Gounari F, Gounaris E, Dennis K, Bonertz A, Tsai FN, Strouch MJ, Cheon E, Phillips JD, Beckhove P, Bentrem DJ. The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; **30** (1): 45-60.

- Kiessling R, Kono K, Petersson M, Wasserman K. Immunosuppression in human tumorhost interaction: role of cytokines and alterations in signal-transducing molecules. *Springer Semin Immunopathol.* 1996; 18 (2): 227-242.
- Kirsch DG and Loeffler JS. Brain metastases in patients with breast cancer: new horizons. *Clin Breast Cancer*. 2005; 6 (2): 115-124.
- Kitamura T, Kometani K, Hashida H, Matsunaga A, Miyoshi H, Hosogi H, Aoki M, Oshima M, Hattori M, Takabayashi A, Minato N, Taketo MM. SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion. *Nat Genet*. 2007; **39**: 467-475.
- **Kokenyesi R.** Ovarian carcinoma cells synthesize both chondroitin sulfate and heparan sulfate cell surface proteoglycans that mediate cell adhesion to interstitial matrix. *J Cell Biochem.* 2001; **83** (2): 259-270.
- Koki AT, Khan NK, Woerner BM, Seibert K, Harmon JL, Dannenberg AJ, Soslow RA, Masferrer JL. Characterization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial cancers: evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2002; 66 (1): 13-18.
- **Kusmartsev S and Gabrilovich DI.** STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophagemediated T cell deletion. *J Immunol*. 2005; **174** (8): 4880-4991.
- Landry Y, Niederhoffer N, Sick E, Gies JP. Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem*. 2006; **13** (1): 51-63.
- Levi-Schaffer F and Shalit M. Differential release of histamine and prostaglandin D2 in rat peritoneal mast cells activated with peptides. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989; 90: 352-357.
- Li B, Wang H, Chen Z. The association between signal regulatory protein alpha and hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1999; **79** (4): 268-270.
- Li H.M, Hsu SS, Wang JS, Weng MJ, Fu JH Chen CK, and Lai PH. Cerebral pilocytic astrocytoma with spontaneous intracranial hemorrhage in adults. *J Chin Med Assoc*. 2008; **71** (11): 587-593.
- Lindberg FP, Gresham HD, Reinhold MI, Brown EJ. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. J Cell Biol. 1996; 134 (5): 1313-1322.
- Liu JD, Wang YJ, Chen CH, Yu CF, Chen LC, Lin JK, Liang YC, Lin SY, Ho YS. Molecular mechanisms of G0/G1 cell-cycle arrest and apoptosis induced by terfenadine in human cancer cells. *Mol Carcinog*. 2003; **37** (1): 39-50.
- Liu Y, Soto I, Tong Q, Chin A, Bühring HJ, Wu T, Zen K, Parkos CA. SIRPbeta1 is expressed as a disulfide-linked homodimer in leukocytes and positively regulates neutrophil transepithelial migration. J Biol Chem. 2005; 280 (43): 36132-36140.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; **114** (2): 97-109.

- Lymn JS, Patel MK, Clunn GF, Rao SJ, Gallagher KL, Hughes AD. Thrombospondin-1 differentially induces chemotaxis and DNA synthesis of human venous smooth muscle cells at the receptor-binding level. *J Cell Sci*. 2002; **115** (22): 4353-4360.
- Lynch JW, Lemos VS, Bucher B, Stoclet JC, Takeda K. A pertussis toxininsensitive calcium influx mediated by neuropeptide Y2 receptors in a human neuroblastoma cell line. J. Biol. Chem. 1994; 269 (11): 8226-8233.
- Malaviya R and Abraham SN. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. Immunol Rev. 2001; 179: 16-24.
- Maltby S, Khazaie K, McNagny KM. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta*. 2009; **1796**: 19-26.
- Manna PP and Frazier WA. The mechanism of CD47-dependent killing of T cells: heterotrimeric Gi-dependent inhibition of protein kinase A. J Immunol. 2003; **170** (7): 3544-3553.
- Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. Tumor-associated macrophages and the related myloid-derived suppressor cells as a paradigm of the density of macrophage activation. *Hum Immunol.* 2009; **70** (5): 325-330.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454 (7203): 436-444.
- Marshall J. S. Mast-cell response to pathogens. Nat Rev Immunol. 2004; 4: 787-799.
- Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 1999; 5 (11): 1277-1284.
- Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.* 1999; **5** (11): 1277-1284.
- Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol*. 2009; **19** (2): 72-80.
- Meier CR, Schmitz S, Jick H. Association between acetaminophen or nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of developing ovarian, breast, or colon cancer. *Pharmacotherapy*. 2002; **22** (3): 303-309.
- Mekori YA and Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000; **173**: 131-140.
- Melief CJ. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*. 2008; 29 (3): 372-383.
- Metz M, Piliponsky AM, Chen CC, Lammel V, Abrink M, Pejler G, Tsai M, Galli SJ. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*. 2006; **313** (5786): 526-530.
- Miescher S, Whiteside TL, Moretta L, von Fliedner V. Clonal and frequency analyses of tumor-infiltrating T lymphocytes from human solid tumors. J Immunol. 1987; 138 (11): 4004-4011.

- Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, Lush RM, Antonia S, Gabrilovich DI.All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.* 2006; 66 (18): 9299-9307.
- Miyashita M, Ohnishi H, Okazawa H, Tomonaga H, Hayashi A, Fujimoto TT, Furuya N, Matozaki T. Promotion of neurite and filopodium formation by CD47: roles of integrins, Rac, and Cdc42. *Mol Biol Cell*. 2004; **15** (8): 3950-3963.
- Munroe RJ, Bergstrom RA, Zheng QY, Libby B, Smith R, John SW, Schimenti KJ, Browning VL, Schimenti JC. Mouse mutants from chemically mutagenized embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2000; **24** (3): 318-321.
- Murata T, Ohnishi H, Okazawa H, Murata Y, Kusakari S, Hayashi Y, Miyashita M, Itoh H, Oldenborg PA, Furuya N, Matozaki T. CD47 promotes neuronal development through Src- and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and Cdc42. J Neurosci. 2006; 26 (48): 12397-12407.
- **Nadkarni S, Jung P, Levine H.** Astrocytes optimize the synaptic transmission of information. *PLoS Computational Biology*. 2008; **4** (5): e1000088.
- Ndubaku U, de Bellard ME. Glial cells: old cells with new twists. Acta Histochem. 2008; 110 (3): 182–195.
- Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci.* 2003; **28** (6): 284-2893.
- Nielsen HJ, Christensen IJ, Moesgaard F, Kehlet H. Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. Ranitidine as adjuvant treatment in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2002; **89** (11): 1416-14122.
- Nienartowicz A, Sobaniec-Łotowska ME, Jarocka-Cyrta E, Lemancewicz D. Mast cells in neoangiogenesis. *Pol J Pathol*. 2006; **57** (1) :55-67.
- Omar Al and Mason WP. Anaplastic astrocytomas. Handb Clin Neurol. 2012; 105: 451-466.
- **Onoue H, Maeyama K, Nomura S, Kasugai T, Tei H, Kim HM, Watanabe T, Kitamura Y.** Absence of immature mast cells in the skin of Ws/Ws rats with a small deletion at tyrosine kinase domain of the c-kit gene. *Am J Pathol*. 1993; **142** (4): 1001-1007.
- **Ostrand-Rosenberg S, and Sinha P.** Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*. 2009; **182** (8): 4499-4506.
- **Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y.** The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008; **28** (4): 454-467.
- **Ozdemir O.** The role of mast cell and mast cell subtypes (MC (T) and MC (CT)) in tumor angiogenesis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006; **29** (4): 638-649.
- Parpura V, Michael, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, Randy FR, Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A. Glial cells in (patho)physiology. J. Neurochem. 2012; doi: 10.1111/j.1471-4159.
- Piccio L, Vermi W, Boles KS, Fuchs A, Strader CA, Facchetti F, Cella M, Colonna M. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood*. 2005; **105** (6): 2421-2427.

- Piliponsky AM, Chen CC, Nishimura T, Metz M, Rios EJ, Dobner PR, Wada E, Wada K, Zacharias S, Mohanasundaram UM, Faix JD, Abrink M, Pejler G, Pearl RG, Tsai M, Galli SJ. Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat Med*. 2008; 14 (4): 392-398.
- Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, André P, Dieu-Nosjean MC, Alifano M, Régnard JF, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Cremer I. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 2011; **71** (16): 5412-5422.
- Poglio S, De Toni-Costes F, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L, Cousin B. Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells*. 2010; **28** (11): 2065-2072.
- **Poitras E and Houde A.** La PCR en temps réel: principes et applications. *Biology and Biotechnology*. 2002; 2: 2-11.
- Poole TJ and Zetter BR. Stimulation of rat peritoneal mast cell migration by tumor-derived peptides. *Cancer Res.* 1983; **43**: 5857-5861.
- Powell HC, Garrett RS, Brett FM, Chiang CS, Chen E, Masliah E, Campbell IL. Response of glia, mast cells and the blood brain barrier, in transgenic mice expressing interleukin-3 in astrocytes, an experimental model for CNS demyelination. *Brain Pathol.* 1999; 9 (2): 219-235.
- **Powell JA Jr and Mousa SA.** Neutrophil-activating protein-2- and interleukin-8-mediated angiogenesis. *J Cell Biochem*. 2007; **102** (2): 412-420.
- **Pundir P and Kulka M.** The role of G protein-coupled receptors in mast cell activation by antimicrobial peptides: is there a connection?. *Immunol Cell Biol*. 2010; **88** (6): 632-640.
- Puxeddu I, Piliponsky AM, Bachelet I, Levi-Schaffer F. Mast cells in allergy and beyond. Int J Biochem Cell Biol. 2003; 35 (12): 1601-1607.
- Rajput AB, Turbin DA, Cheang MC, Voduc DK, Leung S, Gelmon KA, Gilks CB, Huntsman DG. Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4,444 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; **107**: 249-257.
- Rath GM, Schneider C, Dedieu S, Rothhut B, Soula-Rothhut M, Ghoneim C, Sid B, Morjani H, El Btaouri H, Martiny L. The C-terminal CD47/IAP-binding domain of throbospondin-1 prevents camptothecin-anddoxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006b; **1763** (10): 1125-1134.
- Rath GM, Schneider C, Dedieu S, Sartelet H, Morjani H, Martiny L, El Btaouri H. Thrombospondin-1 C-terminal-derived peptide protects thyroid cells from ceramideinducedapoptosis through the adenylyl cyclase pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006a; 38 (12): 2219-2228.
- **Reichert TE, Day R, Wagner EM, Whiteside TL**. Absent or low expression of the Zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. *Cancer Res.* 1998; **58** (23): 5344-5347.

- Reinhold MI, Lindberg FP, Plas D, Reynolds S, Peters MG, Brown EJ. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). J Cell Sci. 1995; 108 (11): 3419-3425.
- Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, Mortarini R, Arancia G, Anichini A, Fais S, Parmiani G. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocytes-tumor cell interaction. *Immunol Rev.* 2002; **188**: 97-113.
- Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet*. 2012; doi:10.1016/S0140-6736(12)60209-8.
- Rothwell PM, Price JF, Fowkes FG, Zanchetti A, Roncaglioni MC, Tognoni G, Lee R, Belch JF, Wilson M, Mehta Z, Meade TW. Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials. *Lancet*. 2012. doi:10.1016/S0140-6736(11)61720-0.
- **Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LM**. lymphocytes in cancer development: polarization towords pro-tumor immunity Cytokine Growth Factor Rev. 2010; **21** (1): 3-10.
- Ruhul Amin AR, Machida K, Oshima K, Myat Lin O, Thant AA, Senga T, Matsuda S, Akhand AA, Maeda A, Kurosaki T, Hamaguchi M. A role for SHPS-1/SIRPalpha1 in IL-1beta- and TNFalpha-dependent signaling. *Oncogene*. 2002; **21** (57): 8871-8878.
- Samoszuk M, Kanakubo E, Chan JK. Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumors and evidence that mast cell heparin interferes with the growth of tumor cells through a mechanism involving fibroblasts. *BMC Cancer*. 2005; **5**: 121-130.
- Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol*. 2009 ; **27** (25): 4150-4154.
- Sautès-Fridman C, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Fisson S, Fridman WH, Cremer I, Dieu-Nosjean MC. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; 30 (1): 13-25.
- Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2008; **26**: 705-739.
- Schneider LA, Schlenner SM, Feyerabend TB, Wunderlin M, Rodewald HR. Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. J Exp Med. 2007; 204 (11): 2629-2639.
- Schreiber RD, Old L J, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; **331** (6024): 1565-1570.
- Seiffert M, Brossart P, Cant C, Cella M, Colonna M, Brugger W, Kanz L, Ullrich A, Bühring HJ. Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. *Blood*. 2001; **97** (9): 2741-2749.

- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old L J, Schreiber RD. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001; **410** (6832): 1107-1111.
- Sharma M, Ralte A, Arora R, Santosh V, Shankar SK, Sarkar C. Subependymal giant cell astrocytoma: a clinicopathological study of 23 cases with special emphasis on proliferative markers and expression of p53 and retinoblastoma gene proteins. *Pathology*. 2004; **36** (2): 139-144.
- Sharma M, Ralte A, Arora R, Santosh V, Shankar SK, Sarkar C. Subependymal giant cell astrocytoma: a clinicopathological stuady of 23 cases with special emphasis on proliferative markers and expression of P53 and retinoblastoma gene proteins. *Pathology*. 2004; 36 (2): 139-144.
- Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. Ann Rev Immunol. 2000; 18: 423-449.
- Shynkar VV, Klymchenko AS, Kunzelmann C, Duportail G, Muller CD, Demchenko AP, Freyssinet JM, Mely Y. Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. J Am Chem Soc. 2007; 129 (7): 2187-2193.
- Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett*. 2008; 267 (2): 204-215.
- Sinnamon MJ, Carter KJ, Sims LP, Lafleur B, Fingleton B, Matrisian LM. A protective role of mast cells in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2008; **29** (4): 880-886.
- Sinnamon MJ, Carter KJ, Sims LP, Lafleur B, Fingleton B, Matrisian LM. A protective role of mast cells in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 208; **29**: 880-886.
- **Sofroniew MV and Vinters HV.** Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; **119** (1): 7-35.
- Souazé F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A, Forgez P. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res.* 2006; **66** (12): 6243-6249.
- Soucek L, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med.* 2007; 13 (10): 1211-1218.
- Steinman RM and Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007; 449 (7161): 419-426.
- Stover DG, Bierie B, Moses HL. A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. J Cell Biochem. 2007; 101 (4): 851-861
- **Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson TJ, Whiteside TL.** A unique subset of CD4<sup>+</sup> CD25 high-FOXP3<sup>+</sup> T cells secreting IL-10 and TGF-β1 mediates suppression in the tumor environment. *Clin Cancer Res.* 2007a; **13** (15): 4345-4354.
- Strauss L, Whiteside TL, Knights A, Bergmann C, Knuth A, Zippelius A. Selective survival of naturally occurring human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells cultured with rapamycin. J. Immunol. 2007b; **178** (1): 320-329.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ,

Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross J.G, Mirimanoff R.O. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomized phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009; **10** (5): 459–466.

- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352 (10): 987–996.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000; **100** (6): 655-669.
- **Takanami I, Takeuchi K, Naruke M.** Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*. 2000; **88** (12): 2686-2692.
- Tal M and Liberman R. Local injection of nerve growth factor (NGF) triggers degranulation of mast cells in rat paw. *Neurosci Lett*. 1997; **221** (2-3): 129-132.
- Tamir H, Theoharides TC, Gershon MD, Askenase PW. Serotonin storage poops in basophil leukemia and mast cells: Characterization of two types of serotonin binding protein and radioautographic analysis of the intracellular distribution of [3H] serotonin. J Cell Biol. 1982; 93 (3): 638-647.
- Tanaka A, Arai K, Kitamura Y, Matsuda H. Matrix metalloproteinase-9 production, a newly identified function of mast cell progenitors, is down-regulated by c-kit receptor activation. *Blood*. 1999; 94: 2390-2395.
- Theoharides TC. Mast cells and pancreatic cancer. N Engl J Med. 2008; 358 (17): 1860-1871.
- Theoharides TC and Conti P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol*. 2004; **25** (5): 235-241.
- Theoharides TC, Bondy PK, Tsakalos ND, Askenase PW. Differential release of serotonin and histamine from mast cells. *Nature*. 1982; **297** (5863): 229-231.
- Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitros D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev.* 2007; **217**: 65-78.
- Theoharides TC, Rozniecki JJ, Sahagian G, Jocobson S, Kempuraj D, Conti P, Kalogeromitros D. Impact of stress and mast cells on brain metastases. *J Neuroimmunol*. 2008; **205**: 1-7.
- Timms JF, Swanson KD, Marie-Cardine A, Raab M, Rudd CE, Schraven B, Neel BG. SHPS-1 is a scaffold for assembling distinct adhesion-regulated multi-protein complexes in macrophages. *Curr Biol.* 1999; **9** (16): 927-930.
- **Toru H, Eguchi M, Matsumoto R, Yanagida M, Yata J, Nakahata T.** Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation. *Blood.* 1998; **91** (1): 187-195.
- Uzzo RG, Clark PE, Rayman P, Bloom T, Rybicki L, Novick AC, Bukowski RM, Finke JH. Alterations in NFkappaB activation in T lymphocytes of patients with renal cell carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1999; **91** (8): 718-721.

- Valent P and Bettelheim P. Cell surface structures on human basophils and mast cells: biochemical and functional characterization. *Adv Immunol*. 1992; **52**: 333-423
- Van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for research and treatment of cancer phase III trial. J Clin Oncol. 2006; 24 (18): 2715-2722.
- Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin Vaffinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry. 1998; 31 (1): 1-9.
- Van Kooten C and Banchereau J. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol. 2000; 67 (1): 2-17.
- Van Nassauw L, Adriaensen D, Timmermans JP. The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci*. 2007; 133 (1): 91-103.
- Vernon-Wilson EF, Kee WJ, Willis AC, Barclay AN, Simmons DL, Brown MH. CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1. *Eur J Immunol*. 2000; **30** (8): 2130-2137.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annu Rev Immunol. 2011; 29: 235-271.
- Von Haaster CM, Engels W, Lemmens PJ, Hornstra G, van der Vusse GJ, Heemskerk JWM. Differential release of histamine and prostaglandin D2 in rat peritoneal mast cells: roles of cytosolic calcium and protein tyrosine *kinases. Biochim Biophys Acta*. 1995; 1265: 79-88.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Marcello J, Reardon DA, Quin JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Begner DD, Freidman AH, Freidman HS. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. J Clin Oncol. 2007; 25 (30): 4722-4729.
- Vyas H and Krishnaswamy G. Paul Ehrlich's "Mastzellen"-from aniline dyes to DNA chip arrays: a historical review of developments in mast cell research. *Methods Mol Biol*. 2006; 315: 3-11.
- Wang C, Liu DQ, Li LM, Guo YL, Bai R, , Bian Z, Zhang CY, Zen K. Signal regulatory protein alpha negatively regulates beta2 integrin-mediated monocyte adhesion, transendothelial migration and phagocytosis. *PLoS One*. 2008; **3** (9): 3291-3299.
- Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol*. 1997; **61** (3): 233-245.
- Weller CL, Collington SJ, Williams T, Lamb JR. Mast cells in health and disease. Clin Sci. 2011; 120 (11): 473-484.

- Yabkowitz R, Mansfield PJ, Ryan US, Suchard SJ. Thrombospondin mediates migration and potentiates platelet-derived growth factor-dependent migration of calf pulmonary artery smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 1993; **157** (1): 24-32.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 Mutations in Glioma. N Eng J Med. 2009; 360 (8): 765-773.
- Yoon SK. The biology of cancer stem cells and its clinical implication in hepatocellular carcinoma. *Gut Liver*. 2012; 6 (1): 29-40.
- Yoshida M, Yoshida H, Kitaichi K, Hiramatsu K, Kimura T, Ito Y, Kume H, Yamaki K, Suzuki R, Shibata E, Hasegawa T, Takagi K. Adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide induce histamine release from rat peritoneal mast cell. *Regul Pept.* 2001; 101 (1-3): 163-168.
- Zhang W, Stoica G, Tasca SI, Kelly KA, Meininger CJ. Modulation of tumor angiogenesis by stem cell factor. *Cancer Res.* 2000; 60: 6757-6762.
- Zheng W and Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2

cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell. 1997; 89 (4): 587-596.

## Rôle des mastocytes dans le développement des astrocytomes humains : Implication du récepteur CD47

## Résumé

Plusieurs études suggèrent que les cellules inflammatoires joueraient un rôle initiateur du cancer et contribueraient activement à son développement. Mes travaux se focalisent sur l'étude des gliomes humains et les mastocytes (cellules résidentes clefs de l'inflammation et de l'immunité). Les gliomes sont les tumeurs les plus fréquentes du système nerveux central. Les mastocytes constituent des cellules d'intérêt dans l'étude du micro-environnement inflammatoire des tumeurs. En effet, divers travaux font état d'une infiltration précoce de mastocytes séreux dans le stroma entourant les masses tumorales de nombreux cancers. Cependant, à ce jour, des résultats contradictoires ne permettent pas de statuer sur le rôle néfaste ou bénéfique des mastocytes. Grâce à une technique de coculture mastocytes/astrocytomes et/ou mastocytes/astrocytes nous avons montré que les mastocytes induisent la prolifération, des astrocytomes humains et n'ont pas d'effet sur les astrocytes normaux humains. Cet effet prolifératif induit par les mastocytes nécessite un contact direct entre les deux types cellulaires (ce qui suggère des interactions cellule-cellule et l'implication de molécules d'adhérence) et est dépendant de la sécrétion d'interleukine-6 (cytokine pro-inflammatoire et mitogène). Aussi avons-nous ciblé le couple récepteur CD47/protéine SIRPa et le couple récepteur CD40/protéine CD40L qui sont notamment impliqués dans le contrôle de la balance prolifération/apoptose ou/et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation. L'activation du récepteur CD47 dans les astrocytomes humains favorise leur prolifération. La voie de signalisation intracellulaire implique le dimère βγ des protéines G, une activation consécutive de la voie PI3K/Akt, une surexpression de la protéine UHRF-1 (Ubiquitin-like containing PHD and RING Finger domains-1) accompagnée d'une diminution de l'expression du gène suppresseur de tumeurs **p16**<sup>INKAA</sup>. Il semblerait également que l'activation du récepteur CD47 induise une translocation de NF-κB et l'expression de gènes de cytokines en particulier l'IL-6 qui contribuerait à la prolifération des astrocytomes. Cette voie de signalisation originale n'est pas activée dans les astrocytes normaux humains. En coculture mastocytes/astrocytomes l'augmentation de la prolifération des lignées U87 et CCF-STGG1 est accompagnée d'une diminution non seulement de l'expression de CD47 mais également de son ligand SIRPa. Ces effets sont accompagnés par une phosphorylation de protéines de la voie des MAPK à savoir Akt et ERK. Nous avons également montré que l'activation du récepteur CD40 par son ligand CD40L favorise la prolifération des astrocytomes en augmentant l'expression des ARNm de l'interleukine-6 et en favorisant la phosphorylation **Ι-κb**.

En conclusion, mes travaux de thèse montrent que les mastocytes induisent une prolifération des astrocytomes. Cette prolifération serait favorisée par l'activation d'une voie de signalisation impliquant d'une part un rétrocontrôle négatif de l'expression membranaire de CD47 et SIRPα et d'autre part une activation par hyperphosphorylation, de protéines cytosoliques comme Akt, ERK et p70SK. L'interaction mastocytes-astrocytomes favorise également la libération de cytokines pro- et anti-inflammmatoires ce qui entretient un fond inflammatoire qui serait néfaste dans le phénomène de cancérogenèse.

Mots Cléfs : Inflammation, Mastocytes, Astrocytomes, Cancer, CD47, CD40, Protéines-G, UHRF-1, NF-кB.