

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR  
TONY MAURAI**

**INTERACTIONS PARACRINES MACROPHAGES/CELLULES  
TUMORALES : L'ACTIVATION DU SYSTÈME CD40/CD154 MODULE  
L'EXPRESSION DE FACTEURS PRO-TUMORAUX ET L'INVASION  
TUMORALE**

**FÉVRIER 2008**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce projet. Je suis spécialement reconnaissant envers mon directeur de recherche, monsieur Carlos-Reyes Moreno Ph.D, qui m'a permis d'entreprendre mes études de maîtrise et qui, grâce à l'instauration d'un nouveau laboratoire de recherche à l'UQTR, a mis en place un milieu de travail enrichissant et stimulant. En ce sens, je tiens à souligner la collaboration de monsieur Éric Asselin Ph.D, qui nous a ouvert les portes de son laboratoire et mis à notre disposition le matériel technique nécessaire à l'avancement de nos recherches. Je remercie également madame Céline Van-Themsche, qui fut une référence incontournable dans le cadre de plusieurs expériences entreprises.

Je remercie également Martin Lapierre qui pendant ces deux années, fut un collègue de travail dont le soutien technique et moral fut grandement apprécié ainsi que Mathieu Dufresne, qui a participé à l'obtention de certains résultats présentés dans ce travail.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ces deux années de maîtrise.

## RÉSUMÉ

Dans la plupart des cancers, dont celui de la vessie, on retrouve la présence de macrophages (MØ) infiltrant la tumeur et favorisant la croissance néoplasique (TAM de *tumour-associated macrophages*). Il est proposé que les TAM soient des MØ polarisés de type II (M2) qui, contrairement aux M1, ont une faible activité anti-microbienne et anti-tumorale. Des études récentes ont identifié le récepteur CD40 comme un puissant activateur des MØ et un élément clé du développement de certaines maladies chroniques inflammatoires. Certaines recherches ont par ailleurs démontré que l'inflammation chronique joue un rôle important dans la progression du cancer. Par contre, l'interrelation entre l'activation de CD40, le caractère pathogénique des TAM et la progression tumorale n'a pas encore été établie. Nous proposons que les MØ M1, autant que les MØ M2, produisent des facteurs pro-tumoraux et sont mutuellement impliqués dans la croissance tumorale. Nous suggérons également que CD40 influence les interactions paracrines entre les MØ et les cellules cancéreuses. Le premier objectif de notre étude consistait à tester l'effet des MØ sur la prolifération des cellules T24, une lignée du cancer de la vessie, et l'expression de facteurs pro-tumoraux par celle-ci. Le second objectif était d'évaluer l'impact de l'activation via CD40 des MØ sur l'invasion tumorale et l'expression de facteurs pro-tumoraux par les cellules T24. Ces objectifs ont été réalisés à l'aide des techniques d'immunobuvardage de type Western, de transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR), d'analyses par cytométrie en flux et des tests de prolifération MTT et d'invasion. Nos résultats démontrent que les M2, contrairement aux M1, augmentent la prolifération des T24. Cependant, les deux phénotypes de MØ induisent l'expression de facteurs pro-tumoraux par les T24, tels que IL-8 et TNF $\alpha$ . De plus, l'activation des M1 via CD40 favorise davantage l'invasion tumorale alors que les M2 activés via CD40 augmentent l'expression de facteurs pro-tumoraux des cellules néoplasiques. Ensemble, ces résultats suggèrent que dans notre modèle *in vitro* d'interactions paracrines entre les MØ et les cellules tumorales, les MØ activés via CD40 peuvent influencer la prolifération, l'invasion locale et l'expression génique de certains facteurs pro-tumoraux.

**Mots clés :** macrophages, M1, M2, TAM, cancer, vessie, inflammation, CD40, cellules tumorales, invasion.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS ET SIGLES .....</b>	<b>viii</b>
<b>CHAPITRE 1        INFLAMMATION ET CANCER .....</b>	<b>1</b>
1.1 Le système immunitaire .....	1
1.2 L'inflammation .....	4
1.3 Les cellules médiatrices de l'inflammation.....	6
1.4 Inflammation chronique et cancer .....	8
1.5 Rôle des facteurs pro-inflammatoires dans la progression tumorale.....	11
<b>CHAPITRE 2        MACROPHAGES, LYMPHOCYTES T ET</b>	
<b>                          PROGRESSION TUMORALE .....</b>	<b>17</b>
2.1 Activation des macrophages.....	17
2.2 Polarisation des macrophages .....	21
2.3 Les macrophages associés à la tumeur ou macrophages M2 .....	23
2.4 Les chémokines et le recrutement des TAM .....	24
2.5 Le système Th1/Th2 .....	27
2.6 Lymphocytes Th1, Th2 et le cancer .....	30
2.7 Les lymphocytes Treg (Tr3).....	32
2.8 Effets immunosuppresseurs des Treg.....	33
2.9 Lymphocytes Treg et cancer .....	34
<b>CHAPITRE 3        LE CANCER DE LA VESSIE ET LES TAM.....</b>	<b>36</b>
3.1 Le cancer de la vessie .....	36
3.2 Rôle des TAM dans le cancer de la vessie .....	40

<b>CHAPITRE 4</b>	<b>CD40 .....</b>	<b>41</b>
4.1	Introduction au système CD40/CD154 .....	41
4.2	CD40 : régulation paracrine et autocrine.....	41
4.3	Signalisation via CD40.....	42
4.4	CD154 .....	44
4.5	Rôle du système CD40/CD154 dans la réponse inflammatoire .....	46
4.6	CD40 et les macrophages M1 et M2 .....	48
4.7	Activité anti-tumorale des macrophages suite à l'activation de CD40.....	49
4.8	Traitements anti-tumoraux : activation de CD40 chez les macrophages ..	51
<b>CHAPITRE 5</b>	<b>PROJET DE RECHERCHE.....</b>	<b>53</b>
5.1	Problématique et hypothèses .....	53
5.2	Objectifs et méthodologie .....	54
5.3	Monocytes isolés du sang périphérique et THP1 .....	55
5.4	Lignée cellulaire T24.....	56
<b>CHAPITRE 6</b>	<b>CORPS DU TRAVAIL .....</b>	<b>58</b>
6.1	Résumé de l'article .....	58
6.2	Contribution des auteurs.....	59
6.3	Article scientifique .....	59
<b>CHAPITRE 7</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>101</b>
7.1	Mise en contexte de la discussion .....	101
7.2	Isolation des monocytes .....	102
7.3	Différenciation et caractérisation des macrophages .....	103
7.4	Effet des M0, M1 et M2 sur la prolifération des T24.....	106
7.5	Facteurs exprimés par les M0, M1 et M2 pouvant être impliqués dans la régulation de la prolifération des T24 .....	107
7.6	Effet des M0, M1 et M2 sur l'expression de facteurs pro-tumoraux des T24 .....	108
7.7	Effet de l'activation de CD40 des M0, M1 et M2 sur les T24.....	113
7.8	Conclusion.....	115
7.9	Perspectives .....	117
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>120</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

1.1 : Rôles de IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ dans la réponse inflammatoire .....	5
1.2 : Cellules et cytokines inflammatoires présentes dans l'environnement tumoral.....	10
3.1 : Classement des tumeurs vésicales.....	38
7.1 : Résumé descriptif de l'étude .....	116

**LISTE DES FIGURES**

1.1 : Effets antagonistes des facteurs de transcription p53 et NF- $\kappa$ B .....	13
2.1 : Expression de plusieurs médiateurs inflammatoires induite par le LPS chez les macrophages .....	19
2.2 : Les macrophages M1 et M2 .....	22
2.3 : Interactions cellules tumorales-TAM.....	25
2.4 : Les lymphocytes Th1 et Th2.....	30
2.5 : Le lymphocyte Treg .....	34
4.1 : Rôle du système CD40/CD154 dans les interactions lymphocytes Th/APC .....	47
5.1 : Différenciation des monocytes en macrophages par adhésion en plaque .....	56



## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
Akt	Protéine kinase B
APC	Cellule présentatrice de l'antigène
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
CD	Cellule dendritique
CMHII	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
COX	Cyclooxygénase
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CTLA	Protéine associée au lymphocyte T cytotoxique
ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire
FoxP3	<i>Forkhead/winged-helix protein 3</i>
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
HMGB-1	<i>High-mobility group box-1 protein</i>
ICAM	Molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines
IFN	Interféron
IκB	Inhibiteur de kappa B
IL	Interleukine
IRF1	Facteur-1 régulateur de l'interféron
JAK	Kinase Janus
JNK	Kinase c-Jun N-terminale
LAG	Gène-3 d'activation du lymphocyte
LDL	Lipoprotéines à faible densité
LFA	Facteur associé aux fonctions des lymphocytes
LPS	Lipopolysaccharide
M0, M1, M2	Macrophages contrôlés, de phénotype 1, de phénotype 2
MAPK	Protéine kinase activée par le mitogène
MCP-1	<i>Monocyte/macrophage chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	Facteur stimulant les colonies de macrophages
MC	Milieu conditionné
MIF	Facteur d'inhibition de la migration des macrophages

MIP	Protéine-1 inflammatoire des macrophages
MMP	Métalloprotéase
MØ	Macrophage
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
NK	Cellules tueuses naturelles
NO	Oxyde nitrique
NSAID	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PGE	Prostaglandine
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-kinases
RAG2	Gène 2 activant la recombinaison
ROI	Intermédiaires réactifs de l'oxygène
RT-PCR	Transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase
SBC	Cancer superficiel de la vessie
SRA	Récepteur "séquestreur" de classe A
STAT	Transducteurs du signal et activateurs de la transcription
TADC	Cellules dendritiques associées à la tumeur
TAM	Macrophages associés à la tumeur
TARC	<i>Thymus- and activation-regulated chemokine</i>
TCC	Carcinome à cellules transitionnelles
TCR	Récepteur des cellules T
TGF	Facteur de croissance tumorale
Th1, Th2	Lymphocyte T auxiliaire de phénotype 1, de phénotype 2
TLR	Récepteur Toll-like
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNFR	Récepteur des facteurs de nécrose tumorale
TRAF	Facteurs associés au TNFR
Treg	Lymphocyte T régulateur
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

# INTRODUCTION

## CHAPITRE 1

### INFLAMMATION ET CANCER

#### 1.1 Le système immunitaire

À tous les jours, et ce dès notre naissance, nous sommes exposés à une panoplie de micro-organismes potentiellement dangereux pour notre organisme. Ces micro-organismes, ou des substances étrangères telles des toxines, infligeraient des dommages considérables si notre corps n'était pourvu d'un système de défense efficace. Celui-ci représente un réseau complexe de mesures défensives appelé système immunitaire. L'immunité est subdivisée en deux composantes, chacune permettant à notre organisme de contrer les effets néfastes des corps étrangers: l'immunité naturelle et l'immunité acquise.

L'immunité naturelle (ou innée) représente un ensemble de mécanismes de résistance aux maladies qui ne sont pas spécifiques d'un pathogène particulier. Elle comprend quatre types de barrières défensives: anatomiques, physiologiques, phagocytaires et inflammatoires. Les barrières anatomiques préviennent l'entrée des pathogènes dans l'organisme et constituent ainsi la première ligne de défense. La peau et la surface des muqueuses sont les principaux facteurs compris dans cette catégorie. La température, le pH et différents facteurs solubles figurent parmi les barrières physiologiques. Par exemple, la majorité des micro-organismes ingérés par les voies orales ne supportent pas l'acidité gastrique. Les barrières phagocytaires consistent en l'ingestion du matériel extracellulaire particulaire par phagocytose. La phagocytose est un type d'endocytose, terme désignant la capture par une cellule de matériaux présents dans son environnement immédiat. Enfin, une réponse inflammatoire est induite lorsqu'un dommage tissulaire provoqué par une blessure ou par un micro-organisme pathogène envahisseur se produit. Nous verrons l'inflammation plus en détail dans la prochaine section.

L'immunité acquise, ou spécifique, permet la reconnaissance et l'élimination sélective des micro-organismes étrangers ou de molécules (ou antigènes: toutes substances étrangères à l'organisme). Contrairement à l'immunité naturelle, les réponses immunitaires acquises présentent quatre propriétés: 1) spécificité antigénique; 2) diversité; 3) mémoire immunitaire; 4) reconnaissance du Soi et du non Soi. La spécificité antigénique du système immunitaire permet de distinguer les légères différences parmi les antigènes. Les anticorps, protéines (immunoglobulines) se liant à une partie spécifique (épitope) d'un antigène et facilitant l'élimination de celui-ci, peuvent faire la distinction entre deux molécules de protéines différentes de par seulement un acide aminé. Le système immunitaire comprend une énorme diversité d'anticorps permettant de reconnaître des milliards d'antigènes. Lorsque notre immunité a reconnu un antigène et répondu à ce dernier, elle présente une mémoire immunitaire. Cette mémoire permet, lors d'une seconde rencontre avec le même antigène, une réponse beaucoup plus rapide que la première. Grâce à cette propriété, le système immunitaire confère une immunité pouvant durer toute la vie contre de nombreux agents infectieux. Enfin, le système immunitaire permet la distinction entre les molécules du Soi et celles du non Soi de sorte qu'il reconnait uniquement les antigènes étrangers. Malgré les différences entre immunité naturelle et immunité acquise, il est important de mentionner que les deux types d'immunités collaborent étroitement afin de répondre aux défis antigéniques. Notamment, les cellules phagocytaires, essentielles à la réponse immunitaire naturelle, sont intimement impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire spécifique.

Les principales cellules immunitaires sont regroupées essentiellement en deux groupes: les lymphocytes et les cellules présentatrices de l'antigène. Chaque lymphocyte produit et expose à sa surface des récepteurs se liant à un antigène spécifique. Ainsi, ces cellules sont les principaux effecteurs de l'immunité acquise. Les deux populations de lymphocytes sont les lymphocytes B (ou cellules B) et les lymphocytes T (ou cellules T). Les récepteurs des cellules B sont des molécules d'anticorps membranaires. Lorsqu'une cellule B naïve (vierge), qui n'a jamais rencontré un antigène, entre en contact pour la première fois avec l'antigène correspondant à son anticorps membranaire,

la liaison des deux molécules provoque la division rapide de la cellule. Il en résulte une multitude de clones répartis en deux groupes: les cellules B à mémoire et les cellules B effectrices (ou plasmocytes). Les cellules à mémoire, exprimant à leur surface les anticorps spécifiques de l'antigène rencontré par la cellule B naïve, immuniseront l'organisme contre toutes attaques futures par le même antigène. Les plasmocytes n'expriment pas d'anticorps membranaire mais produisent l'anticorps sous une forme qui peut être sécrétée.

Les récepteurs des lymphocytes T, contrairement à ceux des lymphocytes B, ne sont pas des anticorps mais plutôt des molécules distinctes appelées récepteurs des cellules T (TCR de *T cell receptor*). Contrairement aux anticorps, les TCR ne reconnaissent l'antigène que lorsque ce dernier est lié à des protéines de la membrane cellulaire appelées molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe deux types de CMH: les molécules de classe I du CMH (CMHI), exprimées par la majorité des cellules nucléées; et les molécules de classe II (CMHII), exprimées uniquement par les cellules présentatrices de l'antigène. Lorsqu'une cellule T naïve rencontre l'antigène combiné à une molécule du CMH à la surface d'une cellule, le lymphocyte T prolifère et se différencie alors en cellules T à mémoire et en cellules T effectrices. Il existe deux sous-populations de lymphocytes T: les cellules T auxiliaires (Th, de *helper*) et les cellules T cytotoxiques (Tc, de *cytotoxic*). Les cellules Th ne reconnaissent que les complexes antigène-CMHII. Lorsque le lymphocyte Th rencontre un tel complexe, il devient alors actif et sécrète divers facteurs solubles nommés cytokines. Celles-ci permettent notamment l'activation des cellules B, des cellules Tc, des macrophages et de plusieurs autres types de cellules participant à la réponse immunitaire. Les cellules Tc ne reconnaissent quant à elles que les complexes antigène-CMHI. Suite à cette rencontre, elles prolifèrent et se différencient en cellules effectrices appelées lymphocytes T cytotoxiques (CTL, de *cytotoxic T lymphocytes*). Contrairement aux cellules Th, les CTL ne sécrètent pas de nombreuses cytokines mais présentent plutôt une importante activité cytotoxique. Les CTL ont un rôle important dans le contrôle des cellules de l'organisme et l'élimination de toutes celles exposant un antigène, par exemple les cellules infectées par un virus.

Les cellules présentatrices de l'antigène incluent principalement les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (CD). Ces cellules se démarquent des autres du fait qu'elles expriment à leur surface le CMHII et qu'elles délivrent un signal de costimulation nécessaire à l'activation des cellules Th. La cellule présentatrice de l'antigène internalise tout d'abord l'antigène par phagocytose avant d'exposer une partie de celui-ci via le CMHII à la surface de sa membrane. Le complexe antigène-CMHII est ensuite reconnu par le lymphocyte Th, celui-ci entrant alors en interaction avec le complexe. Un signal de costimulation est ensuite produit par la cellule présentatrice de l'antigène, ce qui active la cellule Th.

Les réponses immunitaires peuvent être divisées en deux parties: l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire. L'immunité humorale implique une réponse immunitaire induite par les cellules B suite à une interaction avec un antigène. Tel que décrit précédemment, la cellule B prolifère alors et se différencie en cellules à mémoire et en plasmocytes sécrétant d'anticorps. Les anticorps agissent comme effecteurs de la réponse humorale en se liant à l'antigène. Ils permettent ainsi la neutralisation de l'antigène et facilitent son élimination. L'antigène recouvert d'anticorps peut être éliminé de différentes façons. Entre autres, l'anticorps peut se lier à plusieurs molécules d'antigènes et former ainsi des agrégats plus facilement éliminables par les cellules phagocytaires. Les cellules effectrices T sont responsables de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les cytokines produites par les lymphocytes Th peuvent activer plusieurs cellules phagocytaires, ce qui permet à celles-ci de phagocyter plus efficacement. Les CTL participent à la réponse immunitaire à médiation cellulaire en éliminant les cellules du Soi altérées, telles que les cellules tumorales ou infectées par un virus (1).

## **1.2 L'inflammation**

Tel que mentionné précédemment, l'inflammation fait partie d'une des deux branches immunitaires, soit l'immunité innée (ou naturelle) consistant en un ensemble de mécanismes de résistance aux maladies qui ne sont pas spécifiques d'un pathogène

particulier (2). La réponse inflammatoire agit en trois temps : 1) la reconnaissance du pathogène; 2) la destruction de ce pathogène; 3) la réparation tissulaire des tissus lésés suite à l'action des différents facteurs inflammatoires (3). Les cellules effectrices inflammatoires sont les leucocytes, incluant une panoplie de types cellulaires. Cependant, les principaux leucocytes présents aux sites inflammatoires sont les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les lymphocytes (1). Une fois activées, ces cellules produisent plusieurs cytokines inflammatoires, dont les plus importantes, l'interleukine (IL)-1, le facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$  et IL-6, sont surtout produites par les macrophages (3). Le tableau 1.1 présente les effets de ces cytokines.

**TABLEAU 1.1**  
**Rôles d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  dans la réponse inflammatoire**

<b>Effet</b>	<b>IL-1</b>	<b>IL-6</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
Fièvre par des pyrogènes endogènes	+	+	+
Synthèse des protéines de la phase aiguë par le foie	+	+	+
Augmentation de la perméabilité vasculaire	+	+	+
Augmentation des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire	+	+	-
Prolifération des fibroblastes	+	+	-
Production de plaquettes	+	-	+
Induction de chémokines (ex.: IL-8)	+	+	-
Induction d'IL-6	+	+	-
Activation des cellules T	+	+	+
Activation des cellules B	+	+	+
Augmentation de la synthèse des immunoglobulines	-	-	+

Tiré de: (1)

Plusieurs molécules pathogéniques peuvent provoquer une réponse

inflammatoire. La plus caractérisée de ces molécules est incontestablement le lipopolysaccharide (LPS). Les principaux effets biologiques du LPS furent rapportés il y a plus de cent ans par Pfeiffer (4) alors que la structure exacte de cette endotoxine fut déterminée dans les années 1980 (5). Le LPS induit la production systémique de plusieurs cytokines inflammatoires, incluant IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ . Il a été démontré que la reconnaissance du LPS, notamment par les macrophages, est essentielle à une réponse inflammatoire efficace contre certaines infections gram-négatif (6, 7).

### **1.3 Les cellules médiatrices de l'inflammation**

Les neutrophiles sont habituellement les premières cellules à migrer vers le site inflammatoire. Ces leucocytes sont adaptés à tuer les agents pathogènes microbiens puisqu'ils comportent un large éventail d'armes leur servant à les éliminer. Environ 5000 neutrophiles sont présents par  $\text{mm}^3$  dans des conditions normales et leur nombre croît d'un facteur de 5-10 lors d'infection (2). On retrouve également un autre type de leucocytes au site d'inflammation: les macrophages. Ceux-ci dérivent des monocytes et font partie du groupe de cellules présentatrices d'antigènes (APC). Les macrophages sont par conséquent très efficaces à présenter les antigènes aux lymphocytes Th. Ce type de leucocytes est présent dans pratiquement tous les tissus. Lorsqu'un agent infectieux réussit à s'introduire dans l'organisme, les macrophages résidents pré-activés peuvent alors agir aussitôt. Le nombre de macrophages augmente au site inflammatoire via la sécrétion de chémokines par les cellules de l'environnement inflammatoire. Les chémokines sont des cytokines qui servent à attirer les macrophages et plusieurs autres leucocytes (8). Une fois qu'ils ont atteint le site inflammatoire, les macrophages entrent en contact avec le pathogène et peuvent le phagocyter, c'est à dire l'englober et le dégrader pour ensuite présenter certains antigènes à leur surface membranaire. Cette présentation de l'antigène se fait via le CMHII. La combinaison antigène-CMHII est reconnue par les récepteurs des lymphocytes T CD4+ (TCR) (9). Un autre type de leucocytes inflammatoires, les cellules dendritiques (CD), présentent également l'antigène via le CMHII et dérivent aussi des monocytes. Les CD expriment des taux élevés de CMHII et des membres de la famille des protéines de costimulation B7. Pour



cette raison, ce sont des cellules présentatrices de l'antigène plus puissantes que les macrophages, d'autant plus que ces derniers nécessitent d'être activés avant de fonctionner comme cellules présentatrices de l'antigène. Bien que les CD représentent une petite proportion des cellules mononucléaires phagocytaires, elles jouent cependant un rôle déterminant dans l'inflammation (2).

Enfin, les lymphocytes Th représentent la charnière entre les systèmes immunitaires inné et adapté. Nous avons déjà discuté des lymphocytes Th dans la section 1.1. Brièvement, suite à la reconnaissance de l'antigène présenté par le macrophage, la CD ou le lymphocyte B, le lymphocyte T CD4+ (Th) sécrète une série de cytokines destinées à activer davantage les macrophages et les cellules B productrices d'anticorps. De plus, grâce à un signal de costimulation produit par les APC, cette reconnaissance permet au lymphocyte Th de proliférer et de se différencier en deux types particuliers de lymphocytes Th: les cellules effectrices, sécrétrices de nombreuses cytokines, et les cellules mémoires, responsables de la réponse immunitaire secondaire lors d'une rencontre ultérieure avec l'antigène (2). Ainsi, lors d'une réponse inflammatoire, les cellules effectrices des deux branches du système immunitaire collaborent étroitement à l'élimination du pathogène.

En général, une réponse inflammatoire a un début rapide et agit sur une courte période. C'est pourquoi on appelle celle-ci inflammation aiguë. La réponse de la phase aiguë est caractérisée par une modification rapide du taux de diverses protéines plasmatiques et de la densité en cellules inflammatoires. Normalement, le processus de l'inflammation aiguë se termine sans séquelle pour l'organisme. Comme l'inflammation n'échappe pas à l'homéostasie, la production de protéines inflammatoires induit l'expression de facteurs anti-inflammatoires permettant de limiter les dégâts tissulaires pouvant être engendrés par les différents facteurs inflammatoires. Cependant, lors de certaines maladies, une activité immunitaire persistante peut conduire à une inflammation chronique qui a souvent des conséquences pathologiques (10). Ces conséquences seront abordées à la prochaine section dans le cadre d'une situation néoplasique.

## 1.4 Inflammation chronique et cancer

Il y a plus de 30 ans, les pathologistes n'accordaient que peu d'attention au fait que plusieurs facteurs inflammatoires étaient retrouvés dans les tissus de la majorité des tumeurs invasives. Pourtant, Virchow avait observé en 1858 que les cancers survenaient souvent au niveau de sites d'irritation chronique. Il considérait alors la tumeur comme "une plaie qui ne guérit jamais". Virchow avait ainsi suggéré que l'inflammation chronique pourrait conduire à la prolifération cellulaire et participer à la progression tumorale (10, 11). De leur côté, Fehleisen et Bruns ont découvert à la fin du 19<sup>e</sup> siècle que l'activation de l'inflammation aiguë pouvait mener à la régression tumorale. Ces chercheurs ont infecté artificiellement des tumeurs par la bactérie causant l'érysipèle, une infection de la peau due le plus souvent au streptocoque, et ont remarqué une régression tumorale importante dans certains cas de cancers incurables (12, 13). En dépit de ces observations, l'idée d'utiliser l'activation de l'inflammation aiguë afin de combattre le cancer a été oubliée, excepté dans le cas du cancer de la vessie. Suite à une résection chirurgicale, l'injection de la Bacille de Calmette-Guérin (BCG) cause une inflammation (infection) locale recrutant certaines cellules immunitaires, principalement des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes T. L'inflammation aiguë ainsi engendrée permet alors la destruction des cellules cancéreuses résiduelles (14, 15). D'ordre général, il arrive cependant que l'inflammation aiguë dégénère en une inflammation chronique suite à la persistance du pathogène. En ce sens, certaines études épidémiologiques ont démontré que plusieurs maladies chroniques causées par un stimulus inflammatoire persistant sont associées à une augmentation de la progression tumorale (16, 17). Le tableau 1.2 classe les principales cytokines et cellules inflammatoires retrouvées dans l'environnement néoplasique.

Le microenvironnement inflammatoire des tumeurs est caractérisé par la présence de plusieurs leucocytes. Ceux-ci sont présents autant dans le tissu stromal que tumoral (18). Dans le cas d'inflammation chronique, une infiltration continue de ces leucocytes dans la tumeur peut entraîner un effet immunosuppresseur en plus de favoriser la croissance et la migration des cellules tumorales (16). Les macrophages

sont les principaux leucocytes infiltrant les tumeurs. Ces macrophages associés à la tumeur (TAM de *tumour-associated macrophages*) dérivent des monocytes circulant dans le système périphérique et comme la plupart des leucocytes, ils sont attirés vers la tumeur via l'action des chémokines. En fonction des signaux activateurs délivrés par l'environnement néoplasique, les TAM peuvent tuer la tumeur ou favoriser sa progression en sécrétant certains facteurs de croissance et cytokines angiogéniques en plus de protéases dégradant la matrice extracellulaire. Nous verrons plus en détail l'implication des TAM dans la progression tumorale dans les prochaines sections. Les CD font également partie des leucocytes infiltrant la tumeur (voir le tableau 1.2) (19, 20). Les cellules dendritiques associées à la tumeur (TADC) ont habituellement un phénotype immature les rendant inefficaces à présenter l'antigène aux lymphocytes Th. Dans le cancer du sein, les TADC immatures sont réparties également dans la masse tumorale alors que les CD matures sont plutôt situés en périphérie (21). Cette distribution des TADC est différente de celle des TAM, lesquels sont dispersés de façon homogène dans le tissu tumoral. L'immaturité des TADC peut découler du manque de signaux de maturation au coeur de la tumeur, de la migration de cellules matures vers les ganglions lymphatiques où elles sont plus aptes à présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T, ou à la présence d'inhibiteurs de maturation dans la masse tumorale.

Les lymphocytes Th sont également présents dans l'environnement néoplasique. Ces derniers sécrètent principalement IL-4 et IL-5, mais sécrètent très peu d'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) (16). La production d'IL-4 et d'IL-5 est associée aux lymphocytes pro-tumoraux Th2 alors que IFN- $\gamma$  est davantage produit par les lymphocytes anti-tumoraux Th1. Nous verrons ces deux types de polarisations lymphocytaires en détail au chapitre 2. En bref, les lymphocytes Th1 induisent l'attaque immunitaire contre les pathogènes intracellulaires et les cellules cancéreuses alors que les lymphocytes Th2 sont généralement inefficaces contre ces derniers (22).

TABLEAU 1.2

## Cellules et cytokines inflammatoires présentes dans l'environnement tumoral

	Abréviation	Groupe	Nouvelle nomenclature
<b>Leucocytes spécialisés</b>			
Cellules tueuses naturelles	NK	-	-
Cellules dendritiques associées à la tumeur	TADC	-	-
Macrophages associés à la tumeur	TAM	-	-
<b>Cytokines</b>			
Interféron- $\gamma$	IFN- $\gamma$	Pro-inflammatoire/Th1	-
Interleukines 1, 6	IL-1, -6	Pro-inflammatoires	-
Interleukines 4, 5, 10	IL-4, -5, -10	Régulation immunitaire/Th2	-
Facteur stimulant les colonies de macrophages	M-CSF	Facteur de croissance	-
Facteur inhibant la migration	MIF	Pro-inflammatoire	-
Facteur de croissance transformant $\beta$	TGF- $\beta$	Facteur de croissance	-
Facteur de nécrose tumorale	TNF	Pro-inflammatoire	-
Facteur de croissance endothéliale vasculaire	VEGF	Angiogénique/ Perméabilité vasculaire	-
<b>Chémokines</b>			
Interleukine-8	IL-8	CXC	CXCL8
Chémokine dérivée des macrophages	MDC	CC	CCL22
Protéine chimiotactique 1 des monocytes	MCP-1	CC	CCL2
<i>Thymus- and activation-regulated chemokine</i>	TARC	CC	CCL17

Tiré de: (16)

En plus des cellules inflammatoires, le stroma tumoral comporte une charpente de vaisseaux sanguins souvent incomplète, du tissu conjonctif et une matrice extracellulaire composée notamment de fibrine, une protéine filamenteuse qui normalement est issue du fibrinogène sous l'action de la thrombine lors de la coagulation sanguine (16). En 1986, Dvorak a démontré comment l'inflammation chronique et les sites néoplasiques partagent certaines propriétés (23). Entre autres, les cellules cancéreuses produisent le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), une cytokine favorisant l'extravasation persistante de la fibrine et de la fibronectine et la génération constante de matrice extracellulaire (16). Les plaquettes, qui sont en surnombre dans les tumeurs par rapport à n'importe quel site inflammatoire, sont une source continue de VEGF et du facteur de croissance tumorale bêta (TGF- $\beta$ ). Les plaquettes sécrètent également certains facteurs angiogéniques favorables à la tumeur (24). En plus des macrophages, des CD, des lymphocytes T et des plaquettes, les cellules tumorales elles-mêmes produisent plusieurs cytokines pro-inflammatoires (25). Cependant, alors que la réponse inflammatoire est régulée, les tumeurs représentent un univers plutôt anarchique en sécrétant continuellement plusieurs facteurs leur étant bénéfiques (16).

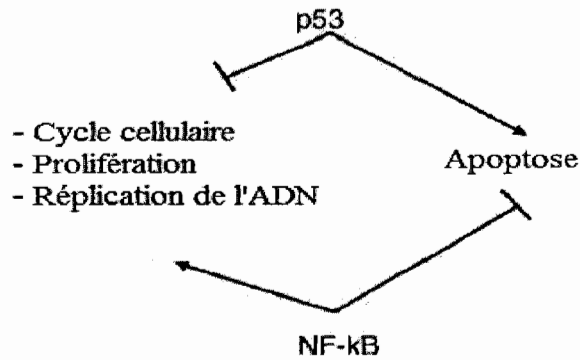
### **1.5 Rôle des facteurs pro-inflammatoires dans la progression tumorale**

La majorité des tumeurs présente un environnement riche en cytokines inflammatoires, en facteurs de croissance et en chémokines. Cependant, les tumeurs manquent de facteurs impliqués dans la réponse immunitaire spécifique (25). Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs évidences ont démontré que les cytokines produites par les leucocytes associés à la tumeur et les cellules tumorales elles-mêmes contribuent directement à la progression néoplasique (voir le tableau 1.2). Tout comme dans les sites inflammatoires, les trois principales cytokines retrouvées dans l'environnement tumoral sont TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6 (10). Nous définirons l'implication de chacun de ces facteurs, en plus de certains autres, dans la progression tumorale. Par contre, nous verrons au fil de ce travail que d'autres cytokines ont aussi un rôle dans la croissance et la migration maligne.

Des doses élevées de TNF- $\alpha$ , administrées localement, peuvent causer une régression importante des tumeurs, d'où son appellation de facteur de nécrose tumorale (26). Cependant, deux études indépendantes sont venues apporter un important bémol aux fonctions bénéfiques de TNF- $\alpha$  (27, 28). Ces recherches ont démontré qu'un signal induit par TNF- $\alpha$  est nécessaire à l'induction du cancer de la peau. Suganuma et son équipe (27) ont démontré que des souris déficientes en TNF- $\alpha$  sont protégées contre la carcinogénèse induite par le 7,12-diméthylbenzène anthracène (DMBA). De leur côté, Moore et ses collègues (28) ont démontré que des souris auxquelles le gène de la protéine chimiotactique 1 des monocytes (MCP-1) avait été délété étaient résistantes à l'induction du cancer de la peau. Il est important de noter que MCP-1 est induit par TNF- $\alpha$  (28). TNF- $\alpha$  est aussi un inducteur majeur du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B), un facteur de transcription régulant plusieurs oncogènes et médiateurs inflammatoires. En règle générale, l'activation de NF- $\kappa$ B induit la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose (29). Les conséquences de l'activation de NF- $\kappa$ B sont complètement à l'opposé de celles induites par p53 (10). p53, en plus d'inhiber la progression du cycle cellulaire et la réplication de l'ADN, induit l'apoptose (voir la figure 1.1).

Par ces actions, p53 favorise la réparation de l'ADN ou induit l'apoptose lorsque les dommages à l'ADN sont trop importants. Par contre, l'inactivation de p53 est observée dans la quasi-totalité des tumeurs. Il a été démontré que certaines cytokines pro-inflammatoires peuvent participer à cette inactivation, la plus importante étant la protéine-1 inflammatoire des macrophages (MIP-1) (10, 16).

Les effets opposés induits par TNF- $\alpha$  découlent de l'état du récepteur de TNF- $\alpha$  (TNFR). La liaison de TNFR à son ligand induit normalement l'activation de NF- $\kappa$ B et la survie cellulaire via l'induction de gènes pro-oncogéniques. Par contre, il arrive que TNFR présente certaines modifications structurales. L'activation de ce récepteur modifié induit quant à lui le recrutement des caspases 8 et 10, ce qui cause l'apoptose via l'action de gènes anti-oncogéniques (30). Toutefois, la raison expliquant la modification structurale du récepteur reste à être élucidée.



**FIGURE 1.1: Effets antagonistes des facteurs de transcription p53 et NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B induit et p53 inhibe la progression du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire et la réplication de l'ADN. L'apoptose est induite par p53 alors qu'elle est inhibée par NF- $\kappa$ B. Par conséquent, tous les facteurs qui, d'une manière chronique, induisent l'activation de NF- $\kappa$ B ou inhibent p53 peuvent favoriser le développement du cancer.**

Tiré de: (10)

Dans un modèle de souris manipulées pour développer des métastases, un traitement avec un antagoniste du récepteur d'IL-1 a permis de diminuer le développement du cancer. Ce résultat suggère que la sécrétion d'IL-1 dans l'environnement néoplasique aide au développement de métastases et à la progression tumorale (31). Cette même étude a également démontré que des souris déficientes en IL-1 sont résistantes au développement expérimental de métastases (32). Dans le cadre d'une étude sur l'implication d'IL-6 dans la progression tumorale, des chercheurs ont procédé à l'injection intrapéritonéale d'huile minérale dans des souris afin d'induire une inflammation chronique suivie d'un myélome. Les souris déficientes en IL-6 ont résisté à ces changements induits par l'huile minérale en étant incapables de recruter des macrophages au péritoine et ainsi développer une réponse inflammatoire chronique (31). Il est aussi reconnu que IL-6 inhibe la maturation des CD et leur confère ainsi un caractère immunitaire faible (33). Enfin, dans le myélome multiple, les cellules malignes présentes dans la moelle osseuse induisent l'expression d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  chez les cellules stromales. Il a été démontré que ces cytokines inflammatoires favorisent la croissance des cellules tumorales de myélome et induisent la résistance à plusieurs thérapies (31).

Les prostaglandines sont du nombre des activateurs de NF- $\kappa$ B et de puissants médiateurs de l'inflammation aiguë et chronique. Plusieurs études ont démontré que les effets protecteurs de certains médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAID) contre le cancer découlent de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines. La production de prostaglandines est notamment régulée par la cyclooxygénase-2 (COX-2). Une étude ayant pour modèle des souris chez lesquelles la polypose recto-colique familiale, précurseur du cancer du colon, avait été induite a démontré que les souris déficientes du gène de COX-2 ou traitées avec des NSAID sont davantage protégées contre le cancer du colon (10, 34).

Le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) est reconnu comme un puissant activateur de la cytotoxicité en plus d'augmenter l'activité phagocytaire des macrophages (35, 36). Une étude testant 10 gènes de cytokines et de molécules d'adhésion transfectés dans des cellules de mélanome a démontré que GM-CSF était la cytokine induisant le meilleur effet anti-tumoral (37). Cette même étude a également démontré, *in vitro*, une diminution de la prolifération cellulaire des cellules tumorales non-transfectées et stimulées par GM-CSF. Cependant, GM-CSF présente également plusieurs caractéristiques pro-tumorales. Une étude réalisée au début des années 1990 a démontré une augmentation de la prolifération, *in vitro*, chez certaines lignées cellulaires tumorales activées via GM-CSF, dont les cellules du cancer de la vessie T24 (38). De plus, GM-CSF, en présence d'IL-4, induit la production de TARC (*thymus- and activation-regulated chemokine*) par les monocytes (39). TARC est une chémokine attirant les lymphocytes Th2, présentant une activité davantage pro-tumorale (voir les sections 2.5 et 2.6). Ainsi, GM-CSF est l'une des cytokines pro-inflammatoires les plus mitigées quant à ses aspects pro- ou anti-tumoraux.

La plupart des cytokines inflammatoires décrites précédemment sont de puissants inducteurs de chémokines. Ces dernières jouent un rôle important dans le recrutement des leucocytes aux sites d'inflammation. Il existe deux principaux groupes de chémokines : les chémokines CXC et CC (40). Le tableau 1.2 présente les principales chémokines dont nous discuterons dans ce travail. Les chémokines CXC attirent plus



spécifiquement les neutrophiles et les lymphocytes alors que les chémokines CC posent leurs actions sur plusieurs types de leucocytes dont les monocytes, les macrophages, les CD, les lymphocytes et les neutrophiles (41, 42). Plusieurs études suggèrent que les chémokines CC sont les principales responsables du recrutement des macrophages et des lymphocytes dans les tumeurs de mélanomes, de carcinomes des ovaires, du sein, du col de l'utérus ainsi que de plusieurs sarcomes et gliomes (19). L'une des chémokines les plus importantes dans la progression tumorale est MCP-1 (CCL2). Celle-ci est retrouvée en grande quantité dans la plupart des tumeurs. À titre d'exemple, dans le cancer de l'oesophage, MCP-1 est associée à l'infiltration des macrophages dans la tumeur, à l'invasion tumorale et à la vascularisation néoplasique (40, 43). Dans le cas de la maladie de Hodgkin, les cellules malignes de Reed-Sternberg expriment deux chémokines qui attirent les lymphocytes Th2, soient CCL22 et TARC. Plusieurs types de tumeurs produisent également IL-8 (CXCL8). Il a été démontré que cette chémokine induit la prolifération et la migration des cellules de mélanome (44). La production d'IL-8 est également associée au potentiel tumorigénique et métastatique des cellules du cancer pancréatique (16). Ces observations démontrent une implication potentielle des chémokines dans la progression tumorale et prouvent qu'elles sont plus que de simples attractants leucocytaires. Nous aborderons, à la section 2.4, le rôle de ces chémokines dans le recrutement des TAM et la progression néoplasique.

Seulement quelques cytokines sont reconnues pour inhiber la progression tumorale. Notamment, la réponse inflammatoire aiguë est associée à une production exhaustive de IFN- $\alpha/\beta$  et de IFN- $\gamma$  par les leucocytes inflammatoires. La production de IFN- $\alpha/\beta$  dans la tumeur induit l'activation de p53 et ralentit ainsi le développement du cancer (45). De plus, ces deux types d'interférons ( $\alpha/\beta$  et  $\gamma$ ) activent le transducteur-1 du signal et activateur de la transcription (STAT-1), ce qui mène à l'activation du facteur-1 régulateur de l'interféron (IRF1) (46). Ce facteur de transcription est essentiel à la réponse immunitaire induite par les lymphocytes Th1 et au développement des cellules tueuses naturelles (NK) (47, 48). De plus, IRF1 régule l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'ADN endommagé en collaboration avec p53 via l'activation du gène de p21, un inhibiteur du cycle cellulaire (49). Ainsi, il y a des évidences claires que certains

interférons sont essentiels à la réduction de la fréquence des mutations et à la réparation de celles-ci. De plus, IFN- $\gamma$  est un élément crucial du développement de l'immunité de type 1 en induisant un phénotype davantage anti-tumoral à plusieurs types de leucocytes. Nous aborderons plus en détail le rôle joué par ces leucocytes dans la progression tumorale ainsi que les types d'immunités dans le chapitre 2.

## CHAPITRE 2

### MACROPHAGES, LYMPHOCYTES T ET PROGRESSION TUMORALE

#### 2.1 Activation des macrophages

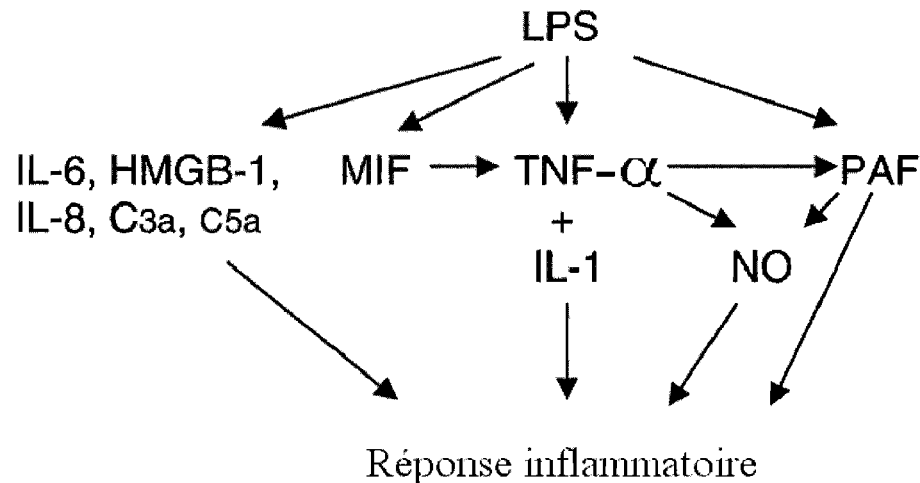
Les macrophages tirent leur origine de la moelle osseuse à partir de précurseurs myéloïdes avant de circuler à titre de monocytes immatures dans le système périphérique et de finalement migrer vers les tissus où ils sont alors différenciés en macrophages (50). Il n'y a pas si longtemps déjà, les macrophages activés étaient simplement considérés comme des cellules sécrétant des médiateurs inflammatoires et éliminant les pathogènes intracellulaires. Progressivement, le concept de macrophage s'est complexifié. On sait aujourd'hui que les macrophages sont responsables d'une panoplie de fonctions dont l'inflammation, le remodelage des tissus lésés, la phagocytose, la cytotoxicité ainsi que la sécrétion d'une multitude de cytokines, de facteurs de croissance, du lysozyme, de protéases, de facteurs du complément, de prostaglandines et de facteurs de coagulation (9).

Le mécanisme exact régulant la différenciation des monocytes en macrophages non-activés n'est pas clairement défini. Cependant, cette différenciation nécessite incontestablement la présence du facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF). En effet, il a été démontré que la régulation transcriptionnelle du gène *c-fms*, qui code pour le récepteur de M-CSF (M-CSFR), est fondamentale à la différenciation, la prolifération et la survie des monocytes, d'une demi-vie d'environ 3 jours lorsque non-activés. La déplétion de *c-fms* est associée à l'absence de macrophages dans les tissus (51, 52). Le concept classique de l'activation des macrophages comprend deux signaux distincts. Le premier signal est établi par l'IFN- $\gamma$  qui permet de sensibiliser le macrophage à une future activation, mais sans activer directement celui-ci. Donc, suite au premier signal, le monocyte prend le statut de "macrophage non-activé". Le second signal est induit par l'activation des récepteurs Toll-like (TLR) qui induisent à leur tour l'expression de TNF- $\alpha$  par les macrophages. Comme il existe plusieurs ligands pour les

TLR, plusieurs facteurs peuvent être utilisés pour induire le second signal. Le principal facteur utilisé pour l'activation des macrophages est le LPS. Ce dernier se lie entre autres à CD14, un marqueur de différenciation exprimé par les macrophages non-activés (9, 53, 54). Comme il manque un domaine intracytoplasmique à CD14, le signal est relayé par TLR2 ou TLR4. Les bactéries gram+ induisent préférentiellement l'activation de TLR2 via la liaison de l'acide lipotéichoïque ou du peptidoglycane à CD14. Les bactéries gram- induisent davantage l'activation de TLR4 via la liaison du LPS à CD14. Cependant, les activations de TLR2 et de TLR4 induisent des réponses intracellulaires identiques étant donné leur similarité structurelle. L'activation de TLR2 et TLR4 induit l'activation de NF- $\kappa$ B, qui à son tour induit la survie cellulaire des macrophages et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (55, 56). L'activation de NF- $\kappa$ B implique la phosphorylation de l'inhibiteur de kappa B (I $\kappa$ B), ce qui rompt la liaison entre I $\kappa$ B et NF- $\kappa$ B et induit la translocation de ce dernier du cytosole vers le noyau (57). Tel que discuté au chapitre 1.4, l'activation de NF- $\kappa$ B est également induite par TNF- $\alpha$  via les TNFR exprimés par les macrophages. Il existe deux TNFR: TNFR1 et TNFR2. Le premier est exprimé par la plupart des cellules alors que TNFR2 est principalement exprimé par les leucocytes, dont les macrophages. TNFR1, contrairement à TNFR2, peut également induire l'apoptose. Ainsi, à titre d'exemple, TNF- $\alpha$  peut induire l'apoptose de cellules tumorales exprimant TNFR1 alors qu'il induira la survie des macrophages exprimant davantage TNFR2 (55).

La liaison du LPS à CD14 induit notamment l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8, dont les principales fonctions sont d'induire l'expression d'IFN- $\gamma$  ainsi que d'attirer les neutrophiles et les cellules T (58). De plus, le LPS induit la sécrétion de HMGB-1 (*high-mobility group box-1 protein*), du facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF), du facteur activateur des plaquettes (PAF), de C3a et C5a, de TNF- $\alpha$ , d'IL-1, d'IL-6 et de l'oxyde nitrique (NO) par les macrophages (voir la figure 2.1) (55). HMGB-1 est un facteur de transcription pouvant être sécrété par les macrophages à titre de cytokine pro-inflammatoire. Celle-ci, impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques, prolonge la réponse inflammatoire via une induction autocrine d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  chez les macrophages. Cependant, les fonctions

exactes de HMGB-1 sont encore sous étude (59). Les facteurs du complément C3a et C5a sont d'importants vasodilatateurs induisant la sécrétion d'histamine, ce qui permet également l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins. De plus, C5a permet la phagocytose des bactéries via l'activation de la voie alternative du complément (55, 60). PAF induit notamment l'activation et l'aggrégation des plaquettes en plus d'induire la libération de l'histamine par celles-ci, avec les conséquences citées précédemment (61). Enfin, les fonctions physiologiques de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 et d'IL-6 sont représentées dans le tableau 1.1.



**FIGURE 2.1:** Expression de plusieurs médiateurs inflammatoires induits par le LPS chez les macrophages. L'activation de CD14 chez les macrophages par le LPS induit l'expression d'IL-6, de HMGB-1, d'IL-8, des facteurs du complément C3a et C5a, de MIF, de TNF- $\alpha$ , d'IL-1, de PAF et de NO.

Tiré de: (55)

Les fonctions biologiques des macrophages activés sont nombreuses. Une fois qu'ils ont atteint le site d'inflammation, les macrophages sont alors en contact avec les pathogènes et peuvent alors les éliminer. Au site inflammatoire, les macrophages activés affichent une activité phagocytaire similaire à celle des autres cellules phagocytaires, tels que les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules dendritiques et les mastocytes (62). Cependant, les macrophages possèdent une grande habilité à tuer et dégrader les microorganismes intracellulaires. La destruction de ces pathogènes est principalement accomplie par une augmentation de la production de composés oxygénés

toxiques, dont NO, libérés dans le site inflammatoire suite à l'activation des TNFR par TNF- $\alpha$  (63). L'action physiologique de NO est principalement accomplie via l'induction de la voie de la guanosine monophosphate cyclique, qui réduit la concentration intracellulaire de calcium (64). Les macrophages éliminent aussi les pathogènes par opsonisation, qui consiste en la phagocytose de ceux-ci suite à la reconnaissance des anticorps fixés aux pathogènes. Cette reconnaissance est effectuée par les récepteurs Fc exprimés par les macrophages. Lors de la phagocytose, les pathogènes sont dégradés par les enzymes hydrolytiques libérées par les lysosomes fusionnant avec les phagosomes à l'intérieur du macrophage (65). L'activation des macrophages via les récepteurs Fc induit également la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC de *antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity*). Celle-ci induit la sécrétion d'enzymes lytiques par les macrophages qui vont alors lyser la cellule pathogénique (66). De plus, la liaison d'anticorps aux récepteurs Fc d'un macrophage augmente sa survie (67). La phagocytose peut être également induite via les TLR, qui reconnaissent le LPS présent à la surface des bactéries (68). Enfin, tous ces mécanismes induisent l'expression de cytokines inflammatoires par les macrophages dont les principales sont TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6 (voir le tableau 1.1). Celles-ci permettent indirectement l'élimination des pathogènes via leurs actions sur les cellules endothéliales vasculaires et les leucocytes présents au site inflammatoire.

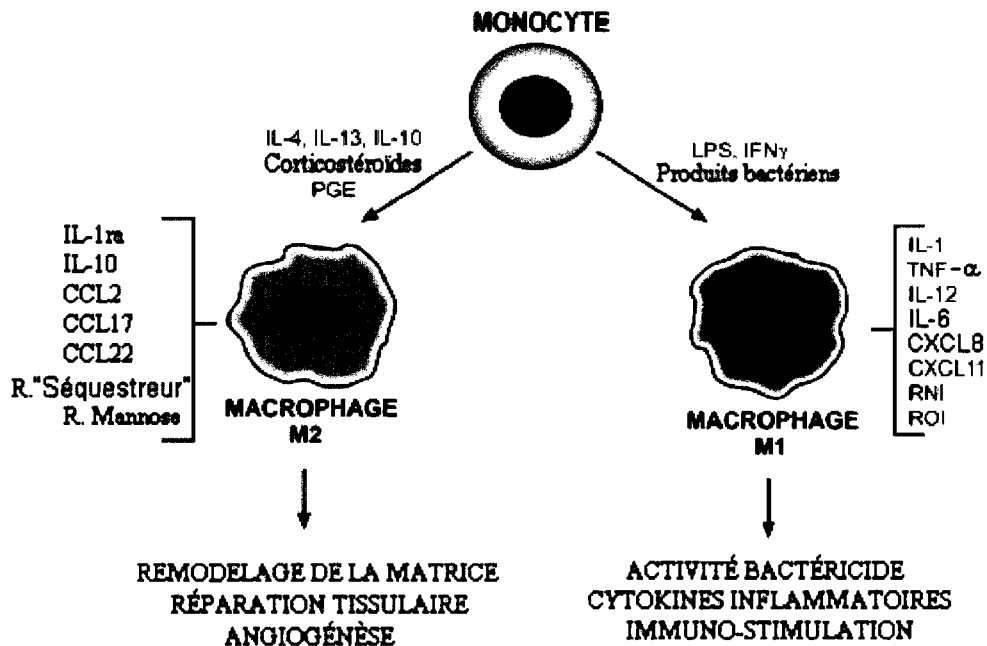
Les macrophages activés ont une forme bien particulière: 10 fois plus gros que les monocytes dont ils sont issus, ils présentent de longues protubérances nommées pseudopodes leur servant à couvrir un large périmètre. Ces leucocytes se regroupent habituellement en granulomes composés d'un noyau de macrophages entourés de lymphocytes T sécrétant plusieurs cytokines activantes. Ces granulomes sont une source riche en cytokines inflammatoires, de radicaux toxiques et de médiateurs inflammatoires lipidiques. Ces produits peuvent causer d'importants dommages au tissu hôte si leur production n'est pas contrôlée (9). Ce contrôle provient principalement de TGF- $\beta$  et d'IL-10 sécrétés par les cellules avoisinantes ou par les macrophages eux-mêmes. Des souris déficientes de l'un ou l'autre de ces gènes ont démontré une hypersensibilité inflammatoire (69, 70). Enfin, la reconnaissance de cellules apoptotiques et leur

clairance par les macrophages, via la liaison des phosphatidylsérines, conduit à la sécrétion de TGF- $\beta$ 1 et à la résolution de l'inflammation (71).

## 2.2 Polarisation des macrophages

Au fil des années, l'activation des macrophages s'est complexifiée, semblant être davantage hétérogène que ce qui était proposé initialement. Le premier indice de cette hétérogénéité est apparu avec la caractérisation des macrophages activés de « façon alternative ». L'activation des macrophages avec IL-4 induisait une population de cellules surexprimant certains récepteurs phagocytaires mais qui produisait peu de NO avec comme conséquence une faible capacité à tuer les microorganismes pathogènes (72). Avec le temps, les recherches ont permis d'établir deux phénotypes distincts de macrophages: M1 et M2 (voir la figure 2.2). Les macrophages activés selon la manière classique ont été définis comme M1 alors que les macrophages M2, à l'opposé, proviennent de l'induction via IL-4 en collaboration avec IL-13 ou IL-10. Cette hétérogénéité des macrophages reflète leur plasticité et versatilité envers les signaux délivrés dans l'environnement inflammatoire (73). Initialement, IL-4, IL-10 et IL-13 étaient définis comme de simples inactivateurs de macrophages. Progressivement, il est devenu évident que ces cytokines induisaient un phénotype particulier de macrophages. Dans ce travail, nous emploierons les termes M1 et M2 afin de définir les extrêmes du spectre des phénotypes possibles de macrophages. Cependant, la polarisation des macrophages doit être vue comme une simplification du concept de macrophages décrivant plutôt une continuité de fonctions et d'états (74). Il est important de préciser que la nomenclature M1/M2 possède l'avantage de refléter la dichotomie Th1/Th2, expliquée en détail à la section 2.5. Nous pouvons cependant extrapoler le concept de polarisation des leucocytes et l'appliquer à l'immunité: les M1 et Th1 sont relatifs à l'immunité de type 1 alors que les M2 et Th2 sont reliés à l'immunité de type 2. L'immunité de type 1 fait référence à la réponse immunitaire induite par les pathogènes intracellulaires ou phagocytibles alors que l'immunité de type 2 représente la réponse immunitaire induite par des pathogènes extracellulaires non-phagocytibles. L'immunité de type 2 se développe suite à la persistance de l'immunité de type 1 (75). Enfin, il est

important de noter que le concept des immunités de types 1 et 2 s'applique non seulement aux macrophages et lymphocytes Th, mais également aux CD et lymphocytes T cytotoxiques ainsi qu'à plusieurs autres types de leucocytes.



**FIGURE 2.2: Les macrophages M1 et M2. Les monocytes sont polarisés en M1 ou en M2 en fonction des cytokines présentes au site inflammatoire. L'IFN- $\gamma$ , le LPS et autres produits bactériens induisent le phénotype M1. IL-4, IL-10, IL-13, les corticostéroïdes et les prostaglandines (PGE) induisent la polarisation M2. Ces deux phénotypes de macrophages possèdent des fonctions distinctes. Les M1 détruisent les bactéries pathogènes, produisent de grandes quantités de cytokines inflammatoires et stimulent le système immunitaire. Les M2 induisent le remodelage de la matrice, la réparation des tissus et l'angiogénèse. Les principaux produits des M1 et M2 sont représentés.**

Tiré de: (76)

Les macrophages M1 sont définis comme des cellules tuant les microorganismes et les cellules tumorales et produisant de grandes quantités de facteurs pro-inflammatoires, telles que les cytokines TNF- $\alpha$  et IL-6. Leur phénotype est caractérisé, entre autres, par l'expression de récepteurs opsoniques tel que CD16 (Fc $\gamma$ RIII), responsable de l'ADCC. De plus, les macrophages M1, tout comme les macrophages



activés selon la voie classique, sont associés à une importante production d'intermédiaires toxiques tels que le NO et les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) (73). Contrairement aux macrophages M2, les macrophages M1 sont reconnus pour exprimer fortement IL-12 et faiblement IL-10 (77). Enfin, l'expression relativement élevée de la chémokine IL-8 est spécifique aux macrophages M1 (74).

Les macrophages M2 sont habituellement caractérisés par une faible production de cytokines pro-inflammatoires et sont associés à l'angiogénèse et la réparation tissulaire. De plus, ils expriment plusieurs récepteurs non-opsoniques, tel que le récepteur du mannose. L'activation des macrophages M2, notamment par IL-10, désactive l'immunité et l'inflammation, régule l'expression de plusieurs phosphatases, permet le remodelage de la matrice extracellulaire et l'activation des lymphocytes B. Enfin, les chémokines CCL22 et MCP-1 sont fortement exprimées par les macrophages M2 (73, 74).

### **2.3 Les macrophages associés à la tumeur ou macrophages M2**

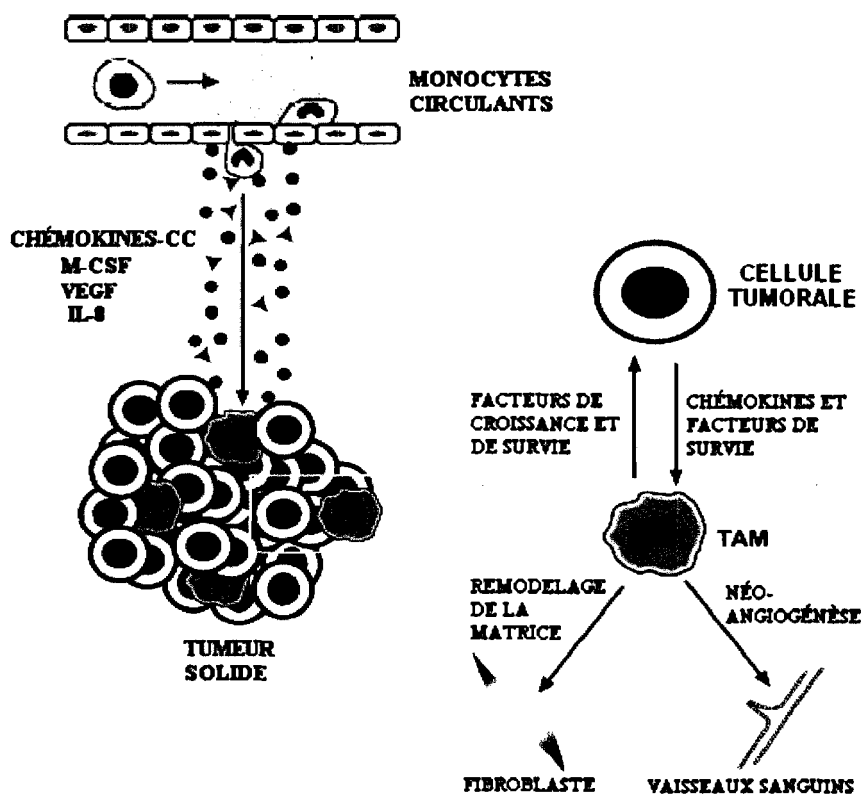
La présence de leucocytes aux sites d'inflammation a longtemps été perçue comme une activité bénéfique dérivant de la surveillance immunitaire. Cependant, plusieurs études ont démontré une accumulation de leucocytes, principalement des macrophages, dans le cas de plusieurs pathologies dont l'arthrite et l'athérosclérose (78, 79). L'inflammation chronique causée par la présence de macrophages semble être l'élément déclencheur de ces maladies. Depuis plusieurs années, la présence de macrophages a également été détectée dans plusieurs tissus néoplasiques incluant les cancers du sein, de la prostate, de l'utérus, des poumons et de la vessie. La détection de TAM est associée à un pronostic pauvre (80). Une multitude d'évidences laissent croire que les TAM sont des macrophages de phénotype M2. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les macrophages M2 favorisent l'angiogénèse et la réparation tissulaire. Ces caractéristiques, reconnues pour faciliter la croissance tumorale, sont également retrouvées chez les TAM. Enfin, il est proposé que l'environnement tumoral représente un microenvironnement darwinien sélectionnant les macrophages avec des propriétés

favorables à la croissance néoplasique. Plus précisément, les cellules tumorales sécrèteraient des chémokines permettant l'attraction spécifique des TAM et produiraient certains facteurs favorisant la survie de ce type particulier de macrophages bénéfiques à la croissance de la tumeur (81). Nous verrons plus en détail cette interaction macrophage/cellule tumorale dans la section suivante.

## **2.4 Les chémokines et le recrutement des TAM**

Les macrophages sont recrutés par l'environnement néoplasique via la sécrétion de plusieurs chémokines, des cytokines permettant l'attraction des monocytes circulants et des macrophages tissulaires non-activés (voir la figure 2.3). En formant un gradient à partir du point de départ de leur sécrétion, les chémokines permettent un afflux directionnel des leucocytes circulants, dont des monocytes, vers la tumeur. Les tumeurs sont généralement caractérisées par une expression constitutive des chémokines classifiées comme inductibles ou inflammatoires. En fait, les tumeurs ont permis la découverte de plusieurs chémokines. Cette attraction des monocytes vers la masse tumorale est l'événement déclencheur de l'inflammation chronique au niveau du site néoplasique (81).

Les tumeurs sécrètent notamment M-CSF et VEGF de façon constitutive. Même si ces cytokines ne sont pas considérées comme des chémokines, celles-ci interagissent avec les récepteurs des tyrosines kinases afin d'activer les voies de signalisation requises à l'attraction des monocytes. De plus, elles permettent la survie, la prolifération et la différenciation des macrophages dans le site néoplasique (82). Des études avec des souris déficientes en M-CSF ont démontré la diminution du recrutement des macrophages et de la croissance tumorale dans un modèle de carcinome du poumon (83). Dans un modèle de cancer mammaire, la déficience en M-CSF n'affecte pas les stades précoces du cancer, mais réduit la progression et l'invasion des carcinomes invasifs et des métastases (84).



**FIGURE 2.3: Interactions cellules tumorales-TAM.** Les chémokines-CC, M-CSF, VEGF et IL-8 induisent l'attraction des monocytes circulants vers le site tumoral. Une fois qu'ils ont atteint la tumeur, les différents facteurs produits par celle-ci induisent la différenciation des monocytes en macrophages associés à la tumeur (TAM). Les TAM interagissent avec les cellules néoplasiques et favorisent alors la croissance de la tumeur via différentes actions. Celles-ci sont principalement d'augmenter la survie des cellules tumorales, le remodelage de la matrice extracellulaire et la néo-angiogénèse.

Tiré de: (76)

Cependant, la chémokine la plus retrouvée dans les tumeurs est MCP-1 (85). Les tumeurs reconnues pour exprimer MCP-1 sont les sarcomes, les gliomes, les tumeurs du poumon, les mélanomes ainsi que les carcinomes du sein, du col de l'utérus et des ovaires (81). Dans le cas du cancer du sein par exemple, MCP-1, en plus d'être associée à une accumulation des TAM, corrèle avec la présence de plusieurs cytokines angiogéniques, dont VEGF, TNF- $\alpha$  et IL-8. De plus, MCP-1, connue pour être exprimée par les macrophages M2, contribue à l'immunité induite par les Th2 (86). Nous verrons plus en détail le rôle des cellules Th2 dans l'immunité passive rencontrée

dans plusieurs cancers. D'ailleurs, la presque totalité des chémokines induisent une polarisation de phénotype 2 aux lymphocytes Th, excepté dans le cas de la maladie d'Hodgkin (16). Par conséquent, MCP-1, au même titre que M-CSF, VEGF, TNF- $\alpha$  et IL-8, est considéré comme un facteur pro-tumoral.

CCL22 est aussi une chémokine présente dans plusieurs cancers. Cette chémokine, sécrétée tant par les cellules tumorales que les macrophages présents dans l'environnement néoplasique, reconnaît le récepteur CCR4 exprimé par les cellules Th2, les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les monocytes/macrophages (40). Plusieurs études, dont une dans le cas du cancer ovarien, ont démontré que les cellules Treg médient une immunotolérance en supprimant les lymphocytes T spécifiques aux antigènes tumoraux (87). La section 2.7 du présent ouvrage y est entièrement consacrée.

Enfin, IL-8 (CXCL8) est également détectée dans plusieurs types de tumeurs dont le mélanome. Les cellules tumorales de mélanomes expriment un niveau élevé du récepteur d'IL-8, soit CXCR2. Il a été démontré qu'une stimulation autocrine de ce récepteur accroît la survie des cellules tumorales, leur prolifération et leur invasion (88). Il est intéressant de noter que IL-4 induit l'expression de CXCR2 chez les monocytes (89). Cependant, les cytokines, tels que IL-4 et IL-10, qui induisent la polarisation M2 des macrophages, inhibent la production de plusieurs chémokines. La sécrétion d'IL-8, de CCL5, des MIP et des chémokines inductibles par l'IFN- $\gamma$ , CXCL9 et CXCL10, est inhibée chez les macrophages activés avec IL-4 et IL-10 (90). L'activation de CXCR2 chez les macrophages M2 doit donc provenir d'autres cellules, telles que les cellules tumorales ou les macrophages M1. Une étude menée par Fugimoto et ses collègues a permis de constater une corrélation entre le taux d'IL-8, l'infiltration de macrophages dans l'environnement néoplasique endométrial, la densité de vaisseaux sanguins dans les tumeurs et l'invasion tumorale (91). De plus, les auteurs de cette étude ont démontré que la production d'IL-8 provient des macrophages infiltrant les tumeurs endométriales. Par conséquent, IL-8, sécrétée par les macrophages infiltrant la tumeur, projette des propriétés angiogéniques favorisant la progression tumorale. Nous avons décrit trois principales chémokines (MCP-1, CCL22 et IL-8) et leur interrelation avec le système

immunitaire et tumorale puisque leur expression sera analysée dans le présent ouvrage. Cependant, plusieurs autres chémokines sont également retrouvées dans plusieurs cancers dont CCL5, CXCL12, CXCL1, CXCL13 et CCL17 (40).

En plus d'être pour la plupart immunosuppressives, pro-angiogéniques et inductrices de facteurs de croissance, les chémokines contribuent à la progression tumorale en induisant la production de métalloprotéases (MMP) (74, 92). Les chémokines CC, tels que MCP-1 (CCL2) et CCL22 induisent la production de MMP-9 dans les macrophages (93). Les métalloprotéases sont retrouvées en grande quantité dans plusieurs types de cancers et jouent un rôle important dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Ainsi, les métalloprotéases produites par les cellules stromales et tumorales participent à la migration et l'invasion tumorale.

Enfin, les récepteurs des chémokines (CCR et CXCR) sont exprimés tant par les leucocytes que par les cellules tumorales (40). Les leucocytes peuvent arrêter d'exprimer ces récepteurs une fois qu'ils sont exposés aux cytokines inflammatoires présentes dans l'environnement néoplasique. L'exemple le plus flagrant est sans contredit la diminution de l'expression de CCR2 (le récepteur de MCP-1) chez les TAM du cancer ovarien (94). La diminution de l'expression de CCR2 permettrait ainsi de retenir les TAM dans l'environnement tumoral.

## **2.5 Le système Th1/Th2**

L'hypothèse de la polarisation Th1/Th2 est apparue à la fin des années 1980, avec la découverte de deux types de lymphocytes différents dans leur patron d'expression de cytokines et de fonctions (95). Le concept Th1/Th2 est similaire à celui établi pour les macrophages, soit celui des M1 et M2. Les cellules Th1 et Th2 expriment différents récepteurs à la surface de leur membrane conférant à chacun des types lymphocytaires une activité distincte. Les deux types de lymphocytes Th sécrètent des cytokines permettant leur propre croissance. Chaque phénotype sécrète également des cytokines qui régulent le développement et l'activité de l'autre phénotype de cellules

Th. À l'instar du paradigme M1/M2, les effets des Th1 et des Th2 sont maintenant au cœur de recherches se posant sur leur relation dans la progression d'une multitude de maladies, dont le cancer (22).

Les deux types de lymphocytes, Th1 et Th2, sont produits à partir du même type de précurseurs de lymphocyte T: les lymphocytes T naïfs. La différenciation des lymphocytes T naïfs survient lorsqu'ils sont en contact direct avec les cellules présentatrices de l'antigène. Les lymphocytes T naïfs passent alors par un état transitionnel leur conférant le statut de lymphocytes Th0 pré-activés. Les cytokines, incluant plusieurs chémokines, présentes dans l'environnement des lymphocytes déterminent ensuite leur polarisation (96). Cependant, en plus des cytokines, la dose de l'antigène, le contact cellule-cellule avec les APC, la diversité et l'intensité de ce contact et les récepteurs disponibles sur les cellules T naïves déterminent la polarisation des lymphocytes Th. Ainsi, les phénotypes Th1 et Th2 sont générés à partir des cellules effectrices servant à la réponse immédiate et à la réponse à long terme, via les cellules à mémoire; ces dernières étant activées suite à un second contact avec l'antigène (22).

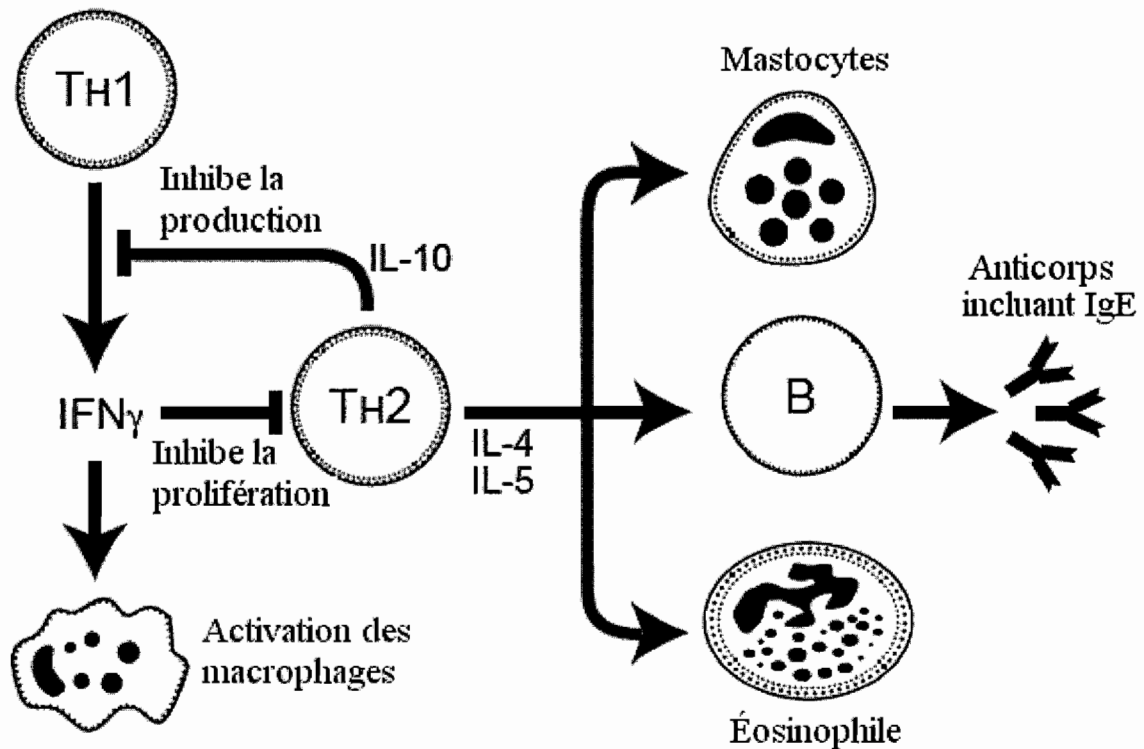
À l'image des macrophages M1, les lymphocytes Th1 doivent leur polarisation à l'action de l'IFN- $\gamma$ . Cependant, IL-2 et IL-12 sont également, dans une moindre mesure, responsables du phénotype des lymphocytes Th1. Ces dernières, reliées à l'immunité de type 1, permettent la mise en place de l'attaque immunitaire contre les pathogènes intracellulaires et les cellules cancéreuses. De plus, les cellules Th1 participent à l'hypersensibilité retardée (DTH, de *delayed-type hypersensitivity*) contre les antigènes bactériens et viraux impliquant la branche à médiation cellulaire (22). Il a d'ailleurs été démontré que les lymphocytes Th1 jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre la tuberculose et un traitement contre cette maladie impliquant l'injection de cytokines favorisant la polarisation Th1 est en cours d'étude (97). Un macrophage ou toute autre APC présentant un pathogène intracellulaire se comportera alors comme une APC de phénotype 1. Les APC se déplacent dans les ganglions lymphatiques où la rencontre avec un lymphocyte Th est beaucoup plus probable et se mettent alors à sécréter IL-12. Plus cette cytokine se retrouve dans l'environnement du ganglion, plus

elle influence la polarisation des lymphocytes T naïves en cellules Th1. Les cellules NK sont sensibles à IL-12 et sécrètent alors IFN- $\gamma$  qui favorise la production d'IL-12 par les APC. Lorsqu'ils atteignent leur maturité, les lymphocytes Th1 sécrètent aussi IFN- $\gamma$ , lequel, avec les cellules NK et les APC, stimule les cellules T naïves à se polariser en Th1. Une boucle autocrine et paracrine favorisant la polarisation Th1 est alors créée. De plus, IFN- $\gamma$  inhibe la prolifération des lymphocytes Th2 (voir la figure 2.4) (96). Le signal induit par les Th1 est souvent représenté comme le plus agressif des deux phénotypes. Cependant, lorsque les cellules Th1 sont suractivées, ils peuvent générer certaines maladies auto-immunes spécifiques à des organes, tels que l'arthrite, plusieurs scléroses et le diabète de type 1 (98).

Les lymphocytes Th2 sont polarisés via l'action d'IL-4, d'IL-6 et d'une manière moins importante par IL-5. Les cellules Th2 sont reconnues pour participer à la protection contre les pathogènes extracellulaires tels que les parasites multicellulaires (99). Les lymphocytes Th2 produisent davantage IL-4 et IL-5 que les lymphocytes Th1. Par conséquent, comme les lymphocytes Th1, ils favorisent leur propre polarisation d'une manière autocrine. De plus, la production d'IL-4 et d'IL-5 par les lymphocytes Th2 active les mastocytes, les lymphocytes B et les éosinophiles. Les cellules Th2 sécrètent aussi IL-10, inhibant ainsi la prolifération des cellules Th1 (22, 100). La polarisation des cellules Th2 dépend également des cytokines présentes dans l'environnement. Leur maturation est initiée par IL-6, sécrétée par les APC, tels que les macrophages, les fibroblastes et les mastocytes. IL-4, sécrétée par les cellules NK, les mastocytes et les éosinophiles, participe aussi à la maturation des cellules Th2. La suractivation de la polarisation des lymphocytes Th2 est associée à plusieurs allergies impliquant les IgE et à certaines maladies auto-immunes systémiques (22).

La polarisation Th1 ou Th2 semble finale puisque les efforts pour renverser l'un ou l'autre des phénotypes n'ont pas porté fruit. De plus, la polarisation des lymphocytes Th, tout comme celle des macrophages, est représentative de la polarisation du système immunitaire en entier. Ainsi, la polarisation des APC, tels que les monocytes, les macrophages et les DC, se produit lors du contact primaire avec l'antigène. Ces APC se

polarisent selon le phénotype 1 ou II en fonction du type d'antigène rencontré. Cette polarisation des APC va par la suite influencer celle des lymphocytes Th selon le phénotype 1 (Th1) ou le phénotype 2 (Th2) (22).



**FIGURE 2.4:** Les lymphocytes Th1 et Th2. Les lymphocytes Th1 sécrètent l'IFN- $\gamma$  et induisent la réponse inflammatoire en activant les macrophages. Les lymphocytes Th2 produisent IL-4 et IL-5, stimulant ainsi les lymphocytes B à produire davantage d'anticorps. IL-4 et IL-5 activent également les éosinophiles et les mastocytes. De plus, les Th1 inhibent l'activation des Th2 et vice versa.

Tiré de: (22)

## 2.6 Lymphocytes Th1, Th2 et le cancer

Les lymphocytes Th1 produisent plusieurs facteurs, dont IFN- $\gamma$ , qui activent les lymphocytes Tc, les cellules NK, les monocytes et les macrophages, tous pouvant alors attaquer les cellules cancéreuses et défendre l'hôte contre la tumeur. IFN- $\gamma$  et plusieurs cytokines spécifiques des lymphocytes Th1 sont retrouvés en plus faibles quantités chez



les patients atteints d'un cancer avancé (101). Au contraire, IL-4, spécifique des lymphocytes Th2, est détectée en plus grande concentration ou demeure inchangée (102). Dans le cas du cancer de la prostate par exemple, IL-2 est retrouvée en faible quantité alors que IL-10, suppresseur de la réponse Th1, est davantage présente (103). IL-10 inhibe aussi l'activité des APC et des cellules NK ainsi que la prolifération des cellules T en général (104). Sous l'influence d'IL-4 (Th2), les tumeurs augmentent leur production d'IL-10 et favorisent ainsi leur croissance en supprimant l'activité des cellules éliminant les cellules cancéreuses. Cette augmentation de l'expression d'IL-10 a été démontrée dans le cas du lymphome, du carcinome ovarien, du mélanome, du neuroblastome, et des carcinomes rénal et du colon. Par conséquent, un haut taux d'IL-10 est maintenant corrélé à un pauvre pronostic chez les patients souffrant de cancer. Puisque IL-4 et IL-10 sont des inhibiteurs des cellules Th1 et des promoteurs des cellules Th2, la capacité des tissus cancéreux à supprimer l'immunité peut être rationalisée. Les cellules Th1 sont donc considérées comme anti-tumorales alors que les cellules Th2, à l'inverse, favorisent la croissance néoplasique et sont par conséquent pro-tumorales (104).

Certaines thérapies pour contrer l'effet d'IL-4 et d'IL-10 sont aujourd'hui sous étude et incluent l'insertion de gènes pro-Th1 dans la tumeur. Cependant, le fait d'enrayer l'effet d'une ou deux cytokines favorisant la croissance tumorale aura probablement, selon plusieurs, un effet substantiel. Les tumeurs sécrètent notamment plusieurs facteurs non-protéiques qui favorisent la suppression des lymphocytes Th1. Cependant, le concept Th1/Th2 aide à comprendre une partie du mécanisme de la croissance tumorale et peut être le sujet d'un traitement jumelé à d'autres méthodes afin d'enrayer cette croissance (22).

Comme nous l'avons vu précédemment, les lymphocytes Th1 et Th2 sont des antagonistes, au même titre que les M1 et les M2. Plus spécifiquement, chaque phénotype peut inhiber la formation de l'autre (96). Cependant, d'autres cellules immunitaires peuvent interférer avec les deux sous-types de lymphocytes Th: les lymphocytes Treg.

## 2.7 Les lymphocytes Treg (Tr3)

Les lymphocytes Treg possèdent des fonctions et un phénotype distinct des lymphocytes Th1 et Th2 (105). Il existe quatre sous-types de cellules Treg. Le type I (Tr1), CD4+, sécrète un niveau élevé d'IL-10 et une quantité moins importante de TGF- $\beta$ ; le type II (Tr2) inhibe la réponse immunitaire via un contact cellule-cellule; le type III (Tr3), CD4+CD25+, sécrète principalement TGF- $\beta$  alors que le type IV (Tr4), CD8+, sécrète IL-10 et TGF- $\beta$  en mêmes quantités (106). Le phénotype le plus immunosuppresseur et le mieux organisé est celui des Tr3. Par conséquent, dans cette section et les suivantes, le terme Treg fera référence aux cellules Tr3.

Les cellules Treg CD4+CD25+ représentent environ 5-10% des lymphocytes T périphériques CD4+. La découverte de ce phénotype est assez récente et date de 1995. Sakaguchi et ses collègues ont alors démontré que le transfert de lymphocytes T, excluant le phénotype CD4+CD25+, à des souris nues aboutit au développement spontané de maladies auto-immunes médiées par les lymphocytes T. Les cellules Treg ont alors été associées à la suppression d'une variété de cellules immunitaires relatives à l'immunité innée et acquise (107). Au même titre que les lymphocytes Th et Tc, les lymphocytes Treg subissent une expansion clonale une fois qu'ils ont rencontré l'antigène; ils conservent néanmoins leur capacité immunosuppressive (108).

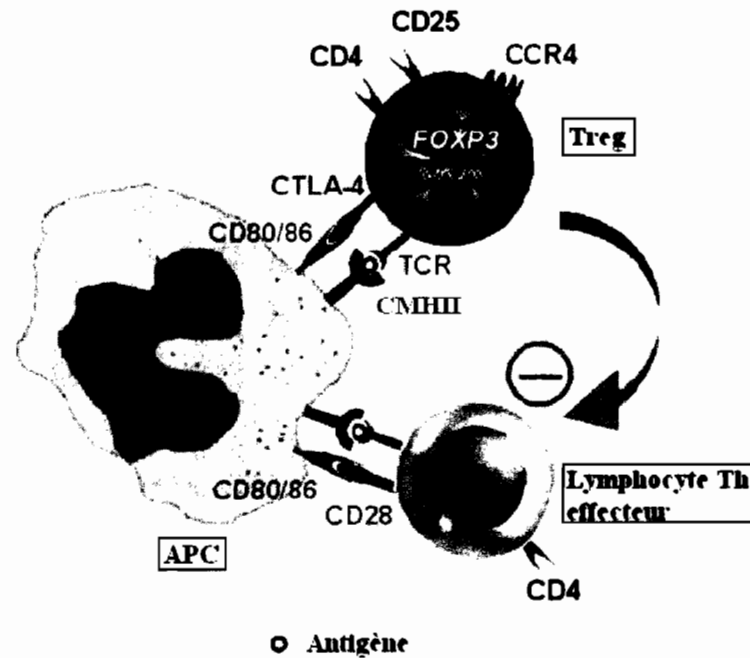
Plusieurs efforts ont été effectués afin de déterminer un marqueur spécifique au Treg, mais aucun des marqueurs retrouvés n'est totalement unique aux Treg. Le plus conventionnel est le récepteur IL-2R $\alpha$  (CD25), dont l'expression est fortement augmentée chez les Treg. D'autres récepteurs membranaires sont retrouvés à la surface des Treg, dont TNFR2 et TGF- $\beta$ R1 (109). Récemment, deux marqueurs intracellulaires prometteurs ont été identifiés : le facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead/winged-helix protein 3*) et le gène-3 d'activation du lymphocyte (LAG-3). Dans les souris, FoxP3 est exprimé presque exclusivement par les lymphocytes Tr3 alors que LAG-3 est présent chez plusieurs phénotypes de Treg (107). Les lymphocytes Treg proviennent, tout comme les cellules Th et Tc, des thymocytes (cellules T naïves) situés dans le thymus.

Lors de leur différenciation, les lymphocytes Treg nécessitent un haut niveau d'avidité pour l'interaction entre leur TCR et le complexe CMHII-peptide du Soi présent à la surface des APC. Un caractère immunosuppresseur est ensuite conféré aux Treg suite à l'activation du gène 2 activant la recombinaison (RAG2). Le mécanisme moléculaire exact n'est cependant pas compris (110, 111). Des études chez des souris knock-out ont démontré que CD28, CD40 et IL-2 sont nécessaires au développement et à la survie des lymphocytes Treg (112). Bien que ces molécules soient importantes pour le développement des cellules Treg, FoxP3 est sans aucun doute le facteur le plus critique pour la génération des Treg et leur fonctionnalité. L'inhibition de FoxP3 chez les souris résulte en maladies auto-immunes et en une prolifération incontrôlée des lymphocytes T (107).

## **2.8 Effets immunosuppresseurs des Treg**

Même si plusieurs études ont été effectuées afin d'élucider le mécanisme de l'immunosuppression propre aux cellules Treg, celui-ci demeure incompris. Il a été démontré que lorsque des lymphocytes Treg sont ajoutés à des cellules T CD4+ ou CD8+, les Treg inhibent la prolifération et l'expression des cytokines des autres types de lymphocytes (voir la figure 2.5). D'autres études ont aussi démontré que certaines cellules du système immunitaire inné, tels que les DC et les macrophages, sont des cibles pour les Treg. Ces derniers suppriment l'activité de ces APC (113). La régulation induite par les Treg activés est indépendante de la spécificité antigénique des cellules lymphoïdes et des APC. Par contre, afin d'induire leurs effets suppresseurs, les cellules Treg nécessitent une stimulation via leur TCR et IL-2 (112). De plus, certaines évidences indiquent que la suppression via les Treg nécessite un contact cellule-cellule. En effet, l'activation de plusieurs types de cellules immunitaires par le surnageant de lymphocytes Treg n'a démontré aucun effet suppresseur (107). Une étude suggère que TGF- $\beta$  peut exercer sa régulation via son expression à la surface des cellules Treg lors d'un contact cellule-cellule (114). Une autre étude suggère que les Treg médient leur effets suppresseurs via l'expression de certains facteurs membranaires cytotoxiques lors de contacts cellule-cellule également. Ces facteurs comprennent la perforine, CD18 et la

granzyme A. Les cellules cibles de ces effets cytotoxiques englobent les lymphocytes T CD4+ et T CD8+, les monocytes, les cellules B et les CD (110). D'autres facteurs, tels que LAG-3, la molécule d'adhésion B7 et TIM-3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3*) ont été cités dans certaines études comme facteurs participant à l'effet suppresseur des Treg (107, 115).



**FIGURE 2.5: Le lymphocyte Treg.** En présence d'une APC, la cellule Treg CD4+CD25+ inhibe la prolifération des lymphocytes Th CD4+ suite à une interaction avec les TCR de la cellule Treg et le CMHII de l'APC.

Tiré de: (116)

## 2.9 Lymphocytes Treg et cancer

Dans le contexte de l'immunologie tumorale, les cellules T CD4+CD25+ suppriment l'immunité anti-tumorale. La déplétion des cellules T CD4+CD25+ *in vivo* par un anticorps anti-CD25 avant l'insertion de la tumeur dans des souris augmente l'immunosurveillance tumorale et induit la destruction de plusieurs types de tumeurs. Cette augmentation de l'immunosurveillance tumorale a été associée aux cellules T CD8+ (Tc) et CD4+ (Th) ainsi qu'aux cellules NK (117, 118). Combiné à un traitement employant un vaccin de tumeur irradiée, le traitement avec un anticorps anti-CD25

induit une mémoire à long terme non seulement contre une tumeur homologe, comme le fait le traitement avec le vaccin, mais aussi contre une série de tumeurs non-relées exprimant des antigènes inconnus (119).

Dans plusieurs cas de cancers, une augmentation des cellules T CD4+CD25+ dans le système périphérique et dans le site tumoral a été constatée (120-123). Contrairement aux cellules T CD4+CD25-, les cellules CD4+CD25+ expriment le récepteur immuno-inhibiteur CTLA-4 et les cytokines immuno-suppressives IL-10 et TGF- $\beta$ , mais pas IL-2 et IFN- $\gamma$ . Il a été démontré, *in vitro*, que les cellules CD4+CD25+ suppriment la prolifération des cellules T CD4+CD25- et T CD8+ et la production d'IFN- $\gamma$  par ces dernières. Cependant, aucune différence n'a été détectée entre les marqueurs, membranaires ou solubles, des cellules Treg provenant de patients atteints de cancer et ceux des cellules Treg de patients sains. Malgré tout, chez les patients atteints de différents stades de cancers gastrointestinaux, le pourcentage de cellules T CD4+CD25+ dans le sang périphérique est inversement proportionnel au pronostic (122).

Jusqu'à tout récemment, pratiquement aucune donnée n'était enregistrée quant à l'attraction des lymphocytes Treg par la tumeur. En 2004, Curiel et ses collègues ont démontré que le recrutement des cellules T Foxp3+ par la tumeur ovarienne est médié par la chémokine CCL22 via son récepteur, CCR4, exprimé chez les cellules Treg (87). CCR4 est aussi le récepteur de CCL17. Il est donc possible que cette chémokine attire également les cellules Treg, cette hypothèse reste cependant à être prouvée. Cette étude est en corrélation avec une autre menée par Lee et ses collègues sur la tolérance aux allogreffes. Ces derniers ont démontré que la tolérance au niveau du greffon était médiée par CCL22 associée au recrutement de cellules Treg (124). Par ailleurs, nous savons que CCL22 est produite tant par les cellules tumorales que par l'environnement néoplasique, notamment par les macrophages. Plus précisément, CCL22 est reconnue pour être sécrétée par les macrophages de phénotype 2 (M2) (74, 90).

## CHAPITRE 3

### LE CANCER DE LA VESSIE ET LES TAM

#### 3.1 Le cancer de la vessie

Le cancer de la vessie est un des plus importants au Canada. En terme de nouveaux cas, cette maladie arrive au 4<sup>e</sup> rang chez les hommes et au 6<sup>e</sup> rang chez les femmes en 2006 (125). La prévalence de ce cancer, comme pour plusieurs autres types de cancer, augmente avec l'âge. À cause du taux élevé de récurrence de cette maladie (entre 50 et 80%), une surveillance accrue est nécessaire suite au diagnostique. En fait, en raison de cette récurrence élevée, le coût par patient du diagnostique jusqu'à la mort est le plus élevé de tous les cancers (entre 96 000\$ et 187 000\$), d'où la nécessité de trouver un traitement efficace qui pourrait diminuer ce taux de récurrence et les coûts encourus (126-128).

La vessie est un organe creux servant à emmagasiner l'urine temporairement. Elle est constituée de trois couches tissulaires. La couche entrant en contact avec l'urine est une muqueuse formée d'un épithélium transitionnel. La seconde membrane est une couche musculaire appelée musculature de la vessie. Enfin, la couche la plus externe est un adventice de tissu conjonctif, plus spécifiquement de muscle lisse. Cette troisième couche est absente de la face supérieure où elle est remplacée par le péritoine pariétal (129).

La majorité (70% à 80%) des cancers de la vessie nouvellement diagnostiqués sont classifiés comme étant superficiels. Les autres sont des cancers dits invasifs ou métastatiques (130). Les cancers superficiels de la vessie sont définis comme des tumeurs confinées aux deux premières membranes tissulaires, soient la muqueuse et la musculature de la vessie. Une tumeur superficielle présente dans la lumière de la vessie est dite papillaire. Une fois que la tumeur a atteint les muscles lisses de la troisième couche de tissu de la vessie, elle est considérée comme invasive (131).

Les tumeurs vésicales sont classées selon un système nommé tumeur-node-métastase (TMN) tenant compte du degré d'invasion du cancer. Les cancers superficiels de la vessie (SBC) sont classés en trois stades tels que présentés par le tableau 3.1 à la page suivante. Le stade Ta représente un papillome confiné à la muqueuse; le stade T1 consiste en un papillome envahissant la musculature alors qu'une tumeur *in situ*, c'est-à-dire fermée à la lumière de la vessie mais confinée à la muqueuse, est dite de stade Tis. Les tumeurs invasives sont classées selon cinq stades par ordre croissant d'invasion : T2, T3, T4, N+ et M+. Les tumeurs de stade T2 sont partiellement implantées dans la musculature alors que les tumeurs de stade M+ forment des métastases dans des organes distants de la vessie. Les tumeurs du cancer de la vessie sont également classées selon 3 grades relatifs aux caractéristiques cellulaires. Sommairement, le grade I consiste en des cellules bien différenciées avec une architecture globale proche du papillome et présentant peu de mitoses alors que le grade III est complètement à l'opposé (128).

L'incidence et le taux de mortalité du cancer de la vessie varient en fonction du pays, de l'ethnicité, du genre et de l'âge (132). Cependant, plusieurs facteurs de risques environnementaux et génétiques entrent en cause. Le facteur de risque environnemental le plus évident est incontestablement la cigarette. Celle-ci est attribuable à environ 50% des cas de cancer de la vessie chez les hommes et 25% chez les femmes (133). De plus, la cigarette est reconnue pour augmenter d'un facteur de trois le risque de développer un cancer de la vessie. D'autres facteurs de risques environnementaux ont été identifiés, entre autres les composés chimiques cycliques présents dans certains lieux de travail, comme le benzène, représentent 25% des causes de cancer de la vessie. Les personnes dont la profession les expose à des colorants, au caoutchouc, à des textiles, à la peinture et à du cuir ont un risque accru. Enfin, l'infection chronique de la vessie, ou cystite, est un autre facteur de risque environnemental du cancer de la vessie (134). En terme de facteurs génétiques, les hommes sont plus à risque que les femmes, indépendamment de la cigarette. Ainsi, la pathologie de ce cancer pourrait être génétiquement liée au sexe. Certaines études ont aussi démontré l'implication de gènes responsables du métabolisme de carcinogènes comme facteurs de risques. Ces gènes comprennent l'isoenzyme (CYP1A) et la glutathione transférase (135).

**TABLEAU 3.1**  
**Classement des tumeurs vésicales**

<b>Stade</b>	<b>Description</b>
<b>Cancer superficiel</b>	
Ta	Papillome confiné à l'urothélium et à découvert dans la lumière de la vessie
T1	Papillome envahissant la musculature
Tis	Tumeur fermée à la lumière de la vessie mais confinée à la musculature
<b>Cancer invasif</b>	
T2	T2a: la tumeur envahit la face interne de la couche de tissu conjonctif T2b: la tumeur envahit la 2e moitié de la couche de tissu conjonctif
T3	T3a: La tumeur envahit la couche lipidique après examen microscopique T3b: la tumeur envahit la couche lipidique après examen macroscopique
T4	T4a: La tumeur envahit la prostate, l'utérus ou le vagin T4b: La tumeur envahit le bassin ou l'abdomen
N+	La tumeur envahit un ganglion lymphatique avoisinant
M+	La tumeur forme des métastases et progresse dans un organe distant

Tiré de: (128)

Le symptôme le plus commun du cancer de la vessie retrouvé dans 85% des cas est l'hématurie, soit la présence de sang dans l'urine (130). De plus, les personnes atteintes de cancer de la vessie peuvent souffrir de dysurie (urination douloureuse) et présenter une augmentation de la fréquence de l'urination (132). Une pyélographie intraveineuse, consistant en un examen d'imagerie du système urinaire suite à l'injection d'un produit de contraste, et une cystoscopie, une procédure employant une



caméra insérée via l'urètre, permettent de déterminer la présence d'une tumeur au niveau de la vessie et la présence ou l'absence de métastases. Une biopsie peut être également nécessaire afin de bien définir le grade et le stade du cancer. Enfin, les résultats de ces examens permettent de déterminer le pronostic et d'établir les traitements appropriés (136).

Les buts du traitement d'une tumeur superficielle de la vessie sont de prévenir l'invasion et la progression de la tumeur, d'éviter la formation de métastases et l'ablation de la vessie puis ultimement, de prolonger la vie du patient. Le principal traitement dans le cas de SBC est la résection transurétrale qui consiste à insérer un tube par l'urètre afin de brûler la tumeur, soit par un courant électrique ou au laser (137). Si après la résection transurétrale la tumeur recroît rapidement, des traitements intravésicaux sont employés. Ces derniers impliquent l'administration d'agents immunothérapeutiques ou chimiothérapeutiques. Le traitement le plus commun comprend la bacille Calmette-Guérin (BCG) (138). L'introduction de ce bacille à l'intérieur de la vessie conduit à une réponse inflammatoire aiguë impliquant une cascade d'événements aux effets anti-tumoraux. La BCG interagit notamment avec la fibronectine afin d'induire l'expression de GM-CSF par les lymphocytes Th. L'effet anti-tumoral de la BCG est aussi corrélé par la présence d'IL-8 et de TNF- $\alpha$  ainsi que de leucocytes dans l'urine. Cependant, le mécanisme anti-tumoral de la BCG n'est pas complètement compris et est encore sous étude (139). Une rémission complète suite à l'instillation de la BCG est observée dans 70-75 % des cas (140). Les échecs relatifs à ce traitement peuvent être expliqués par le fait que la BCG n'induit pas l'activation des lymphocytes T cytotoxiques qui pourraient s'attaquer directement et spécifiquement aux cellules cancéreuses (141). De plus, un niveau élevé d'IL-10, inducteur des Th2 et des M2, est observé chez les patients ne répondant pas au traitement avec la BCG (142). Si la tumeur persiste toujours après les différents traitements, la cystectomie, soit l'ablation de la vessie, demeure le moyen radical le plus efficace afin d'enrayer la tumeur (130).

Enfin, si le cancer n'est pas soigné, le SBC peut envahir les autres couches tissulaires de la vessie. La masse tumorale invasive peut alors obstruer l'urètre et rendre

difficile l'urination. Éventuellement, les tumeurs invasives mènent à la formation de métastases et inévitablement à la mort (128).

### **3.2 Rôle des TAM dans le cancer de la vessie**

Il a été démontré que l'inflammation chronique de la vessie (cystite) peut dégénérer en cancer (128). Les macrophages, en tant que cellules inflammatoires, jouent un rôle important lors de ces inflammations chroniques (16). Cependant, les études portant sur l'implication des TAM dans le cas du cancer de la vessie sont peu nombreuses. Certaines études ont démontré que les tumeurs du cancer de la vessie sont hautement vascularisées. Il a été prouvé que l'angiogénèse causant cette vascularisation dépend de plusieurs facteurs angiogéniques sécrétés par les macrophages présents dans la tumeur (143-145). Afin de déterminer le pronostic chez des patients atteints de cancer de la vessie, Hanada et son équipe se sont penchés sur le nombre de macrophages présents dans les tumeurs plutôt que les techniques classiques servant à déterminer le grade et le stade de chaque tumeur (146). Leurs résultats ont démontré que la densité des macrophages est significativement plus élevée chez les tumeurs vésicales invasives que chez les tumeurs superficielles. De plus, la densité de TAM corrèle avec la densité de vascularisation (MVC de *microvessel count*) des tumeurs. Enfin, les patients comportant un niveau élevé de TAM ont présenté un faible pronostic comparativement aux patients avec un faible niveau de TAM. Une étude récente a révélé que certaines tumeurs du cancer de la vessie produisent CCL22 (147). Cette même étude a proposé que l'expression de cette chémokine attire les lymphocytes Th2 (CCR4+), ce qui inhiberait l'effet du traitement à la BCG, activatrice des Th1. L'attraction des Treg par CCL22 pourrait être également en cause. Cependant, la source qui induit l'expression de CCL22 par les cellules tumorales n'a pas été identifiée mais pourrait impliquer les macrophages. Malgré tous ces résultats, aucune étude n'a été faite sur l'implication spécifique des macrophages M1 ou M2 dans la progression tumorale du cancer de la vessie.

## CHAPITRE 4

### CD40

#### 4.1 Introduction au système CD40/CD154

Depuis sa découverte il y a plus de vingt ans, le complexe récepteur/ligand composé de CD40 et de CD40L (CD154, GP39) a reçu de plus en plus d'intérêt de la part de la communauté scientifique (1 publication en 1986 versus 594 en 2000). CD40 a été identifié initialement comme une molécule exprimée chez tous les stades de lymphocytes B alors que CD154 a été découvert tout d'abord à la surface des lymphocytes Th. Il est devenu évident par la suite qu'une multitude de cellules expriment CD40 ou CD154, conférant un large éventail de fonctions à ce couple de récepteur/ligand. L'observation majeure provient d'une étude sur l'expression de CD40 chez les CD. Sur les CD, CD40 semble avoir un rôle important dans la maturation de ces cellules en les rendant efficaces à présenter l'antigène. Ainsi, l'activation de CD40 par CD154 est impliquée dans l'amplification et la régulation de la réponse inflammatoire (148, 149). Enfin, les souris déficientes en CD40 ou CD154 présentent une diminution de leur capacité à différencier les cellules T CD4+ naïves.

#### 4.2 CD40 : régulation paracrine et autocrine

Bien que la découverte de CD40 ait été faite à la surface des lymphocytes B, CD40 est retrouvé chez plusieurs types de cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques incluant les lymphocytes T, les CD, les cellules épithéliales et les macrophages (148). Par immunobuvardage de type Western, CD40 apparaît selon trois protéines immunoréactives : une bande principale de 47 kDa, un produit de dégradation de 43 kDa et un dimère de 85 kDa (150). CD40 fait partie de la superfamille des récepteurs de TNF (151). La forme protéique de CD40, constituée de 277 acides aminés (a.a.), comprend une séquence signal de 22 a.a., une section extracellulaire de 171 a.a., un domaine transmembranaire de 22 a.a. et une partie cytoplasmique de 62 a.a. (152).

Bien que CD40 soit exprimé d'une façon constitutive sur la plupart des cellules, son expression peut tout de même être induite. Les stimuli qui induisent l'expression de CD40 incluent plusieurs cytokines, telles que IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$  et GM-CSF, ainsi que l'infection par le virus HIV (*human immunodeficiency virus*). Normalement, l'expression de CD40 est induite 6 à 12 heures après la stimulation, atteint son pic à 24 heures et persiste pendant 24 à 72 heures additionnelles. Cependant, très peu d'études ont analysé le mécanisme suivant l'activation génique de CD40. L'induction via IFN- $\gamma$  est celle qui a été le plus étudiée. La plupart de ces études ont démontré l'implication de certains STAT quant à l'expression du gène de CD40 chez la plupart des cellules analysées (148). Par exemple, dans les cellules musculaires lisses, l'expression du gène de CD40 requiert STAT-1 (153). Par contre, l'expression du gène de CD40 induit par TNF- $\alpha$  dans ces mêmes cellules est médiée par un autre facteur de transcription, soit NF- $\kappa$ B. De plus, Craxton et ses collègues ont démontré que l'induction autocrine de CD40 via la liaison de CD154 ne dépend pas de la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) p38, un médiateur activé par la plupart des autres inducteurs de CD40 (154). L'induction génique de CD40 par des cytokines pro-inflammatoires est régulée par plusieurs facteurs de transcription et requiert la synthèse de protéines. Par contre, l'inhibition de l'expression de CD40 par certaines cytokines, tels que TGF- $\beta$ , agit via l'augmentation de la dégradation de l'ARNm de CD40 plutôt que de directement agir sur les facteurs de transcription (155).

### **4.3 Signalisation via CD40**

Malgré le nombre considérable d'études ayant porté sur la transduction du signal initiée par l'activation de CD40, les voies de signalisation demeurent incomplètes et controversées. Cette controverse résulte du fait que la transduction du signal de CD40 varie en fonction du type de cellule, du degré de différenciation de la cellule et du stimulus (156). Par conséquent, ces observations devront être prises en considération pendant la lecture de cette section.

CD154 peut être exprimé à la surface des cellules en tant que complexe

hétéromultimérique (voir la section 4.4) (157). Cette propriété de CD154 conduit, lors de la liaison à son récepteur, à la dimérisation et dans certains cas, à la trimérisation de CD40. Reyes-Moreno et ses collaborateurs ont récemment démontré que la dimérisation de CD40 est impliquée dans la signalisation bidirectionnelle entre les cellules CD154+ et les cellules CD40+ (158). En effet, ils ont démontré, en employant des lymphocytes T CD154+ et des lymphocytes B CD40+, que l'induction de l'expression d'IL-2 des lymphocytes T par les cellules B nécessite la dimérisation de CD40. Une étude antérieure réalisée par le même groupe avait révélé que la dimérisation de CD40 est nécessaire à l'induction de l'expression d'IL-8 chez des cellules CD40+ (159). Il a aussi été démontré que cette oligomérisation de CD154 et de CD40 est cruciale quant à la transduction du signal de CD40. Par exemple, la dimérisation de CD40 chez les lymphocytes B est indispensable à l'induction de phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K), une protéine médiatrice de la voie de survie cellulaire Akt (protéine kinase B) (160).

Les premières études sur la signalisation de CD40 ont porté sur la phosphorylation du récepteur (161, 162). Ce dernier comporte deux déterminants majeurs de signalisation dans la région cytoplasmique. Ces sites de phosphorylation sont critiques à la transduction du signal puisqu'ils sont situés dans des régions où des protéines se lient à CD40 afin de transmettre ce signal (163). En tenant compte que le récepteur ne comporte aucune activité protéine-kinase, ces observations suggèrent une transduction du signal en deux temps : 1) l'activation de kinases/phosphatases distinctes du récepteur et/ou 2) l'association de régions particulières du domaine cytoplasmique avec des ligands intracellulaires (148, 164).

Alors que les résultats concernant l'identité des kinases/phosphatases activées suite à l'activation de CD40 chez les lymphocytes B sont controversés, les monocytes présentent des résultats faisant davantage l'unanimité. Dans les monocytes, la liaison de CD154 à CD40 induit la phosphorylation et l'activation de ERK1 et ERK2 (kinases-1 et -2 régulées par un signal extracellulaire) mais sans induire la phosphorylation d'autres MAPK telles que p38 et c-Jun N-terminale (JNK) (165). Cependant, il a été démontré récemment que l'activation de p38 via CD40 nécessite la présence d'IL-12 (166). Un

mécanisme semblable pourrait s'appliquer à JNK. En 1994, le facteur-3 associé au TNFR (TRAF-3) a été identifié en tant que première protéine associée avec le domaine cytoplasmique de CD40 (163). Ainsi, la région sur laquelle se lie TRAF-3 a été nommée domaine TRAF (167). La famille de protéines TRAF comprend 6 membres, de TRAF-1 à TRAF-6. Ces dernières possèdent, pour la plupart, une homologie dans le domaine TRAF c-terminal leur permettant une multimérisation. Toutes, exceptée TRAF-4, se lient directement ou indirectement à la région TRAF de CD40 (148). En somme, la liaison de CD154 à CD40 chez les monocytes/macrophages conduit à la dimérisation ou la trimérisation de CD40, un processus permettant l'oligomérisation des membres de TRAF avec le récepteur. Cette liaison des TRAF au récepteur induirait une cascade de kinases menant à l'activation des facteurs de transcription dont NF- $\kappa$ B, ERK1 et 2, p38 et JNK. De son côté, PI3K, activé par TRAF-6, induit l'activation d'une myriade de facteurs de transcription conduisant pour la plupart à la survie cellulaire (148, 168).

En plus des TRAF, plusieurs membres de la famille des STAT sont associés à la signalisation de CD40 (148). Cependant, l'activation des STAT chez les macrophages activés via CD40 n'a été démontrée que tout récemment, les résultats sont donc préliminaires (169). Les protéines STAT sont phosphorylées par la kinase Janus 3 (JAK-3), une protéine se liant au domaine cytoplasmique de CD40. Après avoir été phosphorylées, les différentes STAT s'assemblent pour former des complexes capables de traverser la membrane nucléaire et ensuite d'induire directement l'expression de plusieurs gènes (170).

#### **4.4 CD154**

CD154 appartient à la superfamille des TNF (151). La transcription de l'ARNm de CD154 aboutit à une protéine de 261 a.a.. Celle-ci est composée d'une longue section carboxy-terminale extracellulaire de 215 a.a, d'un domaine transmembranaire de 24 a.a. et d'une partie cytoplasmique de 22 a.a. (171). Comme la plupart des membres de la superfamille des TNF, CD154 forme des multimères à la surface cellulaire et se lie

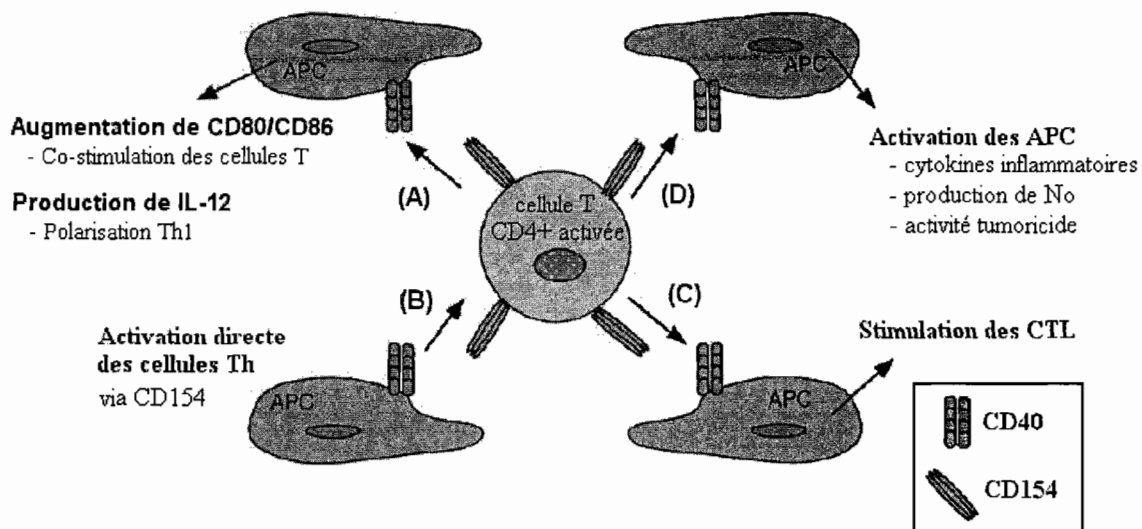
ainsi à son récepteur (172). La protéine membranaire monomérique de CD154 possède un poids moléculaire de 39 kDa. Cependant, trois formes solubles existent avec des poids moléculaires de 31, 18 et 14 kDa pouvant se lier les unes aux autres afin de former des complexes hétéromultimériques, majoritairement trimériques (157, 173). L'activation de CD40 par CD154 soluble trimérique est davantage efficace que celles induites par les formes dimériques ou monomériques (174). Les premières études de CD154 ont démontré l'expression de CD154 chez les lymphocytes T CD4+ matures seulement (175, 176). Par la suite, CD154 a été retrouvé à la surface de plusieurs types de lymphocytes dont les Th0, Th1, Th2, CD8+ (177, 178). En concordance avec ces observations, des cellules CD154+ ont été retrouvées dans la couche externe des centres germinatifs, dans la région inter-folliculaire riche en cellules T ainsi que dans le thymus (179, 180).

Bien que CD154 soit également exprimé par plusieurs types de cellules dont les monocytes, les macrophages, les cellules NK, les lymphocytes B, les plaquettes, les CD, les cellules épithéliales et endothéliales, les connaissances actuelles quant à la régulation de l'expression de CD154 découle de l'étude sur les lymphocytes Th (148). Contrairement à son récepteur, CD154 fait partie des protéines dites inductibles. Son expression est principalement induite par la signalisation découlant de l'activation du TCR (181). Autrement dit, l'expression de CD154 est induite chez le lymphocyte Th lorsque ce dernier rencontre l'antigène présenté par l'APC. Cependant, certaines cytokines pro-inflammatoires peuvent également induire l'expression de CD154: IL-1, TNF- $\alpha$  et IL-12 (182, 183). De plus, une étude a permis de constater une augmentation de l'expression de CD154 à la surface des lymphocytes Th suite à la liaison de CD40, ce qui démontre une régulation autologue (184). Enfin, TGF- $\beta$  et IFN- $\gamma$  inhibent la synthèse de l'ARNm de CD154 chez les lymphocytes T (177, 178). L'importance de CD154 dans l'activation des macrophages par les lymphocytes Th a été démontrée avec des souris déficientes en CD154. Ces souris présentent une réduction de leur capacité à activer les macrophages par les lymphocytes Th (185).

#### 4.5 Rôle du système CD40/CD154 dans la réponse inflammatoire

Un rôle important de CD40 dans l'inflammation est l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion des cellules endothéliales (CD40+) activées par les lymphocytes Th (CD154+) (186). Il a été démontré que cette augmentation de l'expression des molécules d'adhésion chez les cellules endothéliales pourrait permettre une extravasation des leucocytes au travers des parois des vaisseaux vers le site d'inflammation (187). Dans cette section-ci, nous nous intéresserons plus spécifiquement au rôle de l'activation de CD40 chez les monocytes/macrophages. Ainsi, la liaison de CD154 à son récepteur sur le macrophage induit chez celui-ci l'expression de molécules co-stimulatrices dont la molécule-1 d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1), le facteur-3 associé aux fonctions des lymphocytes (LFA-3), B7-1 et B7-2. Ces molécules permettent aux monocytes d'adhérer plus efficacement aux parois des vaisseaux sanguins, ce qui augmente leur extravasation vers le site inflammatoire. De plus, certaines molécules co-stimulatrices comme B7-1 et B7-2 facilitent l'activation des lymphocytes Th (148, 149). L'interaction CD40/CD154 est très importante lorsque le lymphocyte Th se lie, via son TCR, à l'antigène présenté par le macrophage et active celui-ci. Cette interaction est bidirectionnelle puisque le changement de phénotype induit chez le macrophage influencera celui du lymphocyte Th (voir la figure 4.1) (188). L'interaction CD40/CD154 entre les macrophages et les lymphocytes Th permet principalement d'augmenter et de prolonger la réponse inflammatoire. Notamment, l'activation de CD40 chez les macrophages induit l'expression d'IL-12 (189). Cette interleukine, nous l'avons vu dans le chapitre 2, induit le phénotype pro-inflammatoire de type I au lymphocyte Th. De plus, tel que mentionné précédemment, IL-12 induit l'expression de CD154 chez les lymphocytes T (183). L'activation de CD40 chez les macrophages induit également l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  et - $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$  et IL-10 (190). L'induction de ces cytokines peut être influencée par: 1) le niveau d'expression de CD154 et CD40; 2) la présence ou l'absence de molécules (membranaires ou solubles) co-stimulatrices (191).





**FIGURE 4.1: Rôle du système CD40/CD154 dans les interactions lymphocytes Th/APC. (A) L'activation de CD40 chez les APC induit l'expression de CD80 et CD86 et la production d'IL-12. CD80 et CD86 augmentent la co-stimulation des lymphocytes T alors que IL-12 induit le phénotype Th1. (B) L'interaction CD40/CD154 active directement le lymphocyte T. Ceux-ci produisent alors des cytokines inflammatoires et leur survie est prolongée. (C) Les APC activés via CD40 induisent l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. (D) L'activation de CD40 chez les APC induit la production de plusieurs médiateurs inflammatoires. (A,B,C,D) Les mécanismes impliqués dans les différents effets présentés ne sont cependant que partiellement définis.**

Tiré de: (149)

En plus d'augmenter la réponse inflammatoire via l'induction de facteurs pro-inflammatoires, le système CD40/CD154 permet de prolonger la survie non seulement des macrophages, mais également des lymphocytes Th (188, 192). Une étude a démontré que les monocytes peuvent échapper à l'apoptose via la stimulation par IL-1 et TNF- $\alpha$ , ceux-ci étant produits, entre autres, via l'activation de CD40 (193). Cependant, cette induction d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  dépend de la maturation des monocytes, puisque les macrophages sont plus sensibles à cette activation de CD40 que les monocytes (194). Ainsi, il reste à déterminer si le prolongement de la durée de vie des macrophages via CD40 provient d'une stimulation autocrine par IL-1 et TNF- $\alpha$  et/ou de l'activation de gènes ou de protéines anti-apoptotiques. Il a été démontré que l'activation de CD40 chez

les APC est cruciale dans le processus d'activation des lymphocytes T cytotoxiques. Par contre, les mécanismes régulant cette stimulation ne sont pas encore définis (149). Enfin, l'activation des macrophages via CD40 induit l'expression de COX-2 et la production de PGE2. Il a été démontré que la production de COX-2 par les macrophages activés par CD154 est médiée par les kinases ERK1/2 et p38 (195).

Suite à l'attraction des macrophages au site inflammatoire, ceux-ci peuvent être activés afin d'exercer leurs fonctions cytotoxiques. Ces fonctions s'effectuent entre autres par l'activation des macrophages via CD40 par les lymphocytes Th. L'interaction CD40/CD154 induit notamment la production de NO par les macrophages. Cette production de NO par les macrophages augmente leur capacité cytotoxique puisque le NO est un puissant agent microbicide (196). L'activation de CD40 chez les macrophages induit aussi la production de MMP dont MMP-1 et MMP-9. Cette production de MMP via l'activation de CD40 pourrait faciliter la digestion de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi la migration des leucocytes et l'angiogénèse. La découverte récente de deux autres ligands de CD40, C4BP et HSP70, ajoute au potentiel d'activation de CD40 et présente d'autres mécanismes possibles à l'induction de l'inflammation (197, 198).

#### **4.6 CD40 et les macrophages M1 et M2**

Très peu d'études se sont penchées sur le rôle de CD40 chez les macrophages M1 et M2 spécifiquement. Cependant, la plupart des effets mentionnés précédemment concernant les fonctions de CD40 chez les macrophages peuvent être attribués aux macrophages M1, représentant la voie classique de l'activation des macrophages. Les M1 expriment davantage CD40, conséquence dérivant du fait qu'ils sont activés via IFN- $\gamma$  et LPS, deux molécules inductrices de CD40 (199, 200). L'expression de CD40 est reconnue pour être moins importante chez les M2 (77). Cette diminution de l'expression peut être attribuée à IL-4 et IL-10 puisqu'ils inhibent l'induction des gènes régulés par IFN- $\gamma$ , tel que CD40, dans les monocytes (201, 202). De plus, une étude a démontré qu'un pré-traitement des monocytes avec IL-4 et IL-10 individuellement

inhibe l'activation des kinases ERK1 et 2 médiée par CD40. Ensemble, IL-4 et IL-10 inhibent davantage cette activation (165). Cette étude a aussi démontré que l'expression d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  diminue suite à l'inhibition de la phosphorylation des kinases ERK1 et 2 chez les macrophages activés via CD40 et pré-stimulés par IL-4 et IL-10. IL-4 et IL-10 inhibent aussi la synthèse de PGE2 et la production de COX-2 chez les macrophages stimulés par CD154 en empêchant l'activation des kinases ERK1/2 (IL-4 et IL-10) et p38 (IL-10). De plus, Inoue et ses collègues ont prouvé que IL-10 inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B des macrophages activés via CD40 (195). Enfin, une étude menée par Ito a démontré que IL-10 supprime la phosphorylation de STAT-1, un facteur de transcription impliqué dans le signal intracellulaire médié par CD40 (202). En somme, IL-4 et IL-10 inhibent partiellement l'expression et la signalisation de CD40 rendant moins efficace l'activation des macrophages M2 via CD40.

#### **4.7 Activité anti-tumorale des macrophages suite à l'activation de CD40**

Plusieurs études ont associé une surexpression et une suractivation du système CD40/CD154 à plusieurs processus pathologiques faisant de ce celui-ci une cible pharmacologique potentielle. Certaines maladies auto-immunes sont associées à une réponse inflammatoire persistante impliquant CD40. Ces maladies sont le lupus néphritis, le lupus érythématosus, certaines formes d'arthrite et les scléroses multiples (148). Les principales cytokines induites par CD40 impliquées dans la progression de ces maladies auto-immunes sont IL-12 et TNF- $\alpha$  (203, 204). Cependant, malgré ces effets négatifs sur la progression de maladies auto-immunes, plusieurs études confèrent au système CD40/CD154 une activité immunitaire anti-tumorale (205). Certaines études suggèrent même que l'interaction CD40/CD154 est nécessaire à l'induction de l'immunité anti-tumorale (206, 207). En 1993, Alderson et ses collègues ont démontré que des monocytes stimulés par CD154 présentent une activité tumoricide amplifiée (200). Cependant, ils n'ont pu établir quels facteurs induisent cet effet tumoricide des macrophages activés via CD40. En 1999, Imaizumi et son équipe ont déterminé certains de ces facteurs dans une étude presque identique à celle d'Alderson (208). Il a été démontré, *ex vivo*, que l'effet anti-tumoral des macrophages alvéolaires activés via

CD40 provient notamment de la production de NO et de TNF- $\alpha$ . Il est proposé que l'effet anti-tumoral de NO provienne de dommages portés à l'ADN causant ainsi une accumulation de p53, ce qui induit l'apoptose. L'effet tumoricide de TNF- $\alpha$  peut provenir de son effet cytotoxique sur l'endothélium vasculaire des tumeurs. Cependant, des effets pro-tumoraux sont aussi conférés à TNF- $\alpha$  et NO dans certaines formes de cancer, d'où l'importance d'étudier l'implication de ces facteurs dans la progression ou la régression tumorale spécifiquement pour chaque type de cancer (209, 210). Plusieurs autres facteurs anti-tumoraux peuvent être produits par les macrophages activés via CD40 et impliquent d'autres cellules immunitaires. L'analyse du mécanisme anti-tumoral médié par ces facteurs nécessite cependant des études *in vivo* plus élaborées. Néanmoins, il est proposé que la production d'IL-12 par les macrophages activés via CD40 induit les cellules NK à lyser les cellules tumorales (206). De plus, IL-12 participe au développement des lymphocytes Th1, lesquels sont d'importants inducteurs de l'immunité cellulaire et considérés comme anti-tumoraux (211). Par contre, aucune étude ne tient compte du fait que les macrophages activés via CD40 produisent IL-8. Ce dernier, en induisant l'attraction de certains leucocytes dans le site néoplasique, pourrait faciliter la migration des cellules tumorales suite à la dégradation de la matrice extracellulaire provoquée par le passage des leucocytes (212). De plus, IL-8 est un important facteur angiogénique. Les macrophages activés par CD154 expriment aussi IL-1, IL-6, IL-10 et COX-2. Ces derniers, nous en avons discuté dans les sections précédentes, possèdent tous certaines propriétés pro-tumorales.

Malgré les effets anti-tumoraux attribués au système CD40/CD154, certaines observations suggèrent une implication potentielle de ce système dans l'angiogénèse et l'invasion tumorale. Il est reconnu que IL-8 induit l'expression de MMP-2 chez les cellules tumorales (213); que TNF- $\alpha$  et MIP-1 $\alpha$  induisent l'expression de MMP-9 chez les monocytes/macrophages (93) et que IL-1 $\beta$  induit l'expression de MMP-9 chez plusieurs types de cellules tumorales (214). En raison de leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire, les MMP, spécialement MMP-2 et MMP-9, jouent un rôle important dans l'angiogénèse, la croissance tumorale et la formation de métastases (215). De plus, COX-2, dont l'expression est induite chez les macrophages activés via

CD40, participe notamment à la synthèse de PGE2, un important inducteur angiogénique (195, 216, 217). PGE2 stimule directement l'angiogénèse en plus d'augmenter l'expression de VEGF, un important facteur angiogénique (217). D'ailleurs, une étude récente a démontré que l'interaction CD40/CD154 induit une activité angiogénique via la production de VEGF (218). Enfin, l'activation de CD40 induit l'expression de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) via l'activation de PI3K et NF- $\kappa$ B (219). Il est proposé que uPA soit impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire via l'activation de certaines MMP, dont MMP-9 (220). Il a été démontré que cette enzyme est capable d'induire l'angiogénèse, l'invasion tumorale et la formation de métastases (80). Certaines études ont démontré la production de uPA par les TAM dans plusieurs types de cancers (221, 222). En regard de ces résultats, le système CD40/CD154 impliquant les macrophages et les lymphocytes Th augmente la cytotoxicité tumorale des macrophages mais confère à ces derniers certaines propriétés pro-tumorales. Celles-ci sont notamment de favoriser l'angiogénèse et l'invasion tumorale.

#### **4.8 Traitements anti-tumoraux : activation de CD40 chez les macrophages**

Il est proposé que le transfert du gène de CD154 à l'intérieur de cellules tumorales puisse induire l'activité tumoricide des macrophages. Une étude à ce sujet a démontré que le transfert des gènes de CD154 et d'IFN- $\gamma$  à l'intérieur de cellules tumorales du cancer du poumon induit la production de NO, TNF- $\alpha$  et IL-12 ainsi qu'une activité tumoricide des macrophages alvéolaires (208). Il a été démontré que la fonction première d'IFN- $\gamma$  était d'augmenter l'expression de CD40 chez les macrophages et ainsi faciliter les interactions CD40/CD154. Les auteurs de cette étude ont aussi remarqué que des lymphocytes Tc spécifiques des cellules tumorales sauvages (CD154-) étaient produits lors de la coincubation de cellules tumorales CD154+ avec des cellules de la rate, un organe lymphoïde. Il a été proposé que les macrophages ou toute autre APC activée via CD154 par les cellules tumorales transfectées présentent davantage d'antigènes tumoraux aux lymphocytes Tc et induisent ainsi une réponse anti-tumorale médiée par ces lymphocytes. Buhtoiarov et ses collègues ont démontré, chez

des souris, que les macrophages activés directement par un anticorps anti-CD40 médient, *in vitro*, la destruction de cellules tumorales par apoptose (223). Une autre étude a démontré que la liaison d'un anticorps bloquant à CD154 inhibe la formation d'une réponse immunitaire protectrice médiée par certains traitements employant des vaccins de tumeurs irradiées (224). Un résultat semblable fut observé lors de cette même étude avec des souris déficientes en CD40 comparativement aux souris CD40+. La capacité des souris CD40- ou traitées avec anti-CD154 à générer une réponse immunitaire protectrice anti-tumorale suite aux différents vaccins de tumeurs irradiées fut restaurée par l'injection d'IL-12, une cytokine produite par les macrophages activés via CD40. Enfin, Nakajima et son équipe ont démontré une régression importante de tumeurs composées de cellules transfectées avec le gène de CD154 comparativement à des tumeurs composées de cellules du phénotype sauvage (206). De plus, ils ont démontré que cette régression était médiée par les cellules NK et dépendait de la production endogène d'IL-12. Ils ont aussi prouvé la formation d'une activation des cellules T CD8+ (Tc) médiée contre les cellules transfectées avec CD154 et dépendante de B7. Comme les cellules tumorales n'expriment pas B7 et IL-12, les auteurs ont proposé une contribution importante des APC (dont les macrophages) activés.

La totalité des résultats présentés dans ce sous-chapitre relèvent d'études fondamentales. Malheureusement, aucun résultat clinique n'est actuellement disponible. Certains aspects restent à être analysés. L'un d'entre eux est sans aucun doute l'étude de l'invasion des cellules tumorales stimulées par des macrophages activés via CD40. En effet, tel que décrit précédemment, ceux-ci produisent certaines métalloprotéases qui pourraient favoriser la migration des cellules tumorales.

## CHAPITRE 5

### PROJET DE RECHERCHE

#### 5.1 Problématique et hypothèses

Tel que décrit dans les chapitres précédents, le cancer de la vessie est associé à l'extravasation de macrophages au site tumoral, d'où leur appellation de TAM (146). Des études suggèrent que ces TAM présenteraient un phénotype semblable aux macrophages de type 2 (M2) (81). Selon la littérature, les macrophages M2 présentent un profil davantage pro-tumoral étant donné leurs fonctions liées à l'angiogénèse et à la réparation des tissus. Les macrophages M1, au contraire, sont considérés comme anti-tumoraux puisqu'ils induisent la réponse inflammatoire et sont davantage cytotoxiques que les M2 (74). Tous ces macrophages expriment à leur surface CD40, une glycoprotéine de la famille des récepteurs des TNF. Découvert initialement à la surface des lymphocytes B, CD40 a longtemps été le sujet d'études concernant l'immunité humorale. Cependant, depuis une dizaine d'années, CD40 est maintenant reconnu pour son implication dans la réponse à médiation cellulaire et est considéré comme un puissant activateur des macrophages (191).

La présence persistante des TAM cause une inflammation chronique, associée à la progression de plusieurs types de cancer, dont celui de la vessie. Bien que les macrophages M1 soient considérés comme anti-tumoraux, plusieurs facteurs pro-inflammatoires exprimés par ceux-ci sont reconnus pour avoir certaines fonctions pro-tumorales (10). Notamment, les macrophages M1 expriment TNF- $\alpha$  et IL-8, inducteurs de MMP (93, 213). Ces dernières sont d'importants agents dégradant la matrice extracellulaire impliqués dans l'invasion et la progression tumorale (215). De plus, CD40 est un important médiateur de l'inflammation reconnu pour son implication dans le développement de certaines maladies chroniques inflammatoires et du cancer (148, 191). Cependant, l'interrelation entre l'activation de CD40, le caractère pathogénique des TAM et la progression tumorale n'a pas encore été établie. Nous suggérons que les

macrophages activés, de phénotype 1 autant que de phénotype 2, expriment des facteurs leur conférant certaines fonctions pro-tumorales. De plus, nous proposons que l'activation de CD40 chez les macrophages M1 et M2 pourrait influencer les interactions paracrines entre ces macrophages et les cellules du cancer de la vessie T24.

Les travaux réalisés ces dernières années sur la polarisation des macrophages ont démontré qu'il est possible de créer *in vitro* des macrophages de phénotype 1 et 2. Il est ainsi possible de différencier des macrophages selon le phénotype 1 en les stimulant avec IFN- $\gamma$  et LPS et selon le phénotype 2 en les incubant en présence d'IL-4 et d'IL-10 (76). Cette approche nous permettra d'obtenir deux modèles de macrophages appropriés pour l'étude des interactions paracrines entre ces macrophages et les cellules tumorales ainsi que du rôle de CD40 dans la progression tumorale.

## 5.2 Objectifs et méthodologie

Ce projet de recherche comprend deux objectifs :

1. Tester l'effet des macrophages de type M0 (contrôles), M1 ou M2 sur la prolifération et l'expression de facteurs pro-tumoraux par les cellules T24.
2. Évaluer l'impact de l'activation via CD40 des macrophages de type M0, M1 ou M2 sur l'invasion tumorale et l'expression de facteurs pro-tumoraux chez les cellules T24.

Ces objectifs ont été réalisés suite à la stimulation des cellules T24 avec du milieu conditionné provenant de macrophages polarisés activés ou non via CD40. La caractérisation des macrophages polarisés a été réalisée par les techniques d'immunobuvardage de type Western, de transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR de *reverse transcription-polymerase chain reaction*) et d'analyses par cytomètre en flux. L'analyse des cellules T24 a été effectuée par RT-PCR, pour l'analyse de l'expression de facteurs pro-tumoraux par les cellules T24, et par des tests de prolifération au 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) et d'invasion pour l'analyse de la prolifération et de l'invasion des cellules T24.

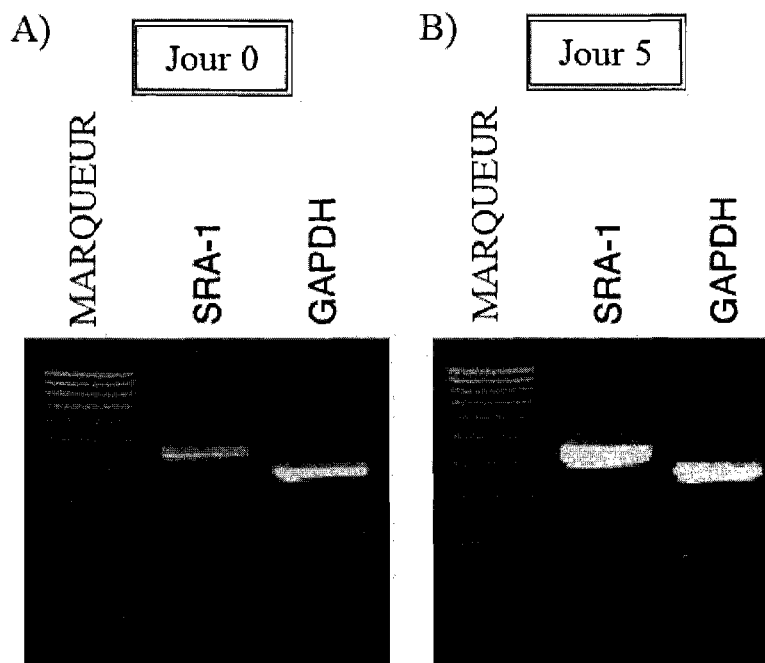


### 5.3 Monocytes isolés du sang périphérique et THP1

Les monocytes isolés du sang périphérique sont utilisés depuis plusieurs années pour la recherche scientifique nécessitant l'utilisation de macrophages différenciés. La technique que nous avons utilisée pour extraire et isoler les monocytes du sang périphérique est récente et présente une pureté et un rendement intéressants. En effet, il est reconnu que la technique de Double Densité utilisant une solution de Ficoll et une solution iso-osmotique de 46% de Percoll donne un rendement de 75 à 205 millions de monocytes pour 300-360 ml de sang avec une pureté moyenne de 90,6% pouvant atteindre 95% (225). De plus, cette technique permet d'obtenir des monocytes susceptibles d'être activés en macrophages par la simple adhésion à la paroi des plaques de culture. Cette différenciation a été démontrée par l'expression du récepteur-1 "séquestreur" de classe A (SRA-1), une protéine fortement exprimée par les macrophages matures, davantage présents chez les monocytes/macrophages mis en culture pendant 5 jours (figure 5.1) (225, 226). Seager Danciger et son équipe ont démontré que les monocytes extraits par la méthode Double Densité peuvent répondre à plusieurs stimuli et être différenciés en macrophages ou en CD. Ainsi, les monocytes isolés par cette technique pourront être différenciés en macrophages M1 et M2. Nous avons démontré que les monocytes extraits par la technique Double Densité expriment à leur surface un niveau basal de CD40, ce qui en fait un excellent modèle d'étude de l'implication de CD40 chez les macrophages dans la progression tumorale.

De plus, afin de différencier les monocytes en macrophages, nous avons stimulé les monocytes avec M-CSF, une cytokine dont dépendent les macrophages pour leur développement *in vitro* et *in vivo* (227).

Nous avons également utilisé les monocytes de la lignée cellulaire THP1 afin de démontrer la différenciation des monocytes en macrophages véhiculée par M-CSF. Les THP1 sont une lignée de monocytes provenant d'un garçon atteint de leucémie et sont reconnus pour être un excellent modèle d'étude (228).



**FIGURE 5.1: Différenciation des monocytes en macrophages par adhésion en plaque. Comparaison relative de l'expression de SRA-1, un récepteur "séquestreur" davantage exprimé par les macrophages matures, détecté par RT-PCR. (A) Les monocytes fraîchement isolés. (B) Les monocytes/macrophages mis en plaque pendant cinq jours. L'augmentation de SRA-1 chez ces derniers démontre leur différenciation en macrophages. GAPDH sert de témoin interne pour démontrer l'uniformité du dépôt d'ARN dans les puits.**

Tiré de : (225)

#### 5.4 Lignée cellulaire T24

La lignée cellulaire T24 est utilisée depuis plus de 40 ans comme modèle du cancer de la vessie. Cette lignée provient d'une femme caucasienne de 81 ans et surexprime l'oncogène H-ras. Les cellules T24 dérivent d'une tumeur superficielle de stade Ta et de grade I, donc non-invasive (229). Ainsi les T24 possèdent un profil intéressant afin de tester l'invasion tumorale. D'ailleurs, une étude a démontré que les cellules T24 présentent un phénotype non-malin puisqu'elles sont incapables de former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéficientes (230). De plus, leur caractère bénin permet de détecter plus facilement toute induction artificielle de gènes pro-tumoraux. Par conséquent, les T24 possèdent tous les éléments essentiels

pour étudier la modification du niveau d'invasion tumorale et de l'expression de gènes pro-tumoraux, ce qui en fait un excellent modèle pour nos recherches.

## CHAPITRE 6

### CORPS DU TRAVAIL

#### 6.1 Résumé de l'article

Les macrophages (MØ) infiltrant la tumeur (TAM) sont reconnus pour produire plusieurs facteurs favorisant la croissance tumorale. Cependant, le mécanisme impliqué dans l'activation de ces MØ et menant à la survie des cellules néoplasiques, à leur prolifération et à une invasion locale de celles-ci reste à être établi. Les lymphocytes Th (CD154+) induisent l'activation des MØ (CD40+) via une interaction ligand/récepteur impliquant CD154 et CD40 respectivement. Cette liaison est l'élément clé conduisant à l'inflammation induite par les MØ et au développement de certaines maladies auto-immunes et/ou inflammatoires. Dans ce contexte, nous proposons que l'activation des MØ via CD154 influence les interactions paracrines entre les MØ et les cellules tumorales. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons stimulées des cellules néoplasiques avec du milieu conditionné (M.C.) préparé à partir de cultures de MØ, polarisés selon le phénotype M1 (pro-inflammatoire) ou M2 (anti-inflammatoire), et activés ou non via CD40. Nos résultats démontrent que les M1 expriment à leur surface une plus grande quantité de CD40 que les M2. De plus, nous avons constaté que bien que le M.C. des M1 diminue la prolifération tumorale, il induit l'expression de facteurs pro-tumoraux par les cellules cancéreuses : COX-2, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF et MCP-1, tous reconnus pour promouvoir la progression des tumeurs, notamment celles de l'utérus, des ovaires et de la vessie. Au contraire, les facteurs solubles produits par les M2 augmentent la prolifération tumorale. De plus, le M.C. de M1 activés avec CD154 induit l'invasion tumorale alors que le M.C. de M2 activés via CD40 induit l'expression de certains gènes pro-inflammatoires par les cellules néoplasiques (COX-2, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, MCP-1). En somme, ces résultats suggèrent que tant les M1 que les M2 participent à la croissance néoplasique. De plus, les MØ polarisés sont sensibles à l'activation via CD40 en induisant l'expression de facteurs pro-tumoraux par les cellules cancéreuses de même que l'invasion tumorale.

## 6.2 Contribution des auteurs

Tony Maurais a réalisé la presque totalité des expériences présentées dans ce travail de recherche. Mathieu Dufresne a contribué à la production des figures 3, 5 et 6 de l'article scientifique. La supervision du travail en laboratoire de Tony Maurais ainsi que la conception du projet d'étude ont été réalisées par le directeur de recherche Carlos Reyes-Moreno, Ph. D.. Tony Maurais et Carlos Reyes-Moreno ont collaboré afin de réaliser l'article scientifique présenté dans le présent mémoire.

## 6.3 Article scientifique

### **Paracrine interactions between macrophages and tumor cells: activation of the CD40/CD154 system modulate pro-tumor factors expression and tumor invasion**

TONY MAURAI<sup>1</sup>, MATHIEU DUFRESNE<sup>1</sup>, MARC POULIOT<sup>2</sup>, ERIC ASSELIN<sup>1</sup>  
AND CARLOS REYES-MORENO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Du Groupe de Recherche en Biopathologies Cellulaires et Moléculaires (GRBCM), Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7; <sup>2</sup> Du Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie (CRR), Université Laval, Québec City, Québec, Canada. G1V 4G2

Corresponding author: Carlos Reyes-Moreno, Ph. D.

Département de Chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boulevard des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Canada G9A 5H7

Tel : (819) 376-5011 Ext.: 3308

E-mail: Carlos.Reyes-Moreno@uqtr.ca

## SUMMARY

It has long been recognised that leukocytes infiltrate neoplastic tissues. Tumor-associated-macrophages (TAM), the major components of the leukocytes infiltrate in virtually all solid tumors, are supposed to be a polarized M2 macrophage (MØ) population. M2 MØ promote angiogenesis and tissue remodeling/repair while M1 MØ are potent effector cells which produce copious amounts of pro-inflammatory cytokines and kill microorganisms as well as tumor cells. CD40, a member of the tumor necrosis factor receptor family, is an important macrophage activator and a key factor of many autoimmune and inflammatory human diseases including cancer. However, the interrelation between CD40 activation, MØ pathogenic function and neoplastic progression is not yet established. Moreover, many studies have shown that chronic inflammation is involved in tumor promotion and progression. Thus, we propose that M1 MØ, as well as M2 MØ, produce pro-tumor factors which promote tumor growth and progression. We also suggest that CD40 activation is important for the paracrine interactions between MØ and bladder tumor cells. Our objective is to define the effects of factors from polarized macrophages on proliferation, invasion and pro-tumor factors production of bladder tumor cells. We have also as objective to define the implication of CD40 activation in the pathogenic behaviour of MØ in interaction with tumor cells. Our data show that MØ induce the expression of several factors by bladder tumor cells known to promote tumor progression in many cancers, including bladder cancer. These factors include cyclooxygenase (COX)-2, by T24 stimulated with conditioned media (CM) from M1, and CCL22, by T24 stimulated with CM from M2. Results also demonstrate that CD40-activated M2 significantly up-regulate the expression of some pro-tumor factors by T24 cells, like tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-8. We have also shown that CD40-activated M1 increase tumor cell invasion. This study demonstrates the implication of M1 as well as M2 in the induction of pro-tumor factors by tumor cells. Moreover, our results show an implication of CD40 in the induction of tumor invasion and the production of pro-tumor factors.

**Keywords:** CD40, TAM, cancer, paracrine interactions, inflammation, tumor progression, bladder, macrophages, leukocytes, invasion.

## INTRODUCTION

Chronic inflammation has been associated to cancer development since more than one hundred years. The inflammatory cells found in neoplastic tissues can contribute to tumour progression and growth as well as immunosuppression (1, 2). In fact, the tumour microenvironment defines the leukocyte network therein. In response to tumor microenvironment, leukocytes can kill tumor cells or help them to growth and to become more invasive. As a general concept, the type of inflammatory mediator present in the tumor microenvironment will determine whether tissue leukocytes will be able to mount an anti-tumor immune response or favour tumor promotion (3, 4). The pro-inflammatory cytokines found in neoplastic tissues not only come from leukocytes, but also from tumor cells themselves (5). Tumour-associated macrophages (TAM) are the major component of the tumour infiltrating leukocytes (6). TAM have been found in many cancer types, including those of breast, cervix, and bladder, where they have been associated with poor prognosis (7). It is proposed that TAM are a polarized M2 MØ population (8). M2 MØ tune inflammatory responses, scavenge debris, promote angiogenesis as well as tissue remodelling and repair. On the contrary, M1 MØ are generally considered as effector cells killing micro-organisms and tumor cells and producing high amounts of pro-inflammatory cytokines (9). However, some studies have also proved that those pro-inflammatory cytokines contribute to tumor promotion and progression (10-12).

CD40, a member of the TNF receptor family, is an important monocyte/macrophage activator and an inflammatory mediator (13). The natural ligand of CD40, CD154, is primarily expressed at the surface of Th lymphocytes. CD40 activation by CD154 maintains the inflammatory response through pro-inflammatory cytokine induction and the augmentation of macrophage and Th lymphocyte survival (14-16). The interaction of CD40 with its ligand is implicated in some autoimmune and cardiovascular diseases as well as cancer (17). It is proposed that constitutive CD40 activation contributes to oncogenic effects, like tumor cell proliferation, motility and invasion (18). Biological responses following CD40 activation implicates many

signalling molecules including TNF receptor-associated factors (TRAF) proteins, mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38, extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1 and ERK2 as well as some transcription factors such as nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and signal transducers and activators of transcription (STAT) (19). Anti-inflammatory factors involved in M2 polarization, such as IL-4 and IL-10, are known to inhibit many of these signalling proteins as well as CD40 expression. Moreover, interferon (IFN)- $\gamma$ , which induces M1 polarization, also induces CD40 expression (8, 13, 20-22). These observations indicate a link between CD40 and macrophage polarization. However, the interrelation between CD40 activation, pathogenic function of TAM and tumor progression has not been studied in detail.

We suggest that M1 M $\emptyset$ , as well as M2 M $\emptyset$ , produce several soluble factors known to promote tumor progression. Moreover, we propose that CD40/CD154 dyad modulates paracrine interactions between M $\emptyset$  and neoplastic cells. In this way, we have investigated M1 and M2 M $\emptyset$  effects on the proliferation and pro-tumor factors expression on bladder tumor cells. We also studied the effects of M $\emptyset$ -CD40 activation on bladder tumor cell invasion and pro-tumor factors expression. Our premise is based on the fact that bladder cancer is one of the diseases most associated to M $\emptyset$  infiltration where they are correlated with poor prognosis (23).

Many studies have demonstrated that monocytes extracted from blood can be differentiated using factors specific to M1 or M2 polarization (8). Then, monocytes extracted from peripheral blood were differentiated *in vitro* into an M1 or M2 M $\emptyset$  phenotype. We have stimulated T24 cells, a bladder cancer cell lineage, with conditioned media (CM) collected from M1 or M2 M $\emptyset$  that were activated or not with CD154. We have then used the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay, the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and an invasion assay to study proliferation, pro-tumor factors expression and invasion of T24 bladder cancer cells respectively.

We report here that M2 M $\emptyset$  increase proliferation of T24 cells while M1 M $\emptyset$  up-



regulate pro-tumor factors expression in T24 cells. These factors include cyclooxygenase (COX)-2, IL-6, IL-8, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), TNF- $\alpha$  and the macrophage chemotactic protein (MCP)-1, all well known for their implication in the progression of many cancer types (1, 3, 24, 25). Moreover, CD40-activated M1 M $\phi$  significantly increased invasion of T24 cells. On the other hand, CD40-activated M2 M $\phi$  increased pro-tumor factors expression in T24 cells. Taken together, these results suggest, in our *in vitro* model of co-culture macrophages/tumor cells, that CD40-activated macrophages can increase tumor invasion and pro-tumor factors expression in tumor cells.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Material**

Blood was obtained from normal volunteers at the Centre Hospitalier Régional de Trois-Rivières (CHRTR, Trois-Rivières, PQ, Canada). T24 bladder cancer cells and monocytic THP1 cells were purchased from ATCC (Rockville, MD, USA). The mouse mAbs directed against CD40 (G28.5, IgG1) and human major histocompatibility complex (MHC) class II (L243, IgG1), as well as LTK and LTK-CD154 cells were generously given by Dr Walid Mourad (Laval University, Québec city, PQ, Canada). An irrelevant IgG1 isotype control directed against the superantigen staphylococcal enterotoxin A (anti-SEA) was used for flow cytometry analysis. The mouse mAbs directed against CD14, CD16 and CD68 were acquired from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), Caltag Laboratories (Bullingame, CA, USA) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Ca, USA). The goat anti-mouse IgG, the goat FITC- and the HRP-conjugated anti-mouse IgG as well as the ChromePure Human IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Macrophage colony stimulating factor (M-CSF), IL-4 and IL-10 were acquired from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) and IFN- $\gamma$  from R&D systems. Lipopolysaccharide (LPS) was generously given by Dr Hélène-Marie Therrien (UQTR, Trois-Rivières, PQ, Canada). Cell culture agents and electrophoresis grade chemicals were purchased from

Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). PCR primers were purchased from Life Biotechnologies (Burlington, ON, Canada). Taq DNA polymerase and M-MLV reverse transcriptase were acquired from New England Biolabs (Mississauga, ON, Canada) and all other RT and PCR products were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). All cell culture media, serum and reagents were obtained from Wisent (St-Bruno, PQ, Canada)

### **Monocytes extraction**

The preparation of monocytes has been described elsewhere (26, 27). Briefly, heparinized venous blood was layered over lymphocytes separation medium (Ficoll) and centrifuged. The separated mononuclear cells were washed with a HBSS solution pH 7.2 supplemented with 1mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and 100 mM Hepes. The pellet was resuspended in 10 ml HBSS and layered over 10 ml of a Ficoll/HBSS 1:1 solution before a second centrifugation step. All the cell pellets were resuspended in RPMI 1640 culture media supplemented with 5% Human Serum, 2mM glutamine, 2.4 g/L Hepes, 1mM pyruvate, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol and 50 mg/L gentamycin. Cells were pooled and cultured in 6-well plates at a cell density evaluated at  $2 \times 10^7$  cells/well. After incubation for 45 minutes at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, non adherent cells were removed while adherent leukocytes were washed four times with RPMI 1640 supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS). The monocytes were left to adhere during 24 hours in RPMI 5% FBS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After this time, adherent monocytes were washed two times with RPMI 1640 supplement with 5% FBS. The final cell density was evaluated at  $1,5 \times 10^6$  cells/well. The purity of monocytes was approximately 95%, as assessed by the detection of CD14 by flow cytometry.

### **Macrophages differentiation**

Monocytes were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 72 hours in RPMI 1640 supplemented with 5% FBS and 10 ng/ml M-CSF as shown in Table 1. Then, the media was removed and cells were incubated for 48 hours at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640

supplemented with 10 ng/ml M-CSF. To induce M1 differentiation, the media was supplemented with 100 ng/ml LPS and 25 U/ml IFN- $\gamma$ . To induce M2 differentiation, the media was supplemented with 20 ng/ml IL-4 and 20 ng/ml IL-10. The culture media was collected to be used like conditioned media after 48 hours of incubation. For RT-PCR analysis of macrophages, this last incubation period has been going on 6 hours only. For CD40 activation of M0, M1 and M2, macrophages were incubated for 48 hours in wells coated with LTK or LTK-CD154 fixed by paraformaldehyde. Then, CM were collected and kept at -20 °C until use.

### **Flow cytometry analysis of M0, M1 and M2**

Monocytes or differentiated macrophages were harvested by gently scratching wells with a cell scraper (Sarstedt, Newton, NC, USA). Then, cells were resuspended in serum-free RPMI at a density of  $2,0 \times 10^6$  cells/ml and incubated 30 minutes on ice with 150  $\mu$ g/ml of Human IgG to block Fc receptors. Macrophages were stained with 20  $\mu$ g/ml of corresponding primary antibodies on ice for 30 minutes. The following mAbs were used: an irrelevant IgG1 isotype control directed against the superantigen staphylococcal enterotoxin A (anti-SEA), mAbs directed against CD14 and CD40 (G28-5). Cells were washed with free-serum RPMI and incubated on ice for 30 minutes with 20  $\mu$ g/ml of goat FITC-conjugated anti-mouse IgG. Cells were washed again before analysis on a Cytomics FC 500 MPL apparatus (Beckman Coulter; Fullerton, CA, USA).

### **Proteins extraction and Western Blot**

Macrophages were harvested and washed 2 times with TNE buffer (10mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl and 5mM EDTA) and resuspended in TNE solution supplemented with 15 mg/ml of protease inhibitor cocktail (TNE<sub>i</sub>) (Roche, Montreal, Qc, Canada). Macrophages were then lysed with ultra-sounds and 1% of triton X-100. The total lysates were conserved at -20 °C until use.

The concentration of total proteins in each sample was determined using a

commercially available Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.). The immunodetection of CD40 molecules by Western Blot analysis has been already described (28). Briefly, samples were heated for 4 minutes at 94°C and resolved (35 µg of total proteins per well) by a 4%-stacking/10%-separating acrylamide gel system under non-reducing conditions for the detection of CD40 and under reducing conditions for CD16 and CD68 detection. Proteins were then transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA). After non specific antigen blocking with 5% swim milk-0.1 % Tween-20 dissolved in PBS, CD16, CD40 and CD68 molecules were probed with anti-CD16 (1:100), G28.5 (1:1000) and anti-CD68 (1:1000) for at least 1 h at RT. Membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG Ab (1: 20 000) for 45 minutes at RT. Primary antibodies were diluted in PBS containing 5% bovine serum albumin and anti-mouse was diluted with 5% swim milk and 0.1% Tween 20 in PBS. Probes molecules were visualized using an enhancement chemiluminescence detection kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

### **mRNA isolation and RT-PCR**

After stimulation, cells were homogenized in Trizol reagent (Invitrogen). The homogenates were extracted with chloroform and total RNA was precipitated with 50% isopropanol. The RNA pellet was washed three times with 75% ethanol solution and resuspended with 30 µl RNAses-free water before to dose RNA with a spectrophotometer GeneQuant (Biochrom, Cambridge, UK, USA). Total RNA (0.4 µg) was used for preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT). RNA samples were incubated for 10 minutes at 65°C with 2 µl oligo dT (deoxythymidine) primers in a final volume of 10 µl. Then, samples were incubated at 37°C for 1 h in 20 µl of a reaction buffer (1X) containing dithiothreitol (DTT; 10 mM), deoxynucleotide triphosphates (dNTPs; 0.5 mM) and Muloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT; 10 U). After cDNA synthesis, reaction samples were completed to a final volume of 60 µl with DNase-free water. Five µl of each cDNA sample was added to 45 µl of a PCR reaction mixture containing 5 µl of PCR buffer

(10X), 2  $\mu$ l of dNTPs 5mM, 2.5  $\mu$ l of sense and anti-sense primers 12  $\mu$ M and 0.3  $\mu$ l (30 mU) of Taq DNA Polymerase. A negative control was also included using the same reaction mixture but with each RNA samples to ensure absence of any contaminating genomic DNA in the RNA template. Reaction mix was completed with DNase-free water. To confirm that equal quantities of cDNA were used and to semiquantify the PCR products, the “housekeeping” gene GAPDH was used as reference. Primers sequences were designed as shown in Table 2 and the PCR reaction conditions for GAPDH, COX-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , GM-CSF, MCP-1 and CCL22 primers were performed as shown in Table 3. PCR reactions were realised by the Thermal Cycler Automation (Bio-Rad). PCR products were run on a 2% agarose gel in a TBE buffer (900 mM Tris, 900 mM boric acid and 20 mM EDTA pH 8.0) and visualized by SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). The intensity of bands was evaluated by densitometry and expressed as the ratio of product to GAPDH.

### **MTT proliferation assay**

Monocytes isolated from blood were plated at a cell density of  $3 \times 10^5$  cells/well in 96-well plates. THP1 and T24 cells were plated at a final cell density of  $2 \times 10^4$  and  $5 \times 10^3$  cells/well, respectively. Macrophages and THP1 cells were activated with 10 ng/ml M-CSF for 72 h and T24 cells were stimulated with conditioned media from M0, M1 and M2 for 48 h. Plates were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. At the end of the culture period, 10  $\mu$ l of MTT solution (5 mg/ml) was added to each well. After 3.5 h of incubation with MTT, 100  $\mu$ l of solubilization solution was added (10% SDS in 10 mM HCl) and plates were incubated overnight (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). The absorbance was measured at 580 nm using the Microplate Reader Manager (Bio-Rad).

### **Microinvasion assay**

Invasion was measured by assessment of T24 cells migration ability through an artificial basement membrane in a modified Boyden chamber: HTS Transwell System (Corning; Corning, NY, USA). The membrane consists to a polycarbonate filter with

0.4  $\mu\text{m}$  pore diameter and was coated on ice with Matrigel (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA) diluted 1:3 in serum-free RPMI. T24 cells ( $3 \times 10^3$  cells/ml of conditioned media of M0, M1 and M2) were seeded into the upper well of the chamber, while the lower well was filled up to the top with RPMI-1640 media supplemented with 10% FBS as a chemoattractant. Cells that migrated down to the polycarbonate membrane were counted after 24 hours by inverted microscopy.

### **Statistical analysis**

All experiments were performed three times. Data were subjected to student t test (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test with a threshold of 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## **RESULTS**

### **Monocytes characterization**

The expression of CD14, CD40 and MHCII by monocytes extracted from blood was analysed by flow cytometry. Peripheral blood monocytes are known to express CD14, an LPS receptor, CD40, a member of TNF receptor family, and MHCII, expressed by all antigen presenting cells (**Fig. 1A**) (15). The most specific monocyte/macrophage antigen is CD14. Flow cytometry analyses show that cells that we have extracted from peripheral blood express all these proteins. These results are in agreement with the expression pattern of monocytes, indicating that we have efficiently isolated peripheral monocytes from other leukocytes.

### **Macrophages differentiation**

M-CSF is a key factor of macrophage differentiation and proliferation (29). We have first tested if monocytes are responsive to M-CSF stimulation by analysing

monocyte proliferation (**Fig. 2**). MTT analysis shows that cultured monocytes and THP1 cells shown increased proliferation rate after a 72-hours M-CSF stimulation period. These observations showed that monocytes are responsive to M-CSF stimulation and may be differentiated in macrophages using this cytokine.

Monocytes differentiated in macrophages *in vitro* are expected to express CD68, a low-density lipoprotein (LDL) receptor specific of the macrophage lineage (30). We have analysed its expression on M0, M1 and M2 to confirm macrophage differentiation (**Fig. 3A**). Western Blot analysis indicates a similar CD68 expression for M0, M1 and M2, indicating that monocytes were differentiated in macrophages. We have also analyzed CD40 expression in M0, M1 and M2 by Western Blot (**Fig. 3B**). Results indicate that CD40 expression is higher in M1 than in M0 and M2. This result is in agreement with other studies which demonstrated that CD40 expression is increased by IFN- $\gamma$  (13, 31). We have next analyzed CD16 expression, an Fc receptor, in M0, M1 and M2 cells (**Fig. 3C**). Western Blot analysis show an important increase on CD16 expression in M1. This result is in correlation with reported data, which indicate that CD16 is more expressed by M1 than by M2 (8).

CD14 and CD40 expressions in M0, M1 and M2 were analysed by flow cytometry. CD14 expression, an LPS receptor, is increased in M1 and decreased in M2 cells (**Fig. 4A**). These results correlate with the supposed function of M1 to kill microorganisms and the IL-4 and IL-10 immunosuppressive functions (9, 32, 33). We have next confirmed the increased CD40 expression in M1 by flow cytometry (**Fig. 4B**). This result also shows that Western Blot and flow cytometry analyses are comparable.

To further support macrophage differentiation results, we have studied the expression of different genes encoding for chemokines, anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines in M0, M1 and M2 cells. We have first analysed TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-6 expression, three cytokines known to be more expressed by M1 cells (8). RT-PCR analysis shows that M1 express more TNF- $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine, than M0 and M2 (**Fig. 5A**). Moreover, M2 cells show a down-regulation of the TNF- $\alpha$

expression, in accordance with their anti-inflammatory function. RT-PCR analysis also show that IL-8 expression, a pro-inflammatory chemokine, is higher in M1 than in M0 and M2 (**Fig. 5B**). IL-6, another pro-inflammatory chemokine, shows a similar pattern expression than IL-8 in M0, M1 and M2 (**Fig. 5C**). We have also noted an increase in the expression of the pro-inflammatory mediators COX-2 and GM-CSF, and the immunosuppressive factor TGF- $\beta$ 1 in M1 (**Fig. 5D, 5E, 5F**). COX-2, via prostaglandins synthesis, is one of the most important factors implicated in the inflammatory response while IL-6 is considered as a pro-inflammatory cytokine due to its effects on lymphocyte differentiation, survival and proliferation (34, 35). TGF- $\beta$ 1 is an important anti-inflammatory mediator secreted by the immunosuppressive T regulatory cells (Treg cells) (36). Therefore, this cytokine could be implicated in an autoregulatory pathway induced by M1. TGF- $\beta$ 1 is the only anti-inflammatory cytokine that we have detected to be more expressed by M1 than M2. Thus, the expression of all these factors by M1 is in agreement with their inflammatory function.

We have next analysed IL-10, CCL22 and MCP-1 expression, three cytokines known to be expressed by M2 (9). IL-10 is an important immunosuppressive cytokine which polarise macrophages in a phenotype II way and inhibit phenotype I functions (8, 32). Although IL-10 expression is increased by M1, M2 show a higher IL-10 expression (**Fig. 6A**). RT-PCR analysis also indicated that M2 are induced to secrete a higher level of CCL22, an immunosuppressive chemokine recognized for its chemoattraction on Treg cells (**Fig. 6B**) (37). Finally, we have detected an up-regulation of MCP-1 expression in M2 cells (**Fig. 6C**). MCP-1 is the most important chemokine of TAM (3). These results correlate with the immunosuppressive function of M2 and with their cytokines pattern expression.

### **T24 cells stimulation with macrophage conditioned media (CM): MTT assay and RT-PCR analyses**

Given that we have confirmed the status of M1 and M2 cells, we then undertake to stimulate T24 cells with macrophage CM and proceed to MTT assay and RT-PCR



analyses. MTT assay analysis shows an increased proliferation rate of T24 cells when stimulated with M2 CM compared to T24 cells incubated with M0 CM. (**Fig. 7**). Moreover, T24 cells incubated with M1 CM show a decreased proliferation rate. Taken together, these results demonstrate that M1 inhibit proliferation of T24 cells via a secretory anti-proliferative factor and that M2 increase this rate via a pro-tumor factors secretion. These observations are in conformity with the M1 anti-tumor function and with the M2 pro-tumor function proposed by many studies (38).

To further investigate the effect of MØ CM, we have analysed pro-tumor factors expression by T24 cells stimulated by M0 CM, M1 CM and M2 CM. We have first detected COX-2 expression, a prostaglandin synthase implicated in many cancer types, like those of colorectal and lung cancer (**Fig. 8A**) (39, 40). RT-PCR analyses show that T24 cells incubated with M1 CM show an increased COX-2 expression. We have also detected an up-regulation of IL-8 expression, an angiogenic tumor chemokine, by T24 cells stimulated with M1 CM (**Fig. 8B**) (41). T24 cells stimulated with M1 CM display also an increased expression of the pro-tumor cytokines IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF and MCP-1 (**Fig. 8C, 8D, 8E, 8F**). IL-6 and TNF- $\alpha$  are two important pro-inflammatory factors implicated in tumor progression induced by chronic inflammation (1, 2). GM-CSF has been implicated in the *in vitro* up-regulation of urothelial tumor cell lines proliferation while MCP-1 is associated in TAM attraction, tumor invasion and neoplastic vascularisation of the esophagus cancer (25, 42). In contrast, the expression of these factors is decreased, or weakly increased, in T24 cells stimulated with M2 CM.

We have finally analysed CCL22 expression in T24 cells stimulated with macrophages CM (**Fig. 9**). CCL22 is the only analysed factor produced by T24 cells which expression is higher in M2 CM compared to M1 CM. By attracting immunosuppressive Treg cells, CCL22 is a chemokine implicated in the progression of many cancer types, such as ovarian cancer (43). RT-PCR analysis on T24 cells stimulated with polarized macrophages indicated that both M1 and M2 induce the production of pro-tumor factors by T24 cells.

### **Macrophage CD40 activation: invasion and pro-tumor factors expression by T24 cells**

In tumor progression, invasion of tumor cells allows metastases formation. Many studies have showed a potential involvement of CD40 activation in enhancing invasiveness ability of tumor cells (44-46). Thus, we have used T24 stimulated cells with CM from CD40-activated macrophages in an *in vitro* invasion assay (**Fig. 10**). Invasion assay studies show that T24 cells stimulated with M1 or M2 CM are less invasive than T24 cells stimulated with M0 CM. However, T24 cells incubated with CM from CD40-activated M0 and M1 were more invasive compared to T24 cells incubated with CM from CD40-activated M2. Our results are in accordance with studies showing that CD40 might be involved in tumor invasiveness and with other studies which demonstrated that IL-4 and IL-10 inhibit CD40 signalling in monocytes/macrophages (20-22).

Finally, we have analysed by RT-PCR pro-tumor factors expression by T24 cells stimulated with CM from polarized CD40-activated macrophages. The expression of COX-2, IL-8, IL-6, GM-CSF and MCP-1 genes are decreased in T24 cells stimulated with CD40-activated M1 CM compared to T24 cells stimulated with M1 CM. In the same conditions, TNF- $\alpha$  expression was not increased (**Fig. 11**). However, T24 cells stimulated with CD40-activated M2 CM show an increased expression of COX-2, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF and MCP-1 genes compared to T24 cells incubated with M2 CM (**Fig. 11A, 11B, 11D, 11E, 11F**). IL-6 expression is slightly decreased in T24 cells incubated with CM from CD40-activated M2 compared to T24 cells stimulated with M2 CM (**Fig. 11C**). These results show that soluble factors from CD40-activated M1 might be involved in the down regulation of pro-tumor factors in T24 cells. On the other hand, different soluble factors from CD40-activated M2 allow an increased expression of these same factors by T24 cells.

## DISCUSSION

Many studies have demonstrated the implication of TAM, which behave as M2 macrophages, in tumor progression (9, 38). CD40 is considered as a major macrophage activator (13). However, the interrelation between CD40, macrophage pathogenicity and tumor progression is not yet established. M1 are proposed to be potent effector cells that kill microorganisms and tumour cells and are important source of pro-inflammatory cytokines at the site of inflammation. In contrast, M2 restrain inflammatory responses, scavenge debris, and promote angiogenesis and tissue remodelling/repair (8). Thus, it is proposed that M1 are anti-tumor cells while M2 are pro-tumor cells (8, 9, 38). However, some studies have showed that chronic inflammation promotes cancer progression (1, 2). As M1 produce large amounts of pro-inflammatory cytokines, we suggest that M1, as well as M2, secrete pro-tumor factors. These factors include the pro-inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, COX-2, and GM-CSF as well as the anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta$ 1, IL-10, CCL22 and MCP-1. Moreover, we propose that CD40 activation modulate paracrine interactions between macrophages and tumor cells. CD40 is one of the most studied co-stimulatory proteins linked to angiogenesis and tumor migration (44-47). These properties make of CD40 an interesting target in our study in order to understand the implication of macrophage CD40 activation on tumor progression.

The first objective of the present study was to determine the effects of soluble factors from M0 (control cells), M1 and M2 by studying the response of T24 cells at the levels of cell proliferation and expression of pro-tumor factors. First, we have carried out to the phenotype characterization of mononuclear cells extracted from peripheral blood. CD14, CD40 and MHCII expression by these cells confirmed that we have efficiently isolated monocytes (15). We have then differentiated monocytes in M0, M1 and M2 polarized macrophages. M-CSF is known to be implicated in monocytes proliferation and differentiation (29). MTT assay analysis shows that the proliferation rate of M-CSF-activated monocytes is increased, showing that extracted monocytes are responsive to M-CSF. Sustained CD68 expression by M0, M1 and M2 confirmed that

M-CSF stimulation induce monocytes to differentiate in macrophages (30, 48).

We have next further characterized M1 and M2. The expression of the Fc receptor CD16 by M1 is in accordance with their function as Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity (ADCC) effector cells which is induced via Fc receptors (9, 49). Flow cytometry and Western Blot analyses show also an increased expression of CD40 in M1 while its expression is decreased in M2, indicating that M1 could be more prone to react following CD40 ligation by CD154. Moreover, the detection of many pro-inflammatory factors (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, COX-2, and GM-CSF) expressed in M1 is in agreement with their inflammatory function (9). Of note, all the pro-inflammatory factors highly expressed in M1 are down-regulated in M2. Moreover, we have demonstrated an increase in IL-10 expression, an anti-inflammatory cytokine, in M2. These results are in accordance with the anti-inflammatory functions according to M2 (9). Our studies about macrophage characterisation confirm that we have differentiated monocytes into M1 and M2 phenotypes.

Thus, we have tested the effects of soluble factors from M0, M1 and M2 on T24 cell biology. Results of MTT assay analysis are in agreement with the anti-tumoral role of M1 and the pro-tumoral role of M2 proposed in the literature (9). We have then analysed pro-tumor factors expression in T24 cells stimulated with CM from M0, M1 and M2 via RT-PCR analyses. These pro-tumor factors include COX-2, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, MCP-1 and CCL22. RT-PCR analyses show that COX-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF and MCP-1 gene expressions are increased by CM from M1 compared to CM from M0. These observations indicate that even if M1 soluble factors inhibit proliferation of T24 cells, they induce pro-tumor factors expression in T24 cells. Moreover, we have demonstrated an up-regulation of CCL22 expression in T24 stimulated with M2 CM. The factors we have analysed and that could be implicated in the inhibition of tumor cell proliferation by M1 soluble factors are expected to be TNF- $\alpha$  and GM-CSF. TNF- $\alpha$  is a major inducer of nitric oxide (NO), an important cytotoxic mediator (50). GM-CSF however had some contradictions functions in tumor progression or regression. Some studies have showed that GM-CSF is an inducer of

macrophage cytotoxicity (51). However, there is no study concerning a potential role of CCL22 in cancer cell proliferation. Thus, it will be interesting in future studies to use blocking antibodies against these cytokines to show if they are implicated or not in tumor cell proliferation. Moreover, we have showed that most of pro-tumor factors detected in T24 cells incubated with M1 CM are also produce by M1. These factors include COX-2, IL-6, IL-8, GM-CSF and TNF- $\alpha$ , all pro-inflammatory factors. This indicates that the inflammatory network expressed by M1 influence T24 to produce also pro-inflammatory factors. This amplifies the pro-tumor effects induces by M1 and delivered by those pro-inflammatory factors. We see also the same result with CCL22, which is expressed in M2 and in T24 stimulated with M2 CM.

The second aim of this study was to evaluate the effect of CD40 activation of M0, M1 and M2 on T24 cells by testing tumor invasion and pro-tumor factors expression in T24 cells. CD40/CD154 interactions prolong the survival of monocytes and Th lymphocytes (15). Here, we have demonstrated that CD40/CD154 may play also a critical role in tumor invasion. Invasion assay experiments showed that M1 and M2 soluble factors induced a weak invasion of T24 cells compared to M0 soluble factors. However, the soluble factors from CD40-activated M0 and M1 increased the invasiveness of T24 cells. In contrast to effects obtained with M1, soluble factors from CD40-activated M2 did not affect the invasiveness of T24 cells. Since CD40-activated M1 have an increased survival rate, they can be induced to be more efficient to favour tumor invasion (17). These results can be explained by the fact that IL-4 and IL-10 inhibit some signalling pathway induced by CD40 activation. This includes ERK1, ERK2, STAT-1, p38 and NF- $\kappa$ B, which are proteins implicated in CD40 signalling (17, 20-22). Thus, the inactivation of CD40 signalling proteins in M2 more the fact that these macrophages express less CD40 can explain that we don't see an increase of tumor invasion after the stimulation of T24 cells with CM from M2 activated via CD40. The factors produced by M1 after the activation of CD40 are induced via the activation of one or more of these signalling proteins. More specifically, we propose the implication of NK- $\kappa$ B in the tumor invasion induced by macrophages. CD40 activation induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) via phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and

NF- $\kappa$ B (46). uPA is known to activate some matrix metalloproteinase (MMP), as MMP-9. M1 produce some factors (as TNF- $\alpha$  and IL-8) which induce expression of many MMP who need to be activated (8, 52-54). These MMP, once activated, allow to accelerate intercellular matrix degradation which increases tumor invasion (7). Thus, CD40-activated M1 could induce uPA expression which activates MMP already produced by M1. This hypothesis could explain why M1 need to be activated by CD40 to induce tumor invasion. Moreover, IL-10 inhibits NF- $\kappa$ B activation in CD40-activated macrophages (21). Thus, CD40-activated or not, M2 couldn't induce uPA expression and tumor invasion.

Moreover, RT-PCR analyses show that soluble factors from CD40-activated M2 increased pro-tumor factors expression in T24 cells, including COX-2, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and GM-CSF while the expression of most of these factors is decreased in T24 cells stimulated with CM from CD40-activated M1. This indicates that M2 are responsiveness to CD40 stimulation even if activation of some signalling proteins (ERK1, ERK2, STAT-1 and NF- $\kappa$ B) could be inhibited. CD40 signalling in M2 could be delivered via TRAF proteins which are not inhibited by IL-4 or IL-10 (17, 21). TRAF proteins can indirectly regulate gene transcription, via NF- $\kappa$ B, which is inhibited by IL-10 (17, 21). However, CD40 cross-linking is suspected to multimerizes TRAF proteins which may act as direct transcriptional regulators (55). This implicates that TRAFs must be released from the receptor. Even if this hypothesis remains to be proved, we can speculate that this pathway could play a role in the induction of pro-inflammatory proteins in T24 stimulated by CM from CD40-activated M2.

In conclusion, even if M1 are expected to perform an anti-tumor function and M2 are considered as pro-tumor cells, we found an implication of M1 in the induction of pro-tumor factors by neoplastic cells (9, 38). Moreover, many of these factors are also secreted by M1 themselves. Thus, M1, as well as M2, produced pro-tumor factors. On the other hand, some studies have indicated a potential anti-tumor implication of CD40/CD154 interactions (56-58). However, we found that CM from CD40-activated M1 increases the invasiveness of tumor cells while soluble factors from CD40-activated

M2 up-regulate pro-tumor factors expression by these tumor cells. Our results are in agreement with other studies indicating a potential role of CD40 activation in tumor invasiveness (44-46). Finally, we could propose that M1, when activated by CD154 on Th lymphocytes, induce tumor cell invasion. Moreover, M1 are expected to be located in the periphery of the tumor site while M2 are mainly present in the heart of tumor masse. Then, M1 are at the best position to induce tumor invasion while M2 are positioned to induce tumor cell proliferation and angiogenesis. This tumor concept is supported by a study that found iNOS (that could be produced by M1) in the periphery of tumor site while cytokines inducing M1 polarization are usually absent at the tumor site (9, 59). We can also suspect that M1 allow M2 attraction by tumor cells which produce MCP-1 after the interaction with M1. We have also shown that M1 produce IL-6, which is an important chemokine known to attract TAM (60). Thus M1 may play an important role in the attraction of TAM (M1 as well as M2) while M2 are the effectors cells which induce tumor cells proliferation and angiogenesis. Moreover, we know that important quantities of IL-4 and IL-10 are found in some tumor sites (61, 62). IL-10 inhibits proliferation of lymphocytes T, which express CD154 (63). We have shown that M2 don't need to be activated via CD40 to induce tumor proliferation. Considering this fact, we can suppose that M2, which are activated by IL-4 and IL-10 in tumor sites, induce tumor proliferation. Thus, M1, situated at the tumor periphery, can be activated via CD40 by lymphocytes T which aren't inhibited outside the tumor sites. This activation of M1 by lymphocytes could induce tumor invasion. However, some *in situ* studies will be necessary to confirm this hypothesis.

## ACKNOWLEDGMENTS

We greatly appreciate Dr Éric Asselin and Dr Lionnel Berthoux for their review of this manuscript, and Dr Céline Van-Themsche for her advices on invasion test. We also thank Dr Walid Mourad for the LTK and LTK-CD154 cells as well as the CHRTR for the blood samples.

## REFERENCES

1. Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001) *Lancet* **357**(9255), 539-45
2. Philip, M., Rowley, D. A., and Schreiber, H. (2004) *Semin Cancer Biol* **14**(6), 433-9
3. Balkwill, F. (2004) *Nat Rev Cancer* **4**(7), 540-50
4. Whiteside, T. L. (2006) *Semin Cancer Biol* **16**(1), 3-15
5. Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002) *Nature* **420**(6917), 860-7
6. Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., and Ruco, L. (1992) *Immunol Today* **13**(7), 265-70
7. Bingle, L., Brown, N. J., and Lewis, C. E. (2002) *J Pathol* **196**(3), 254-65
8. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002) *Trends Immunol* **23**(11), 549-55
9. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., and Allavena, P. (2006) *Eur J Cancer* **42**(6), 717-27
10. Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W., Sakai, A., Sueoka, E., and Fujiki, H. (1999) *Cancer Res* **59**(18), 4516-8
11. Lattanzio, G., Libert, C., Aquilina, M., Cappelletti, M., Ciliberto, G., Musiani, P., and Poli, V. (1997) *Am J Pathol* **151**(3), 689-96
12. Vidal-Vanaclocha, F., Fantuzzi, G., Mendoza, L., Fuentes, A. M., Anasagasti, M. J., Martin, J., Carrascal, T., Walsh, P., Reznikov, L. L., Kim, S. H., Novick, D., Rubinstein, M., and Dinarello, C. A. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2), 734-9
13. Alderson, M. R., Armitage, R. J., Tough, T. W., Strockbine, L., Fanslow, W. C., and Spriggs, M. K. (1993) *J Exp Med* **178**(2), 669-74
14. Kiener, P. A., Moran-Davis, P., Rankin, B. M., Wahl, A. F., Aruffo, A., and Hollenbaugh, D. (1995) *J Immunol* **155**(10), 4917-25
15. Sakata, K., Sakata, A., Kong, L., Vela-Roch, N., Talal, N., and Dang, H. (1999) *Scand J Immunol* **50**(5), 479-84
16. Stout, R. D., and Suttles, J. (1996) *Immunol Today* **17**(10), 487-92
17. Schonbeck, U., and Libby, P. (2001) *Cell Mol Life Sci* **58**(1), 4-43
18. Baxendale, A. J., Dawson, C. W., Stewart, S. E., Mudaliar, V., Reynolds, G., Gordon, J., Murray, P. G., Young, L. S., and Eliopoulos, A. G. (2005) *Oncogene* **24**(53), 7913-23
19. van Kooten, C., and Banchereau, J. (2000) *J Leukoc Biol* **67**(1), 2-17



20. Suttles, J., Milhorn, D. M., Miller, R. W., Poe, J. C., Wahl, L. M., and Stout, R. D. (1999) *J Biol Chem* **274**(9), 5835-42
21. Inoue, Y., Otsuka, T., Nihiro, H., Nagano, S., Arinobu, Y., Ogami, E., Akahoshi, M., Miyake, K., Ninomiya, I., Shimizu, S., Nakashima, H., and Harada, M. (2004) *J Immunol* **172**(4), 2147-54
22. Ito, S., Ansari, P., Sakatsume, M., Dickensheets, H., Vazquez, N., Donnelly, R. P., Larner, A. C., and Finbloom, D. S. (1999) *Blood* **93**(5), 1456-63
23. Hanada, T., Nakagawa, M., Emoto, A., Nomura, T., Nasu, N., and Nomura, Y. (2000) *Int J Urol* **7**(7), 263-9
24. Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J. M., Evans, J. F., and Taketo, M. M. (1996) *Cell* **87**(5), 803-9
25. Block, T., Schmid, F., Geffken, B., Treiber, U., Busch, R., and Hartung, R. (1992) *Urol Res* **20**(4), 289-92
26. Giamarellos-Bourboulis, E. J., Plachouras, D., Tzivra, A., Kousoulas, V., Bolanos, N., Raftogiannis, M., Galani, I., Dontas, I., Dionyssiou-Asteriou, A., and Giamarellou, H. (2004) *Clin Exp Immunol* **135**(2), 240-6
27. Seager Danciger, J., Lutz, M., Hama, S., Cruz, D., Castrillo, A., Lazaro, J., Phillips, R., Premack, B., and Berliner, J. (2004) *J Immunol Methods* **288**(1-2), 123-34
28. Reyes-Moreno, C., Girouard, J., Lapointe, R., Darveau, A., and Mourad, W. (2004) *J Biol Chem* **279**(9), 7799-806
29. Hamilton, J. A. (1997) *J Leukoc Biol* **62**(2), 145-55
30. Ramprasad, M. P., Terpstra, V., Kondratenko, N., Quehenberger, O., and Steinberg, D. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25), 14833-8
31. Nguyen, V. T., and Benveniste, E. N. (2000) *J Biol Chem* **275**(31), 23674-84
32. Sica, A., Saccani, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., van Damme, J., and Mantovani, A. (2000) *J Immunol* **164**(2), 762-7
33. Larner, A. C., Petricoin, E. F., Nakagawa, Y., and Finbloom, D. S. (1993) *J Immunol* **150**(5), 1944-50
34. Yoshikai, Y. (2001) *Curr Opin Infect Dis* **14**(3), 257-63
35. Hodge, D. R., Hurt, E. M., and Farrar, W. L. (2005) *Eur J Cancer* **41**(16), 2502-12
36. Wang, R. F. (2005) *Semin Cancer Biol*
37. Lee, I., Wang, L., Wells, A. D., Dorf, M. E., Ozkaynak, E., and Hancock, W. W. (2005) *J Exp Med* **201**(7), 1037-44
38. Mantovani, A., Allavena, P., and Sica, A. (2004) *Eur J Cancer* **40**(11), 1660-7

39. Chell, S., Kadi, A., Williams, A. C., and Paraskeva, C. (2006) *Biochim Biophys Acta* **1766**(1), 104-19
40. Krysan, K., Reckamp, K. L., Sharma, S., and Dubinett, S. M. (2006) *Anticancer Agents Med Chem* **6**(3), 209-20
41. Fujimoto, J., Sakaguchi, H., Aoki, I., and Tamaya, T. (2000) *Cancer Res* **60**(10), 2632-5
42. Ohta, M., Kitadai, Y., Tanaka, S., Yoshihara, M., Yasui, W., Mukaida, N., Haruma, K., and Chayama, K. (2002) *Int J Cancer* **102**(3), 220-4
43. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L., and Zou, W. (2004) *Nat Med* **10**(9), 942-9
44. Smola-Hess, S., Schnitzler, R., Hadaschik, D., Smola, H., Mauch, C., Krieg, T., and Pfister, H. (2001) *Exp Cell Res* **267**(2), 205-15
45. Turner, J. G., Rakhmievich, A. L., Burdelya, L., Neal, Z., Imboden, M., Sondel, P. M., and Yu, H. (2001) *J Immunol* **166**(1), 89-94
46. Tai, Y. T., Podar, K., Mitsiades, N., Lin, B., Mitsiades, C., Gupta, D., Akiyama, M., Catley, L., Hideshima, T., Munshi, N. C., Treon, S. P., and Anderson, K. C. (2003) *Blood* **101**(7), 2762-9
47. Reinders, M. E., Sho, M., Robertson, S. W., Geehan, C. S., and Briscoe, D. M. (2003) *J Immunol* **171**(3), 1534-41
48. Brauner, A., Lu, Y., Hallden, G., Hylander, B., and Lundahl, J. (1998) *Inflammation* **22**(1), 55-66
49. Lynch, R. G. (2000) *J Leukoc Biol* **67**(3), 279-84
50. Balkwill, F. (2002) *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2), 135-41
51. Inamura, N., Sone, S., Okubo, A., Singh, S. M., and Ogura, T. (1990) *J Leukoc Biol* **47**(6), 528-34
52. Robinson, S. C., Scott, K. A., and Balkwill, F. R. (2002) *Eur J Immunol* **32**(2), 404-12
53. Luca, M., Huang, S., Gershenwald, J. E., Singh, R. K., Reich, R., and Bar-Eli, M. (1997) *Am J Pathol* **151**(4), 1105-13
54. Van Ranst, M., Norga, K., Masure, S., Proost, P., Vandekerckhove, F., Auwerx, J., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1991) *Cytokine* **3**(3), 231-9
55. Kehry, M. R. (1996) *J Immunol* **156**(7), 2345-8
56. Eliopoulos, A. G., and Young, L. S. (2004) *Curr Opin Pharmacol* **4**(4), 360-7
57. Ghamande, S., Hylander, B. L., Oflazoglu, E., Lele, S., Fanslow, W., and

- Repasky, E. A. (2001) *Cancer Res* **61**(20), 7556-62
58. Buhtoiarov, I. N., Lum, H., Berke, G., Paulnock, D. M., Sondel, P. M., and Rakhmilevich, A. L. (2005) *J Immunol* **174**(10), 6013-22
59. Klimp, A. H., Hollema, H., Kempinga, C., van der Zee, A. G., de Vries, E. G., and Daemen, T. (2001) *Cancer Res* **61**(19), 7305-9
60. Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., and Palucka, A. K. (2000) *Nat Immunol* **1**(6), 510-4
61. Sato, M., Goto, S., Kaneko, R., Ito, M., Sato, S., and Takeuchi, S. (1998) *Anticancer Res* **18**(5D), 3951-5
62. Filella, X., Alcover, J., Zarco, M. A., Beardo, P., Molina, R., and Ballesta, A. M. (2000) *Prostate* **44**(4), 271-4
63. Huang, M., Wang, J., Lee, P., Sharma, S., Mao, J. T., Meissner, H., Uyemura, K., Modlin, R., Wollman, J., and Dubinett, S. M. (1995) *Cancer Res* **55**(17), 3847-53

## LEGEND FIGURES

### Figure 1.

**Fluorescence-activated cells sorting (FACS) analysis of cells isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBCM).** Cells were extracted from peripheral blood and analysed by FACS as described in "Material and Methods". Cells express CD14, an LPS receptor specific to monocytes/macrophages lineage; MHCII, expressed by APC; and CD40, a member of TNF receptor family and our protein of interest. Then, cells isolated belong to the monocytes lineage.

### Figure 2.

**MTT assay: M-CSF induces monocytes and THP1 proliferation.**  $3 \times 10^5$ /well monocytes extracted from peripheral blood and  $2 \times 10^4$ /well THP1 have been incubated in the presence of 10 ng/ml of M-CSF for 72 hours. Then, MTT assay has been realised as described in "Material and methods". Graphs show relative absorbance of each well.  $P < 0,05$ . Different superscripts indicate significant difference between groups. CTL, control media without M-CSF.

### Figure 3.

Western Blot analyses of M0, M1 and M2. Monocytes extracted from peripheral blood have been differentiated as described in "Material and Methods". Briefly, monocytes were incubated five days with 10 ng/ml of M-CSF. At the fourth and fifth days of incubation, the media was supplemented with 100 ng/ml of LPS and 25 U/ml of IFN- $\gamma$  to induce M1 differentiation when to induce M2 differentiation, the media was supplemented with 20 ng/ml of IL-4 and 20 ng/ml of IL-10. Then, Western Blot were realised as described in "Material and Methods".  $P < 0,05$ . Different superscripts indicate significant difference between groups. A: Non-reducing conditions were used for the detection of CD40. B,C: Reducing conditions were performed for CD16 and CD68 detection.

**Figure 4.**

**FACS analysis of M0, M1 and M2.** A: FACS analysis indicates that CD14 expression is induced by M1 when it is decreased by M2 comparatively to CD14 expression by M0. B: CD40 expression is increased by M1.

**Figure 5.**

**RT-PCR analyses of M0, M1 and M2: increased characterisation factors expressions by M1.** Total RNA was isolated, and RT-PCR was performed as described in "Material and Methods". After PCR with specific primers, the PCR product was separated on a 2% agarose gel. GAPDH primers were used as control. Graphs show % ratio of density for each stripe on M0 density stripe.  $P < 0,05$ . Different superscripts indicate significant difference between groups. A: TNF- $\alpha$ , B: IL-8, C: IL-6, D: COX-2, E: GM-CSF, F: TGF- $\beta$ 1. GAPDH, glutaraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

**Figure 6.**

RT-PCR analyses of M0, M1 and M2: increased characterisation factors expressions by M2. GAPDH primers were used as control. Graphs show % ratio of density for each stripe on M0 density stripe.  $P < 0,05$ . Different superscripts indicate significant difference between groups. A: IL-10, B: CCL22, C: MCP-1. GAPDH, glutaraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

**Figure 7.**

**Test proliferation by MTT assay of T24 cells stimulated with M0, M1 or M2 CM.** 5000/well T24 cells were incubated for 72 hours with M0, M1 or M2 CM. CM comes from macrophages culture medium used the last two days of macrophages differentiation. M1 CM decreases T24 proliferation when M2 CM increases it. Graphs show % ratio of relative absorbance of each well on M0 well relative absorbance.  $P < 0,05$ . Different superscripts indicate significant difference between groups.

**Figure 8.**

**RT-PCR analyses of pro-tumor factors expression by T24 cells stimulated with M0, M1 or M2 CM: increased pro-tumor factors expressions by T24 cells stimulated with M1 CM.** T24 were incubated for six hours in M0, M1 or M2 CM. Total RNA was isolated, and RT-PCR was performed as described in "Material and Methods". GAPDH primers were used as control. Graphs show % ratio of density for each stripe on M0 density stripe.  $P < 0,05$ . Different superscripts indicate significant difference between groups. A: COX-2, B: IL-8, C: IL-6, D: TNF- $\alpha$ , E: GM-CSF, F: MCP-1. GAPDH, glutaraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

**Figure 9.**

**RT-PCR analyses of pro-tumor factors expression by T24 cells stimulated with M0, M1 or M2 CM: increased CCL22 expression by T24 cells stimulated with M2 CM.** T24 were incubated for six hours in M0, M1 or M2 CM before to perform a RT-PCR with the total RNA. GAPDH primers were used as control. Graphs show % ratio of density for each stripe on M0 density stripe.  $P < 0,05$ . Different superscripts indicate significant difference between groups. GAPDH, glutaraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

**Figure 10.**

**Invasion assay analysis of T24 cells stimulated with CD40 activated and non-activated M0, M1 and M2 CM: increased invasion of T24 stimulated with CM of CD40-activated M0/M1.** Invasion assay has been realised as described in "Material and Methods". Briefly,  $2 \times 10^4$  cells per well were incubated in CM on a matrigel matrix and cells which have migrated as far as the basal filter after 24 hours of incubation were counted. Graphs show % ratio of each count on the one of the T24 cells stimulated with M0 CM well.  $P < 0,05$ . Different superscripts indicate significant difference between groups. CTL, control CM of macrophages non-activated by CD154.

**Figure 11.**

**RT-PCR analyses of pro-tumor factors expressions by T24 cells stimulated with CD40-activated and non-activated M0, M1 or M2 CM: increased pro-tumor factors expressions by T24 stimulated with CM of CD40-activated M2.** T24 were incubated for 6 hours in CD40-activated or non-activated M0, M1 or M2 CM before to perform a RT-PCR with the total RNA. GAPDH primers were used as control. Graphs show % ratio of density for each stripe on M0 density stripe.  $P < 0,05$ . Different superscripts indicate significant difference between groups. A: COX-2, B: IL-8, C: IL-6, D: TNF- $\alpha$ , E: GM-CSF, F: MCP-1. CTL, control CM of macrophages non-activated by CD154. GAPDH, glutaraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

## FIGURES

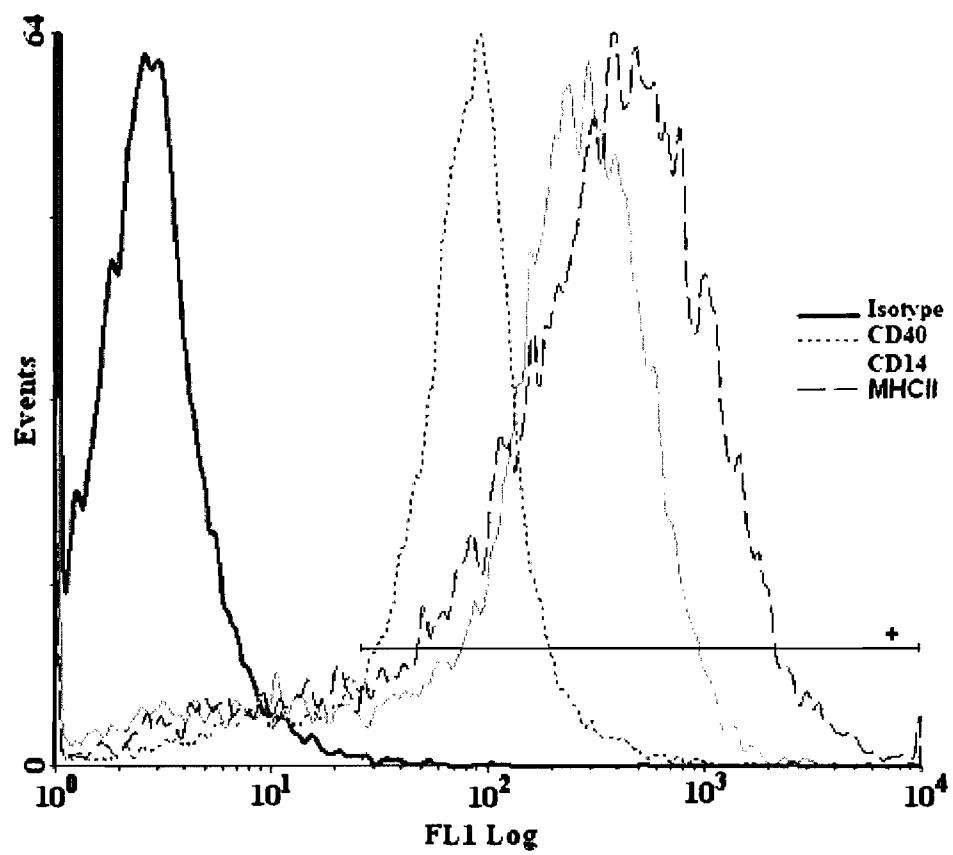


Figure 1.



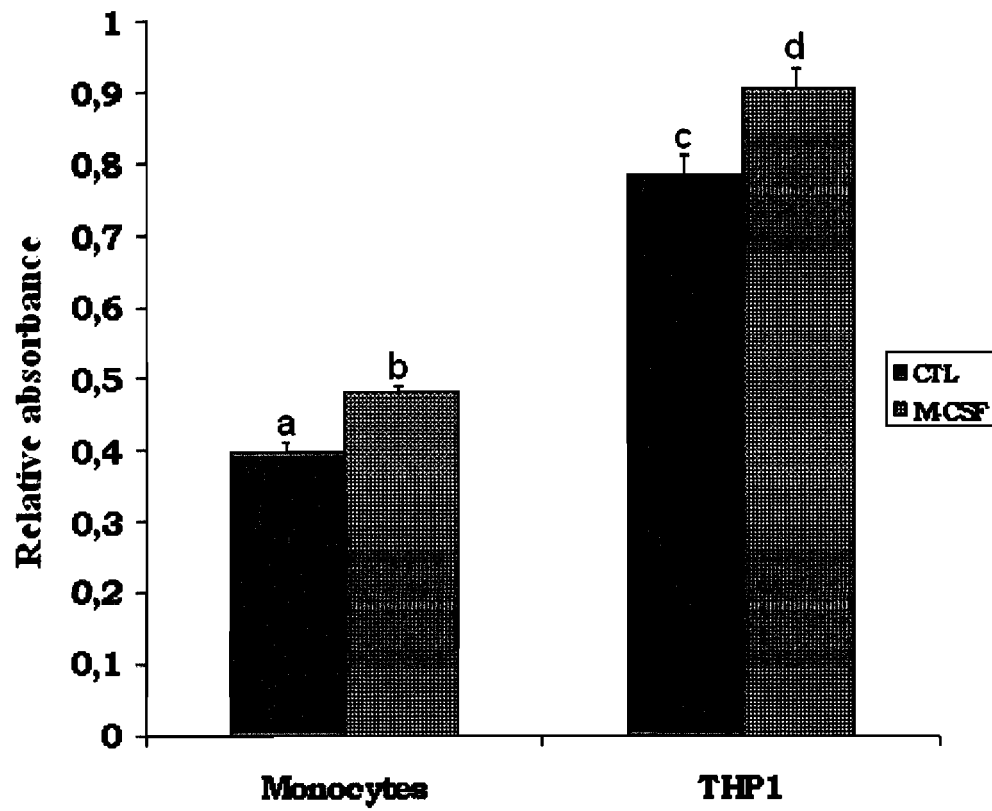


Figure 2.

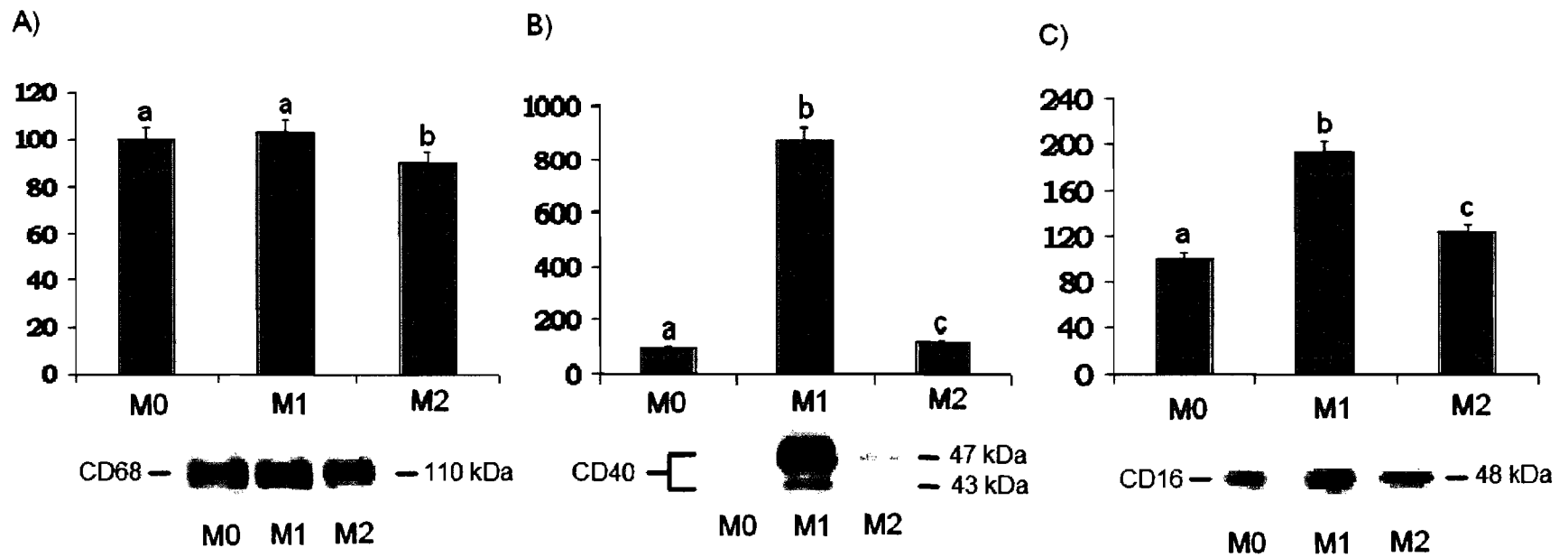


Figure 3.

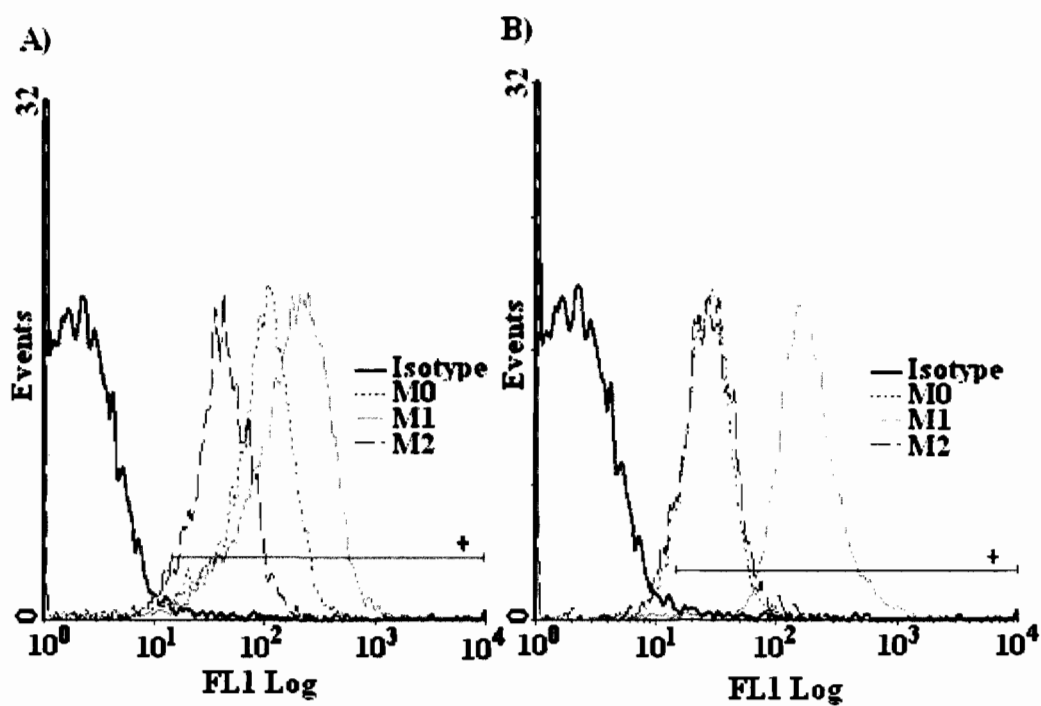


Figure 4.

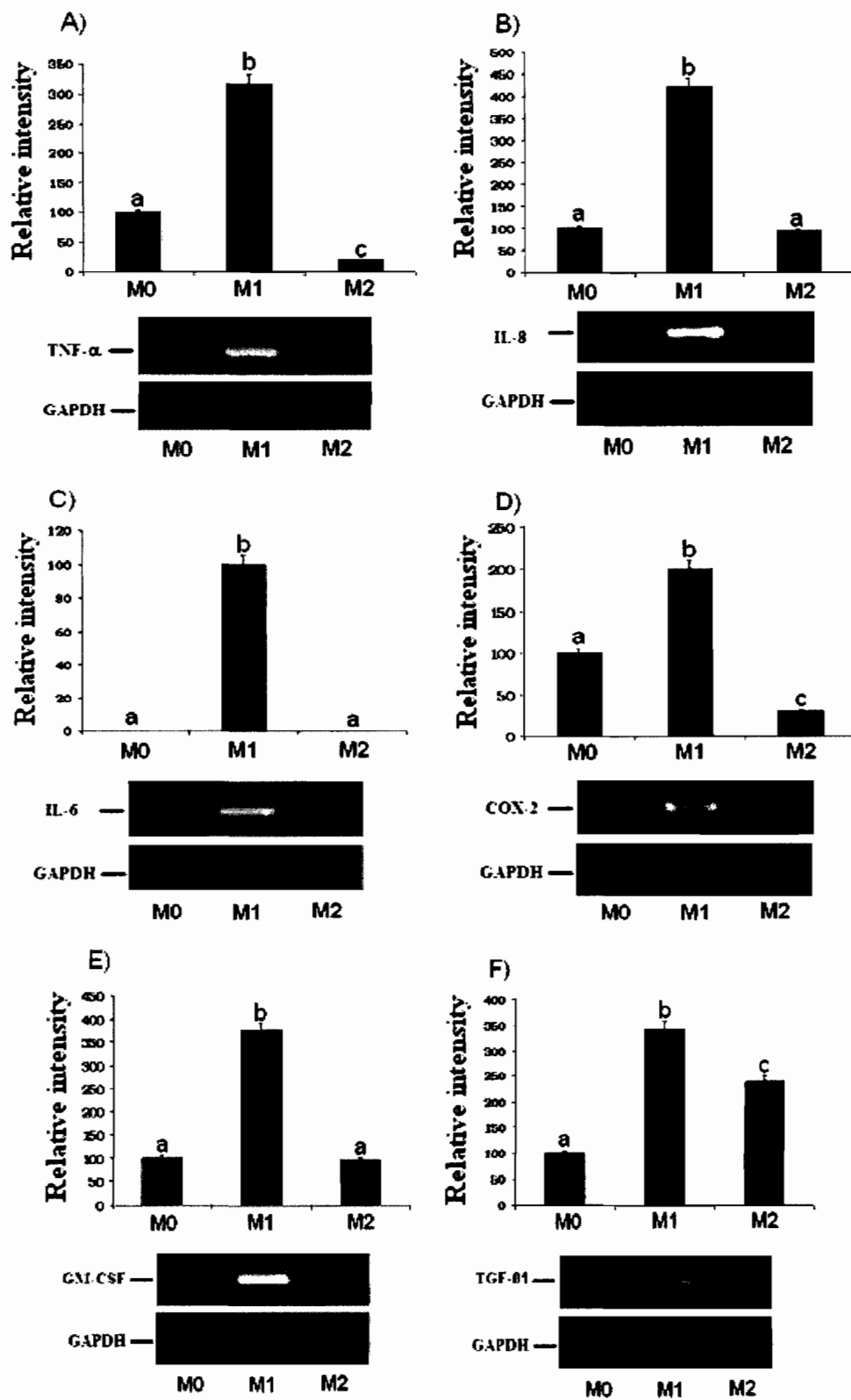


Figure 5.

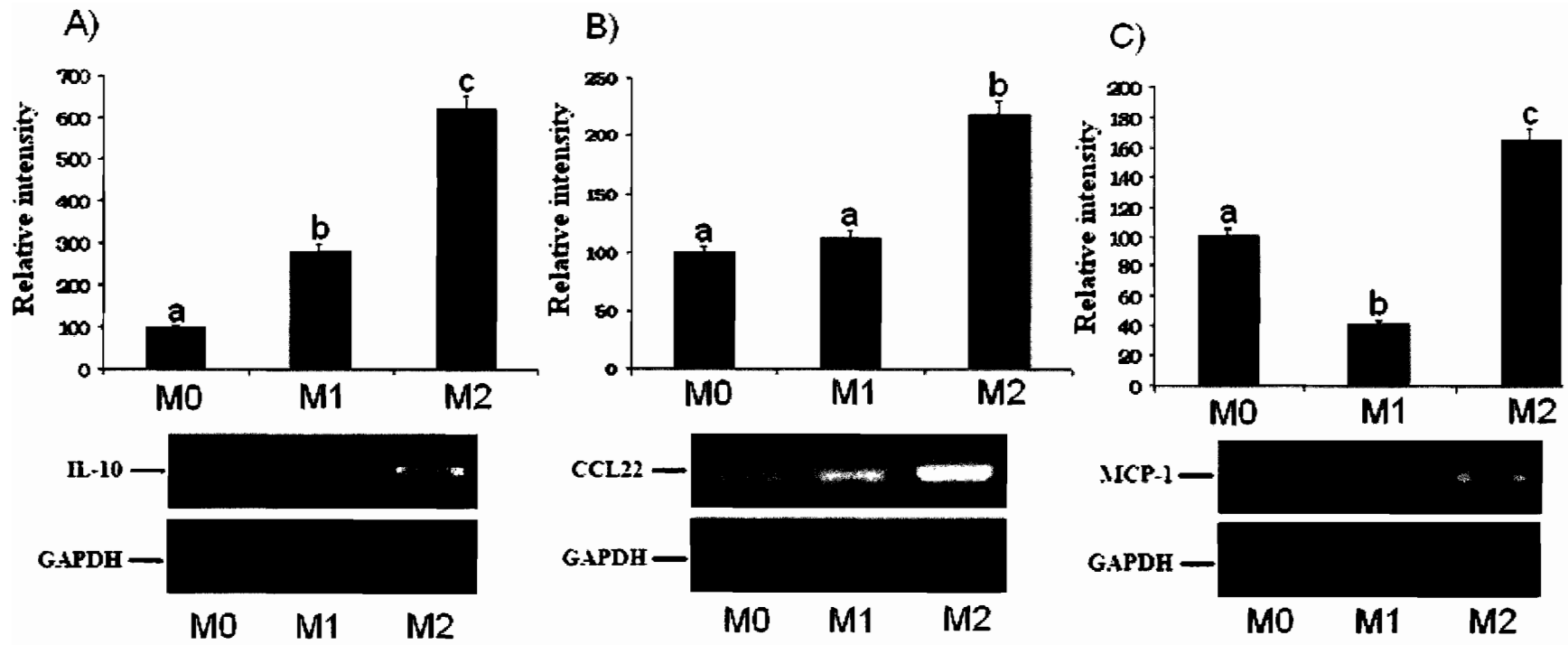


Figure 6.

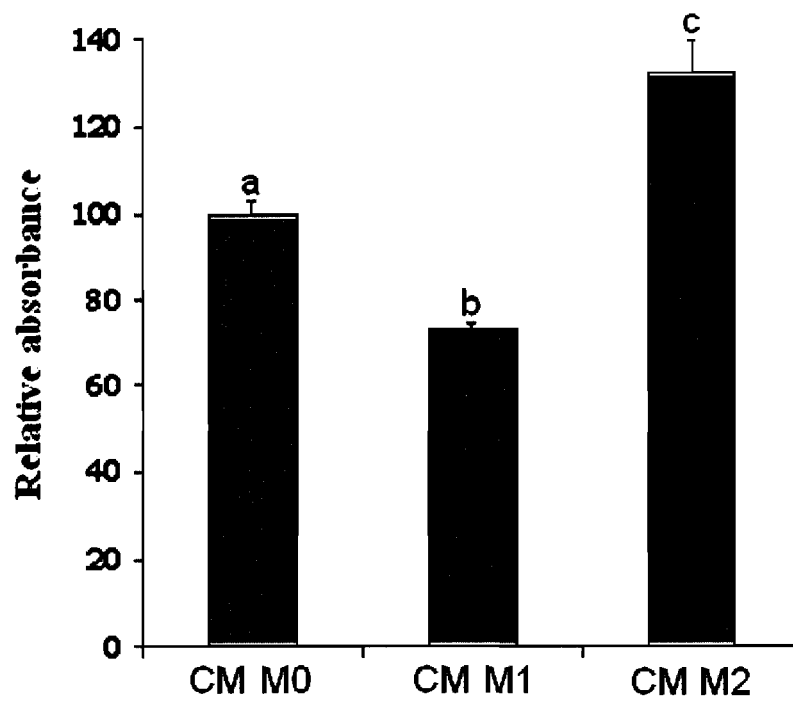


Figure 7.

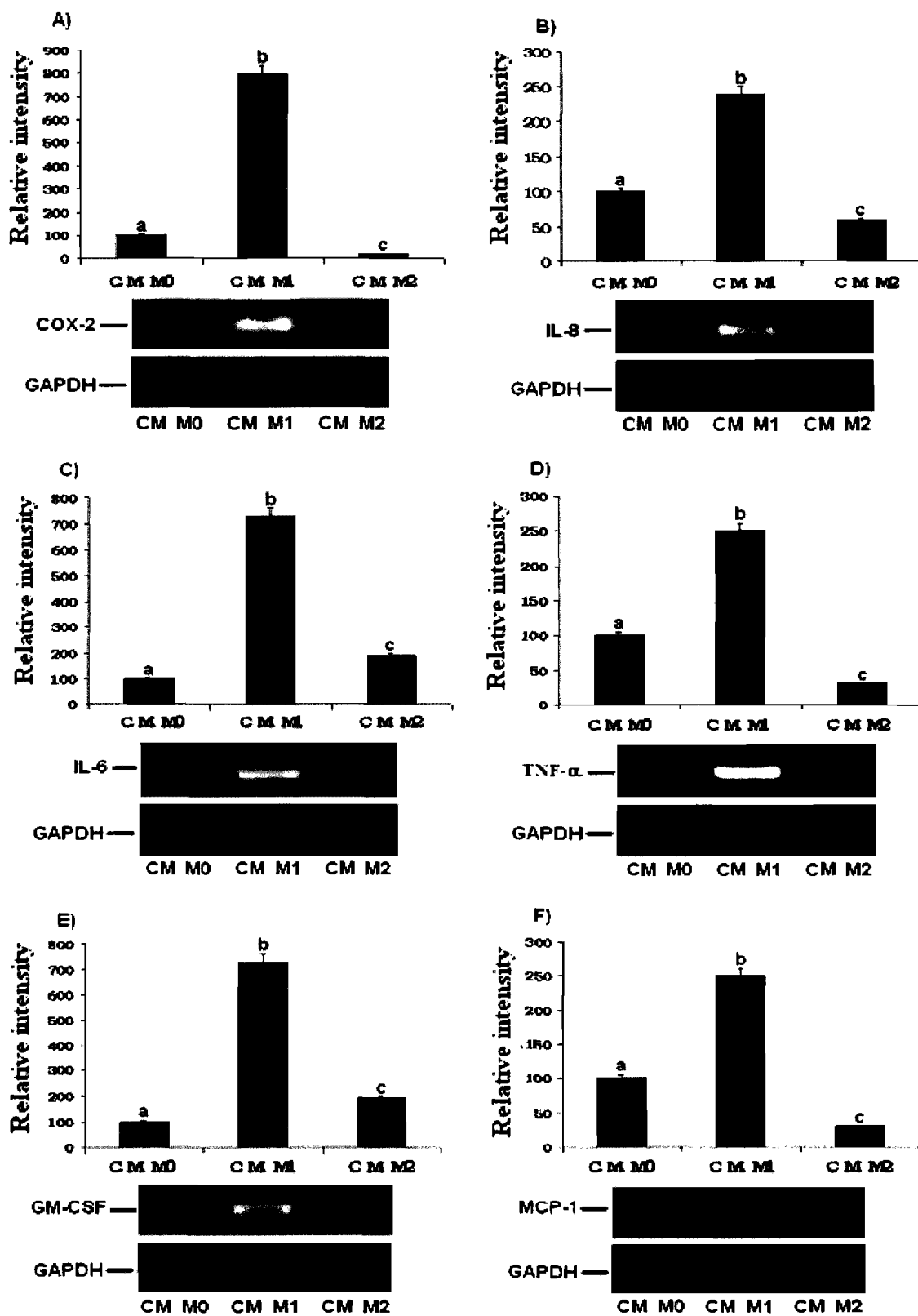


Figure 8.

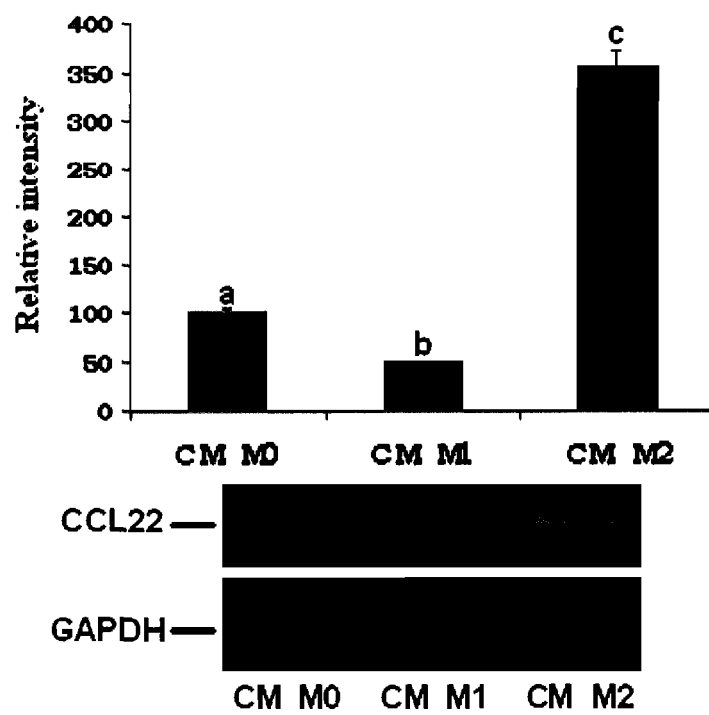


Figure 9.



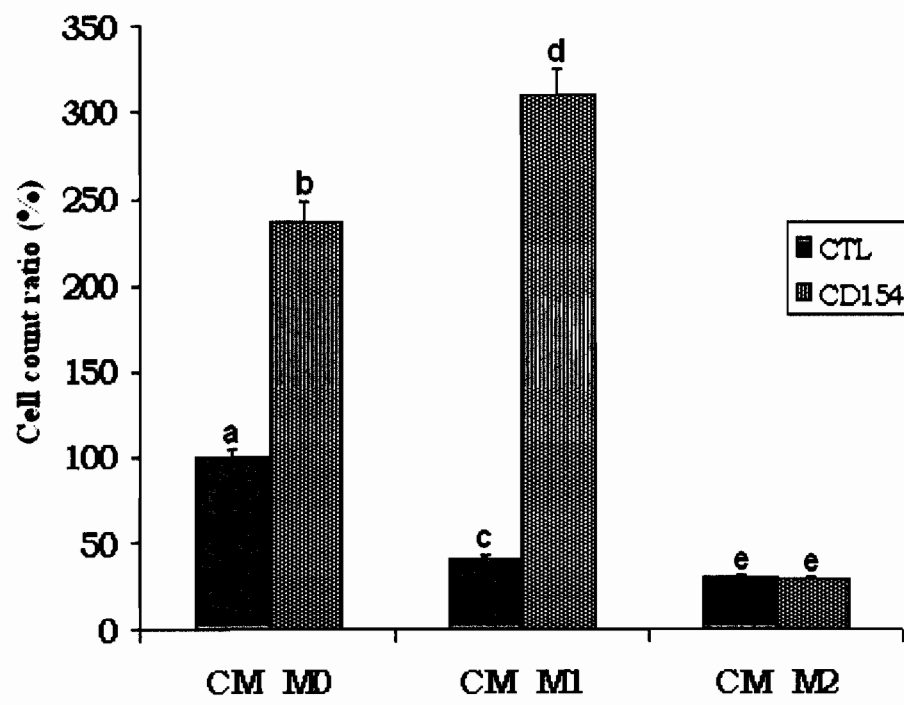
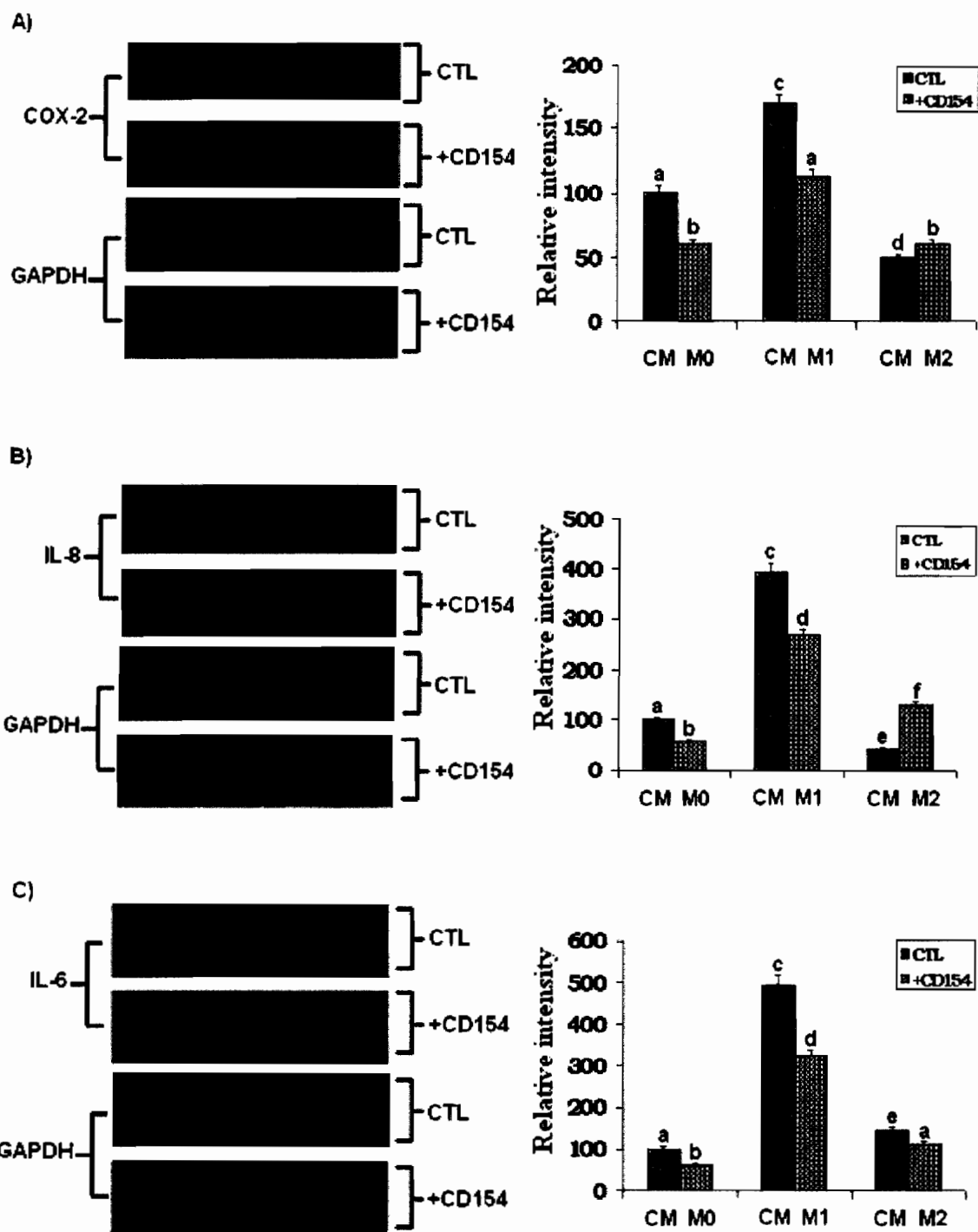


Figure 10.



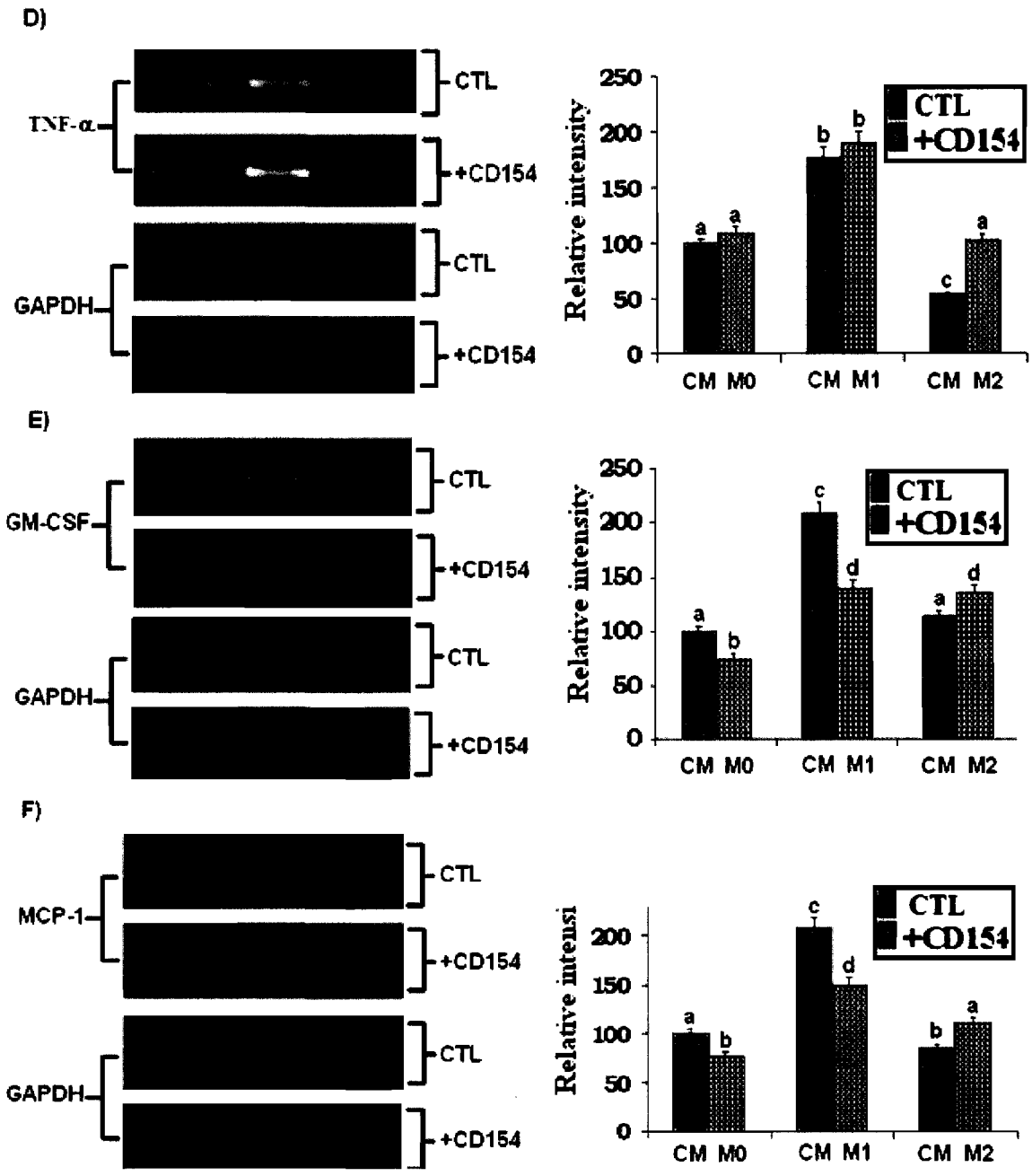
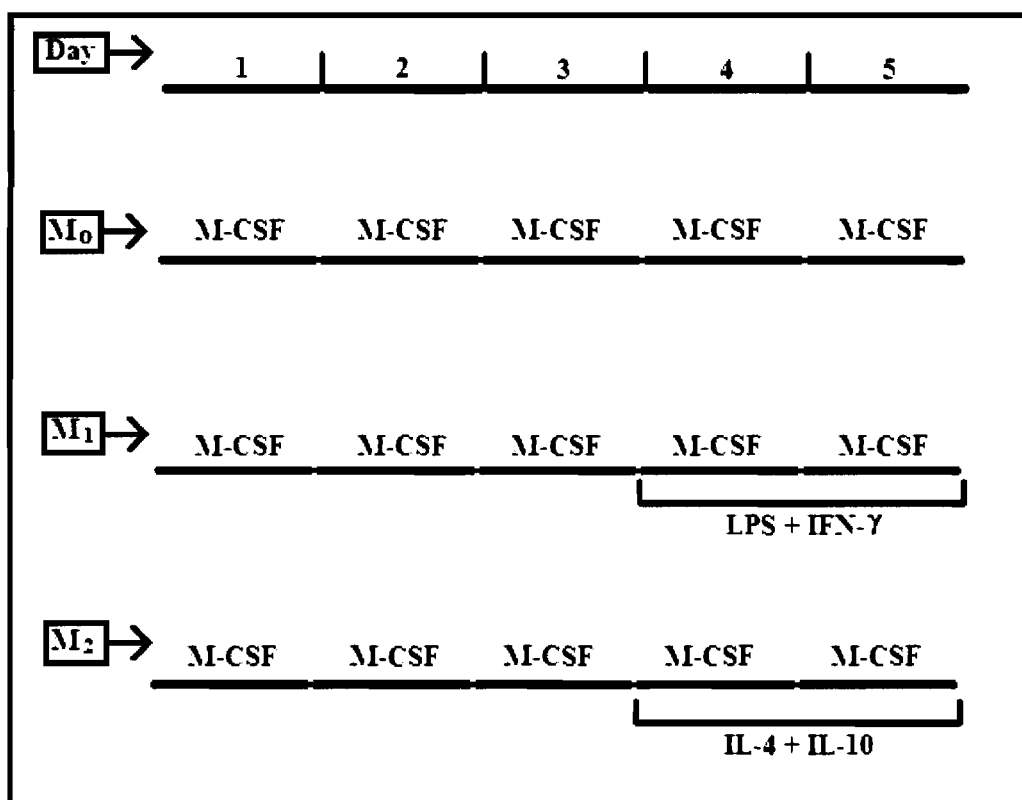


Figure 11.

**TABLE 1****M0, M1 and M2 macrophages differentiations**

After peripheral blood monocytes extracted, cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 72 hours in RPMI 1640 supplemented with 5% FBS and 10 ng/ml of M-CSF. Then, the media was removed and cells were incubated for 48 hours at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 supplemented with 10 ng/ml of M-CSF for M0, M1 and M2 differentiations. For M1 differentiation, the media was supplemented with 100 ng/ml of LPS and 25 U/ml of IFN- $\gamma$ . For M2 differentiation, the media was supplemented with 20 ng/ml of IL-4 and 20 ng/ml of IL-10.



**TABLE 2****Primers sequences used for PCR**

5  $\mu$ l of each cDNA sample was added to 45  $\mu$ l of a PCR reaction mixture containing 5  $\mu$ l of PCR buffer (10X), 2  $\mu$ l of dNTPs 5mM, 2.5  $\mu$ l of sense and anti-sense primers 12  $\mu$ M and 0.3  $\mu$ l (30 mU) of Taq DNA Polymerase. Reaction mix was completed with autoclaved water. To confirm that equal quantities of cDNA were used and to semiquantify the PCR products, GAPDH was used as the “housekeeping” gene.

Primer	Sequence	Size (bp)
GAPDH sense	5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'	212
GAPDH anti-sense	5'-TGAGCTTGACAAAGTGGTCG-3'	
COX-2 sense	5'-TGAGCATCTACGGTTTGCTG-3'	158
COX-2 anti-sense	5'-TGCTTGTCTGGAACAACCTGC-3'	
IL-6 sense	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3'	610
IL-6 anti-sense	5'-TGGACTGCAGGAACTCCTT-3'	
IL-8 sense	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3'	300
IL-8 anti-sense	5'-TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAA-3'	
IL-10 sense	5'-TGAGAACCAAGACCCAGACA-3'	182
IL-10 anti-sense	5'-TCATGGCTTTGTAGATGCCT-3'	
TNF- $\alpha$ sense	5'-CAGAGGGAAGAGTCCCCAG-3'	325
TNF- $\alpha$ anti-sense	5'-CCTTGGTCTGGTAGGAGACG-3'	
TGF- $\beta$ sense	5'-GGCAGTGGTTGAGCCGTGGA-3'	531
TGF- $\beta$ anti-sense	5'-TGTTGGACAGCTGCTCCACCT-3'	
GM-CSF sense	5'-TTCTGCTTGTCATCCCCTTT-3'	214
GM-CSF anti-sense	5'-CTTCTGCCATGCCTGTATCA-3'	
MCP-1 sense	5'-TTCTGTGCCTGCTGCTCATA-3'	203
MCP-1 anti-sense	5'-CAGATCTCCTTGGCCACAAT-3'	
CCL22 sense	5'-ACTGCACTCCTGGTTGTCCTCG-3'	172
CCL22 anti-sense	5'-GCCTCGGGCAGGAGTCTGAGGTCCAGTAG-3'	

**TABLE 3****PCR conditions for GAPDH, COX-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, MCP-1 and CCL22 primers**

After having realised the PCR reaction mixture, samples were heated at 94-95°C for 5 minutes to denaturate DNA double strains. Then, samples entered in a 20-45 cycles of denaturation-primers annealing-elongation where temperature and heating time change at each step. A 5 minutes final elongation is next realised before to put samples on ice. PCR reaction is realised by the Thermal Cycler Automation (Bio-Rad Laboratories).

Primers	Pre-denaturing	Denaturation	Annealing	Elongation	Final elongation	Termination	Cycle
GAPDH	94°C 5 min	94°C 30 s	58°C 30 s	72°C 30 s	72°C 5 min	4°C	20
COX-2	94°C 5 min	94°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30 s	72°C 5 min	4°C	30
IL-6	94°C 5 min	94°C 30 s	62°C 30 s	72°C 30 s	72°C 10 min	4°C	30
IL-8	94°C 5 min	94°C 30 s	61°C 30 s	72°C 30 s	72°C 5 min	4°C	30
IL-10	94°C 5 min	94°C 40 s	62°C 40 s	72°C 60 s	72°C 5 min	4°C	45
TNF- $\alpha$	94°C 5 min	94°C 30 s	57.5°C 30 s	72°C 30 s	72°C 5 min	4°C	35
TGF- $\beta$	95°C 5 min	95°C 60 s	60.5°C 40 s	72°C 60 s	72°C 10 min	4°C	35
GM-CSF	94°C 5 min	94°C 30 s	57.5°C 30 s	72°C 30 s	72°C 5 min	4°C	35
MCP-1	94°C 5 min	94°C 30 s	61°C 30 s	72°C 30 s	72°C 5 min	4°C	30
CCL22	94°C 5 min	94°C 30 s	63°C 30 s	72°C 60 s	72°C 5 min	4°C	35

## CHAPITRE 7

### DISCUSSION

#### 7.1 Mise en contexte de la discussion

Une inflammation chronique est observée dans la plupart des sites néoplasiques. Celle-ci, qui serait en partie causée par la présence persistante des macrophages dans l'environnement tumoral, favorise la croissance de la tumeur par l'action de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (16). Au cours des dernières années, plusieurs études ont été réalisées dans le but d'éclaircir le rôle des macrophages présents dans les tumeurs. Les résultats de ces études suggèrent que la majorité des macrophages présents dans la tumeur sont principalement de phénotype 2 (M2). Ceux-ci, en facilitant l'angiogénèse et le remodelage des tissus, seraient par conséquent pro-tumoraux. Au contraire, les macrophages de phénotype 1 (M1) sécrèteraient des cytokines pro-inflammatoires induisant une réponse immunitaire anti-tumorale (90). Malgré les nombreuses recherches effectuées, les mécanismes par lesquels ces macrophages participent à la progression tumorale n'ont pas encore été complètement éclaircis. Cependant, certaines études ont démontré que la glycoprotéine transmembranaire CD40, un puissant activateur des macrophages, serait un élément clé du développement de certaines maladies chroniques inflammatoires et du cancer (148). L'étude de l'activation de CD40 pourrait donc se révéler être très utile pour mieux comprendre le rôle des macrophages associés aux tumeurs. Il est connu que les monocytes isolés du sang peuvent être différenciés en M1 en les stimulant avec IFN- $\gamma$ / LPS et en M2 via IL-4/IL-10 (74). LPS est un composant de la membrane externe des bactéries gram-négatives et est un des activateurs les plus puissants des monocytes et des macrophages (231). IFN- $\gamma$  est produit par les lymphocytes Th1/Tc1 alors que IL-4 et IL-10 sont produits par les lymphocytes Th2/Tc2 (232, 233). En isolant les monocytes du sang de personnes normales, nous avons alors toutes les ressources nécessaires à la différenciation de ceux-ci en M1 et M2 afin de procéder à notre projet de recherche. Les objectifs de nos travaux étaient de tester les effets des macrophages M1 et M2 sur des cellules tumorales

du cancer de la vessie ainsi que l'activation de CD40 chez les macrophages différenciés sur ces cellules cancéreuses.

## 7.2 Isolation des monocytes

Afin de réaliser nos objectifs, nous devons tout d'abord isoler les monocytes à partir du sang. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode Double Densité se basant sur la densité spécifique des cellules mononucléaires et la capacité d'adhésion des monocytes à des plaques de culture cellulaire (225). Nous avons utilisé cette méthode d'extraction des monocytes puisqu'elle permet l'isolation de près de  $2,0 \times 10^8$  monocytes à partir de 350 mL de sang en plus de nécessiter un minimum d'équipement. De plus, cette technique permet d'obtenir des monocytes avec une pureté pouvant atteindre 95%. Cependant, nous nous sommes assurés d'isoler efficacement les monocytes en procédant à des analyses par cytométrie de flux. La cytométrie de flux permet de déterminer le niveau d'expression d'une protéine, dans ce cas-ci membranaire, détectée via un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt et révélée via un anticorps secondaire jumelé à un fluorochrome. Chaque cellule d'une population particulière est analysée une par une par l'appareil. Il est donc possible de visualiser le niveau d'expression de cette protéine pour chaque cellule plutôt que d'avoir une expression strictement qualitative telle que perçue lorsqu'on utilise la technique de Western Blot. L'analyse par cytométrie de flux est aussi beaucoup plus simple que le Western Blot, puisqu'on analyse directement les cellules, ce qui évite plusieurs biais. Nous avons ainsi détecté l'expression de CD14, un récepteur du LPS spécifique de la lignée des monocytes/macrophages, à la surface des cellules extraites. Nous avons également détecté CD40, notre protéine d'intérêt, et CMHII, une protéine membranaire liant l'antigène chez les cellules présentatrices de l'antigène (54, 90, 234). Par conséquent, nos résultats confirment que les cellules isolées du sang selon notre protocole correspondent au phénotype des cellules monocytaires.



### 7.3 Différenciation et caractérisation des macrophages

Nous avons ensuite procédé à la différenciation des monocytes en macrophages M0, M1 ou M2. Les macrophages M0, uniquement activés avec M-CSF pendant 5 jours, représentent les cellules contrôles (voir section matériel et méthodes de l'article). M-CSF est responsable de la prolifération des monocytes et de leur différenciation en macrophages (235). Afin de générer la polarisation vers les phénotypes M1 et M2 des macrophages, le milieu de culture était remplacé après 3 jours d'activation avec M-CSF. Pour les jours 4 et 5, nous ajoutons, en plus de M-CSF, les facteurs relatifs à chaque état de polarisation désiré, soit : IFN- $\gamma$  et LPS pour obtenir le phénotype M1; ainsi que IL-4 et IL-10 pour le phénotype M2. Nous avons tout d'abord procédé à un test de prolifération des monocytes activés avec M-CSF (M0). Les analyses de la prolifération des monocytes isolés du sang et des THP1 activés par M-CSF démontrent une augmentation du taux de prolifération par rapport aux cellules non-activées. Ce résultat démontre que les monocytes répondent à l'activation par M-CSF. La lignée de monocytes THP1 a été utilisée afin de soutenir les résultats obtenus avec les monocytes isolés du sang (236). Par la suite, des analyses de type Western Blot, de cytométrie en flux et de RT-PCR ont été effectuées avec les 3 différents types de macrophages.

Les analyses de type Western Blot sur l'expression de la protéine CD68 chez les M0, M1 et M2 confirment l'état de différenciation des macrophages puisque CD68 est un récepteur des lipoprotéines à faible densité (LDL) spécifique des macrophages (237, 238). En effet, nous constatons un niveau d'expression de CD68 égal chez les différents phénotypes de macrophages. Ainsi, les stimulations effectuées afin d'induire les différents phénotypes permettent toutes la différenciation des monocytes en macrophages. Nous avons également analysé par Western Blot l'expression de CD16, un récepteur Fc reconnu pour être plus exprimé par les M1 (74). Nous remarquons une expression plus importante de CD16 chez les M1 que chez les M0 ou M2. Cette expression de CD16 par les M1 corrèle avec leur fonction de cellules effectrices de l'ADCC qu'ils induisent via leurs récepteurs Fc (76, 239).

Les analyses par cytométrie en flux révèlent que les M1 expriment davantage le récepteur de LPS CD14 que les M0 et les M2. Ce résultat est en concordance avec le rôle des M1 dans l'élimination des microorganismes. Les M2 expriment moins de CD14 à leur surface que les M0 et les M1. Cette plus faible expression de CD14 observée chez les M2 corrèle avec les fonctions immunosuppressives des cytokines IL-4 et IL-10 inductrices de la polarisation des M2. Nous avons également observé, par cytométrie en flux, une augmentation de l'expression de CD40 chez les M1 par rapport aux M2 qui expriment le même niveau de CD40 que les M0. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'IFN- $\gamma$  est reconnu pour induire l'expression de CD40 (200). Les résultats concernant l'expression de CD40 chez les différents phénotypes de macrophages ont été confirmés par Western Blot.

Nous avons ensuite analysé par RT-PCR l'expression de différents marqueurs génétiques spécifiques des macrophages M1 ou M2 selon la littérature. Les analyses de type RT-PCR ne sont pas quantitatives, mais plutôt semi-quantitatives, c'est-à-dire qu'elles ne permettent pas de savoir le niveau d'expression exact d'un gène, mais permettent de comparer ce niveau d'expression entre plusieurs échantillons. L'analyse d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- $\alpha$  démontre une importante augmentation de leur expression chez les M1 comparativement aux M0 et M2. Ces cytokines pro-inflammatoires sont reconnues selon la littérature pour être davantage exprimées par les M1 (74). Nous avons également constaté une augmentation de l'expression des facteurs pro-inflammatoires COX-2, GM-CSF et de la cytokine immunosuppressive TGF- $\beta$ 1 chez les M1. Il est reconnu que COX-2 peut être induit par le LPS alors que GM-CSF peut être induit par certaines cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et IL-6 (216, 240). TGF- $\beta$ 1 est la seule cytokine anti-inflammatoire davantage exprimée par les M1 que par les M2. Il se peut qu'elle soit impliquée dans un système d'autorégulation servant à permettre une réponse inflammatoire appropriée. En effet, comme nous l'avons expliqué dans l'introduction de ce travail, l'inflammation n'échappe pas à l'homéostasie (1). La production de protéines inflammatoires induit l'expression de facteurs anti-inflammatoires permettant de limiter les dégâts tissulaires pouvant être engendrés par les différents facteurs inflammatoires. Certaines études ont démontré l'implication de TGF-

$\beta 1$  dans l'inactivation des macrophages lors d'infections bactériennes (70, 241, 242). Une autre étude a par ailleurs démontré que la neutralisation de TGF- $\beta 1$  lors d'infections augmentait la destruction des bactéries par l'organisme (243). Cependant, les études portant sur le rôle de TGF- $\beta 1$  dans l'inflammation présentent plusieurs résultats contradictoires. Cette cytokine nécessite donc encore plusieurs études afin d'éclaircir son rôle immunologique. On observe également une augmentation de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 chez les M1, mais d'une manière moins importante que chez les M2. Cependant, tous les autres facteurs dont nous avons observé une augmentation de l'expression chez les M1 (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, COX-2 et GM-CSF) sont pro-inflammatoires. Ainsi, l'expression de ces différents facteurs corrèle avec le caractère inflammatoire des M1.

Nous avons également analysé l'expression génique d'IL-10, de CCL22 et de MCP-1. Ces trois cytokines sont reconnues dans la littérature comme étant spécifiques aux M2 (40, 74). L'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, bien qu'elle augmente chez les M1 par rapport aux M0, est significativement plus importante chez les M2. Nous avons également remarqué par RT-PCR que la chémokine immunosuppressive CCL22 est plus exprimée par les M2 que par les M0 et M1 qui l'expriment avec la même intensité. *In vivo*, MCP-1, tout comme CCL22 et IL-10, contribuent à la polarisation des Th2, favorisant ainsi l'activation des cellules B et une réponse immunitaire davantage dépendante des anticorps et anti-inflammatoire (39, 86). Ainsi, l'augmentation de l'expression de ces trois cytokines chez les M2 corrèle avec le rôle immunosuppresseur de ces macrophages.

Suite aux différents résultats que nous avons recueillis par Western Blot, RT-PCR et cytométrie en flux, nous pouvons affirmer que les différentes stimulations des monocytes ont permis leur différenciation en M1 ou M2. En effet, les résultats obtenus corrélaient avec les fonctions pro-inflammatoires des M1 et immunosuppressives des M2 ainsi qu'avec ce qui est établi expérimentalement concernant les marqueurs spécifiques aux macrophages M1 (CD16, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ ) et aux macrophages M2 (IL-10, MCP-1 et CCL22) (74, 76). Nous pouvions alors procéder aux analyses des T24

stimulées avec les MC de macrophages M0, M1 ou M2.

#### **7.4 Effet des M0, M1 et M2 sur la prolifération des T24**

Nous avons procédé à un test MTT afin de déterminer le niveau de prolifération des T24 incubées en présence de milieu conditionné de macrophages différenciés. Le test MTT est une analyse colorimétrique permettant de déterminer la prolifération cellulaire. Le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), de couleur jaune, est réduit par les réductases des mitochondries des cellules actives en formazan, un composé cristallin de couleur violette. Une solution de solubilisation composée d'acide chlorydrique et de dodécyl sulfate de sodium permet ensuite de dégrader les cellules et de solubiliser le formazan. La densité colorimétrique est alors dépendante du nombre de cellules viables. Il est important de noter que la densité colorimétrique n'est pas directement proportionnelle au nombre de cellules. En effet, une certaine densité de base est comprise à l'intérieur des résultats de densitométrie et représente la densité lorsqu'il n'y a aucune cellule de viable. Ce test possède les avantages d'être simple et reproductible. Le test de prolifération effectué avec les T24 incubées dans les MC provenant de macrophages révèle une augmentation de la prolifération chez les T24 incubées avec du MC de M2 par rapport aux cellules incubées dans du MC de M0. Nous pouvons alors affirmer que les macrophages M2 sécrètent des facteurs pro-tumoraux favorisant la prolifération tumorale. De plus, les T24 mises en plaque dans du MC de M1 démontrent une diminution de la prolifération. Ainsi, selon ces résultats, les macrophages polarisés M1 et M2 seraient impliqués de façon paracrine dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales du cancer de la vessie. Ces résultats corroborent avec le profil anti-tumoral des M1 et le profil pro-tumoral des M2 proposés par la littérature. Nous avons ensuite procédé à l'analyse par RT-PCR de facteurs pro-tumoraux chez les T24 stimulées avec les milieux conditionnés de macrophages différenciés.

## 7.5 Facteurs exprimés par les M0, M1 et M2 pouvant être impliqués dans la régulation de la prolifération des T24

Cette section est dédiée à l'analyse des facteurs exprimés par les M1 et M2 pouvant être impliqués dans la régulation de la prolifération des T24. Cette analyse portera autant sur les facteurs déjà connus pour être exprimés par les M1 selon la littérature (IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ ) que les autres ayant ressorti de notre étude (TGF- $\beta$ 1, COX-2 et GM-CSF). Il en va de même pour MCP-1, CCL22 et IL-10 chez les M2, déjà connus pour être exprimés par les M2 d'après la littérature (40, 74). TGF- $\beta$ 1, détecté chez les M1, présente plusieurs aspects pro-tumoraux. Cependant, tout comme TNF- $\alpha$ , le rôle de TGF- $\beta$ 1 en tant que promoteur ou suppresseur tumoral reste ambigu et dépend de l'état des récepteurs spécifiques à TGF- $\beta$ 1 exprimés par les cellules tumorales (244). On sait par contre que, *in vivo*, cette cytokine est impliquée dans les effets immunosuppressifs attribués aux cellules Treg (109). Quant à son implication directe sur la prolifération tumorale, elle dépend du type de cancer étudié. Dans le cas du cancer de la vessie, TGF- $\beta$ 1 est reconnu pour inhiber la prolifération de plusieurs lignées *in vitro*, dont les RT112/G2 (245). Il est donc probable que la prolifération des T24 soit inhibée par l'action de TGF- $\beta$ 1 sécrété par les M1. IL-10, dont nous avons démontré une augmentation de l'expression plus importante chez les M2, présente aussi certains aspects pro-tumoraux. Très peu d'études réalisées *in vitro* ne portent sur un effet potentiel d'IL-10 sur la prolifération tumorale. Cependant, Sica et son équipe ont démontré *in vivo* que IL-10, en plus d'être immunosuppresseur, favorise la croissance tumorale (246). Tel que mentionné précédemment pour les autres facteurs, des anticorps bloquant l'action de TGF- $\beta$ 1 et de IL-10 pourraient nous aider à déterminer l'implication réelle de ces cytokines dans la prolifération des T24. La plupart des cytokines dont nous avons démontré une augmentation de l'expression chez les M1 présentent plusieurs caractéristiques pro-tumorales, ce qui est en contradiction directe avec l'aspect anti-tumoral de ces macrophages privilégié par la littérature.

Plusieurs des autres facteurs pro-tumoraux dont nous avons constaté une augmentation de l'expression chez les macrophages polarisés présentent également une

augmentation de leur expression chez les T24 stimulées avec les MC de macrophages. Notamment, l'expression de COX-2, d'IL-6, d'IL-8, de GM-CSF et de TNF- $\alpha$  est augmentée chez les T24 incubées dans du MC de M1 de même que chez les M1 eux-mêmes. Même constatation dans le cas de CCL22 chez les T24 stimulées avec le MC de M2, exprimée aussi chez les M2. Nous poursuivrons donc l'étude de ces facteurs dans la prochaine section.

### **7.6 Effet des M0, M1 et M2 sur l'expression de facteurs pro-tumoraux des T24**

Afin de savoir quels facteurs pro-tumoraux les macrophages activés induisent chez les T24, nous avons analysé par RT-PCR l'expression de gènes encodant pour COX-2, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, MCP-1 et CCL22. Le choix de ces médiateurs inflammatoires repose sur le fait qu'ils seraient fortement impliqués dans la promotion et la progression néoplasique, particulièrement dans le cas de cancers résultant d'une inflammation chronique. Nous proposerons donc quels facteurs parmi ceux-ci pourraient être impliqués dans la prolifération tumorale observée précédemment.

Nous avons remarqué une augmentation de l'expression d'IL-8 chez les T24 stimulées avec le MC de M1 contrairement à une diminution de cette expression chez les T24 stimulées avec le MC de M2. Le cancer le plus associé à IL-8 est sans contredit le mélanome. En effet, IL-8 est produit d'une manière constitutive par les cellules du mélanome et celles-ci expriment davantage CXCR2, le récepteur d'IL-8. La stimulation autocrine de ce récepteur induit la survie, la prolifération et la migration du mélanome (40, 44). Il est donc peu probable que IL-8 soit impliqué dans l'inhibition de la prolifération des T24 induite par les M1. De plus, comme IL-8 est faiblement exprimé par les T24 stimulées avec le MC de M2, il est également peu probable que IL-8 soit impliqué dans l'augmentation de la prolifération des T24. Cependant, comme IL-8 est impliqué dans l'angiogénèse et la migration tumorale dans certains cancers, il se pourrait que son expression *in vitro* influence l'invasion tumorale des T24. Ainsi, les M1 pourraient favoriser la progression tumorale via l'induction d'IL-8 par les cellules néoplasiques du cancer de la vessie (91, 213). De plus, IL-8 est associé à la cystite et

pourrait alors être impliquée dans la progression tumorale induite par l'inflammation chronique (247).

Nous avons également observé par RT-PCR une augmentation de l'expression de COX-2 chez les T24 stimulées avec du MC de M1. Au contraire, nous avons observé une diminution de cette expression chez les T24 stimulées avec du MC de M2. Plusieurs études ont mis en évidence un rôle potentiel de COX-2 dans le développement du cancer de la vessie. En effet, il a été prouvé que COX-2 est surexprimé chez les cellules de carcinomes transitionnels (TCC) invasifs et non-invasifs du cancer de la vessie en plus d'être positivement associé avec le stade et le degré de différenciation des TCC (248-250). Une étude menée par Shirahama et son équipe a révélé une corrélation directe entre la surexpression de COX-2 et l'angiogénèse observée dans le cancer de la vessie (251). Afin de confirmer le rôle de COX-2 dans la progression du cancer de la vessie, Klein et ses associés ont démontré que l'augmentation de l'expression de COX-2, sous le contrôle d'un promoteur de la kératine 5 chez des souris transgéniques, est suffisante pour causer une hyperplasie transitionnelle de la vessie et ultimement un carcinome transitionnel (252). Enfin, COX-2 induit la synthèse de prostaglandines (216). Celles-ci, particulièrement PGE<sub>2</sub>, sont d'importants facteurs angiogéniques et favorisent la polarisation des macrophages en M2 (76, 217). Ainsi, COX-2 est un facteur davantage pro-tumoral et il serait peu probable qu'il soit impliqué dans l'inhibition de la prolifération des T24 par les M1. Par conséquent, en plus d'IL-8, nous avons démontré que les M1, même s'ils inhibent la prolifération des T24, induisent l'expression du facteur pro-tumoral COX-2.

On remarque aussi une augmentation de l'expression d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  chez les T24 stimulées avec le MC de M1. Les T24 stimulées avec le MC de M2 présentent un faible niveau d'expression de ces cytokines par rapport aux T24 stimulées avec le MC de M1. TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire détectée souvent en association avec IL-6 dans plusieurs cancers tels que le cancer des ovaires, du sein, de la prostate et de la vessie (16). L'action de cette cytokine pro-inflammatoire est paradoxale. Lorsqu'elle est présente de manière chronique dans l'environnement tumoral, elle contribue au

développement de la charpente du tissu nécessaire à la croissance de la tumeur et à la dispersion de métastases. Elle peut également induire la production de facteurs angiogéniques et de métalloprotéases en plus d'augmenter la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. Cependant, TNF- $\alpha$  participe à la destruction des cellules cancéreuses en induisant la production de NO par les macrophages (253). Ainsi, il se pourrait que l'inhibition de la prolifération observée chez les T24 stimulées avec du MC de M1 soit provoquée par la production de NO par les macrophages, celle-ci étant induite par l'augmentation de l'expression de TNF- $\alpha$  chez les T24. Par conséquent, cette cytokine peut être considérée comme ayant des effets pro et anti-tumoraux (210). Afin de vérifier cette hypothèse, il serait possible de réaliser la réaction de Griess, une des méthodes permettant la détection de NO. Brièvement, cette technique mesure indirectement la concentration de NO via le dosage du nitrite (NO<sub>2</sub>-), un produit de dégradation du NO. Le test repose sur une réaction de diazotation entre le nitrite et l'acide sulphanilique. Après 10 minutes d'incubation, une solution de *N*-1-naphthyléthylènediamine dihydrochloride (NED) est ajoutée à l'échantillon. Le composé Azo qui en résulte colore la solution et l'intensité de l'absorbance est alors directement proportionnelle à la concentration en nitrite de l'échantillon (254). IL-6, quant à lui, est reconnu comme un stimulus de la réponse Th2 et un inhibiteur de la réponse Th1 (22). Cet aspect d'IL-6 a été constaté notamment dans le cas de cystite interstitielle, une maladie inflammatoire de la vessie pouvant dégénérer en cancer. Chez les individus souffrant de cette maladie, IL-6 est retrouvé en très grande quantité dans l'urine (255). Par conséquent, IL-6 présente un profil davantage pro-tumoral et il serait peu probable que cette cytokine induise l'inhibition de la prolifération des T24 stimulées par le MC de M1.

Nous avons ensuite analysé l'expression de MCP-1. Nous avons observé une augmentation de son expression chez les T24 incubées dans le MC de M1 et une inhibition chez les T24 stimulées avec les M2. Nous avons déjà discuté du caractère pro-angiogénique de MCP-1 et de sa contribution à la polarisation des Th2, ce qui en fait une cytokine pro-tumorale et anti-inflammatoire. MCP-1 est reconnu depuis longtemps pour attirer les macrophages dans la tumeur. Dans le cas du cancer de la vessie, un haut



niveau de TAM correspond à un pronostic pauvre (146, 256). L'augmentation de l'expression de MCP-1 chez les T24 activées avec le MC de M1 nous permet de proposer un mécanisme de la progression tumorale pouvant être induite par les TAM. En effet, les M1, en induisant l'expression de MCP-1 par les T24, permettraient ainsi l'attraction des M2 puisque ceux-ci expriment davantage CCR2, le récepteur de MCP-1 (40, 74). Cette chémokine présente donc plusieurs caractéristiques pro-tumorales. Par conséquent, on peut supposer qu'elle n'est pas impliquée dans l'inhibition de la prolifération des T24 stimulées avec le MC de M1.

Nous avons aussi observé, comme pour les facteurs analysés précédemment, une augmentation de l'expression de GM-CSF chez les T24 stimulées avec le MC de M1. Quant à l'expression de GM-CSF chez les T24 stimulées avec le MC de M2, on remarque aussi une augmentation mais beaucoup plus faible qu'avec le MC de M1. GM-CSF est considéré comme un puissant activateur de la cytotoxicité en plus d'augmenter l'activité phagocytaire des macrophages (35, 36). Par contre, dans le contexte du cancer de la vessie, une étude réalisée par Block et son équipe a démontré une augmentation de la prolifération *in vitro* chez certaines lignées cellulaires, dont les T24, activées via GM-CSF (38). Cependant, une autre étude menée par Wu a utilisé des souris auxquelles on a implanté à l'intérieur de la vessie des cellules de carcinome transitionnel de la vessie transfectées avec les gènes codant pour GM-CSF et IFN- $\alpha$  (257). Les résultats ont démontré que 100 % des souris traitées étaient toujours vivantes après 27 jours comparativement à 69 % chez les souris contrôles. 92 % des souris chez qui on avait implanté les mêmes cellules mais n'exprimant que GM-CSF ont survécu. D'autre part, une autre étude testant 10 gènes de cytokines et de molécules d'adhésion transfectés dans des cellules de mélanome a révélé que GM-CSF était la cytokine démontrant le meilleur effet anti-tumoral (37). Cette même étude a également démontré, *in vitro*, une diminution de la prolifération cellulaire des cellules tumorales non-transfectées et stimulées par GM-CSF. Ainsi, GM-CSF semble être, parmi les cytokines analysées, l'une des plus anti-tumorales pouvant expliquer la diminution de la prolifération des T24 incubées avec du MC de M1.

Enfin, nous avons observé une augmentation de l'expression de CCL22 chez les T24 incubées dans du MC de M2. CCL22 est la cytokine la moins contradictoire quant à ses aspects pro-tumoraux et anti-inflammatoires. Cependant, la majorité des études sur l'implication de CCL22 dans la progression tumorale ont été réalisées *in vivo* et repose sur le rôle de CCL22 dans l'attraction des cellules Treg. Dans le cas du cancer de la vessie, une étude récente a démontré l'effet antagoniste de CCL22 au traitement à la BCG (147). CCL22, exprimé chez plusieurs cas cliniques de cancer de la vessie, oppose une résistance à l'environnement Th1 induit par la BCG en attirant les lymphocytes Treg. De plus, comme nous l'avons démontré, CCL22 est aussi exprimé par les M2. Aucune donnée cependant n'est compilée jusqu'à ce jour sur l'effet *in vitro* de CCL22 sur la prolifération cellulaire tumorale. Par conséquent, il serait intéressant de tester la prolifération des T24 incubées dans du MC de M2 additionné d'un inhibiteur de CCL22 ou d'un agent bloquant la liaison à son récepteur.

Afin de vérifier si les effets observés concernant la prolifération des T24 proviennent de facteurs produits par les cellules tumorales et/ou des macrophages, la technologie de l'ARN interférant pourrait être utilisée. Brièvement, l'insertion d'un vecteur d'expression pour un petit ARN (21-25 paires de bases) double brin à des cellules permet l'inactivation d'un ARNm complémentaire à l'ARN double brin via l'activation d'un complexe protéique clivant l'ARNm. Ainsi, il sera possible de faire produire un ARN double brin de 21 à 25 paires de bases spécifique à l'ARNm d'une protéine particulière produite soit par les macrophages, soit par les cellules tumorales. Il serait alors possible de déterminer si les effets observés proviennent de l'activation d'un gène particulier chez les macrophages ou chez les T24. Les gènes en question sont COX-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF (exprimés par les M1 et les T24 stimulées avec le MC de M1) et CCL22 (exprimés par les M2 et les T24 stimulées avec le MC de M2).

Il serait intéressant, dans le futur, d'analyser la prolifération des T24 incubées dans du MC de macrophages M1 ou M2 en présence ou non d'un anticorps bloquant spécifique à GM-CSF. Un anticorps bloquant l'action de TNF- $\alpha$  pourrait aussi être utilisé puisqu'il est reconnu que celui-ci induit la production de NO par les macrophages.

De cette façon, nous pourrions constater si la diminution de la prolifération des T24 par les M1 est causée par l'induction de l'expression de GM-CSF ou de TNF- $\alpha$  chez les T24. Il serait également intéressant de faire de même avec toutes les cytokines analysées afin de démontrer définitivement lesquelles favorisent ou nuisent à la prolifération des T24 et ainsi trouver lesquelles seraient les meilleures cibles pour une approche thérapeutique. Dans le cas de COX-2, des NSAID pourraient être utilisés afin d'inhiber l'action de cette enzyme et évaluer l'implication des prostaglandines, si tel est le cas, dans la prolifération tumorale des T24.

### **7.7 Effet de l'activation de CD40 des M0, M1 et M2 sur les T24**

Nous avons ensuite procédé à un test d'invasion des T24. Ce test consiste à déposer un certain volume de Matrigel, une matrice artificielle homologue à l'espace interstitiel, dans un puit comportant un fond constitué d'un filtre de polycarbonate. Ce puit est alors déposé dans un autre contenant du RPMI 10 % FBS. Les différentes molécules chémoattractantes contenues dans le sérum permettent alors d'attirer les cellules déposées sur le Matrigel et de migrer au travers de celui-ci. Le filtre de polycarbonate permet le passage des molécules chémoattractantes mais pas celui des cellules. Les cellules soumises aux différentes conditions migreront en fonction de l'expression de facteurs dégradant le Matrigel ou d'intégrines induite par les conditions de culture. Après 24-48 heures, nous comptons alors le nombre de cellules qui ont réussi à atteindre le filtre. Ce test possède l'avantage, dans notre cas, de permettre l'analyse de plusieurs conditions avec un minimum de milieu conditionné (200  $\mu$ l/condition). De plus, le Matrigel utilisé confère à ce test la possibilité d'observer l'invasion des cellules tumorales dans un environnement *in vitro* reconnu pour être le plus représentatif des conditions *in vivo* (258).

Les résultats du test d'invasion démontrent que les T24 stimulées avec les MC de M0 sont plus invasives que les T24 stimulées avec les MC de M1 et M2. Ainsi, les différents facteurs propres à chaque phénotype de macrophages ou induits par ceux-ci chez les T24 ne favorisent pas directement l'invasion tumorale. Cependant, une fois les

M0 et M1 activés via CD40, certains facteurs alors produits par ceux-ci permettent une invasion beaucoup plus importante des T24 tandis qu'aucune augmentation ou diminution de l'invasion n'est observée chez les T24 stimulées avec du MC de M2 activés via CD40. Tel que discuté dans la section 4.6, IL-4 et IL-10 inhibent l'activation de certaines protéines de signalisation impliquées dans la réponse induite par CD40. Ces protéines sont les kinases ERK1, ERK2, p38 ainsi que les facteurs de transcription STAT-1 et NF- $\kappa$ B (165, 195, 202). Ainsi, l'inactivation chez les M2 de certaines voies de signalisation propres à CD40 ajoutée à la plus faible expression de CD40 par ces macrophages peuvent expliquer que l'on observe aucun changement de l'invasion tumorale suite à l'activation des M2 via CD40. Les facteurs produits par les macrophages M1 suite à l'activation de CD40 permettant l'invasion des T24 sont donc induits via l'activation d'une ou plusieurs de ces protéines de signalisation. Nous pouvons proposer plus spécifiquement l'implication de NF- $\kappa$ B dans l'invasion tumorale induite par les macrophages. Tel que discuté dans la section 4.7, l'activation de CD40 induit l'expression de uPA via, entre autres, la kinase PI3K et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (219). uPA est reconnu pour activer certaines MMP, dont MMP-9 (220). Les M1 produisent certains facteurs pro-inflammatoires reconnus pour induire l'expression de plusieurs MMP nécessitant d'être activées (74, 93, 213, 214). Ces MMP, une fois actives, permettent d'accélérer la digestion de la matrice intercellulaire et facilitent alors l'invasion des cellules tumorales (80). L'activation de CD40 chez les M1 pourrait donc induire l'expression de uPA allant activer les MMP déjà produites par les M1. Par conséquent, comme nous l'avons démontré, les M1 nécessiteraient d'être activés via CD40 pour induire l'invasion tumorale. De plus, IL-10 inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B chez les macrophages activés via CD40 (195). Ainsi, les M2 ne produiraient pas d'uPA, ce qui n'activerait pas les MMP pouvant être produites par ceux-ci. Les M2, activés ou non via CD40, ne favoriseraient donc pas l'invasion tumorale. Un inhibiteur chimique spécifique à NF- $\kappa$ B, tels que PS1145 ou SN50, pourrait nous permettre de déterminer l'implication de ce facteur de transcription dans l'induction de l'expression des facteurs permettant l'invasion tumorale. Enfin, ces résultats sont en concordance avec une étude démontrant que les macrophages induisent l'invasion tumorale via des voies de transduction empruntant NF- $\kappa$ B et JNK, deux facteurs de transduction nécessaires à la

réponse intracellulaire de CD40 (259).

Nous avons ensuite analysé l'expression par RT-PCR de certains facteurs pro-tumoraux chez les T24 stimulées avec du MC de macrophages activés via CD40. Selon la littérature, l'activation de CD40 permet la production par les macrophages d'une myriade de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8 (191). Cependant, l'effet de cette activation chez les M1 et M2 sur des cellules cancéreuses n'a pas encore été étudié. Nos résultats démontrent que l'activation de CD40 chez les M1 inhibe chez les T24 l'expression de COX-2, IL-8, IL-6, MCP-1 et GM-CSF en plus de causer une augmentation très peu significative de TNF- $\alpha$ . Ces résultats sont totalement contraires à ceux obtenus avec le milieu conditionné de M2. En effet, on observe une augmentation d'IL-8, de TNF- $\alpha$ , de MCP-1, de COX-2, de GM-CSF et une faible diminution de l'expression d'IL-6. Ainsi, l'activation via CD40 inhibe l'expression des protéines pro-tumorales induite par les M1 chez les T24 alors que celle-ci, pour la plupart des protéines pro-tumorales analysées, est augmentée dans le cas des M2. En somme, cette activation permet d'augmenter l'invasion tumorale induite par les M1 et l'expression de facteurs pro-tumoraux induite par les M2 chez les T24.

## 7.8 Conclusion

À la base, notre hypothèse visait à vérifier la possibilité qu'autant les M1 que les M2 exprimeraient des protéines pro-tumorales et que l'activation de CD40 chez les M $\emptyset$  influencerait les interactions paracrines entre les M $\emptyset$  et les cellules du cancer de la vessie (voir le tableau 7.1). Nous avons démontré que bien que les M1 induisent une diminution de la prolifération des T24, ils expriment plusieurs facteurs pro-tumoraux. De plus, les M1 induisent, via des interactions paracrines, l'expression de la plupart de ces protéines pro-tumorales chez les T24. Les M2 expriment également certains facteurs pro-tumoraux et favorisent en plus la prolifération cellulaire des T24. Enfin, l'activation de CD40 influence les interactions paracrines entre les M $\emptyset$  et les T24. En effet, nous avons observé une diminution de l'expression de gènes pro-tumoraux chez les T24 incubées avec du MC de M1 activés via CD40 et une augmentation de l'expression de

**TABLEAU 7.1**  
**Résumé descriptif de l'étude**

<b>Contexte</b>	
<b>Cancer de la vessie</b>	Cancer hautement vascularisé dû à la présence de macrophages (TAM) sécrétant des facteurs angiogéniques. La densité des TAM est représentative du niveau d'invasion de la tumeur. L'inflammation chronique de la vessie (cystite) peut dégénérer en cancer.
<b>M1</b>	Selon la littérature, les M1 détruisent les bactéries pathogènes et produisent de grandes quantités de cytokines inflammatoires. Ces macrophages sont considérés comme anti-tumoraux.
<b>M2</b>	Selon la littérature, les M2 induisent le remodelage de la matrice, la réparation tissulaire et l'angiogénèse. Ces macrophages sont considérés comme pro-tumoraux et représentent les TAM.
<b>CD40</b>	Récepteur des TNF présent à la surface des macrophages. Puissant activateur de ces derniers, il est impliqué dans le processus inflammatoire.
<b>Hypothèses</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Les M1, autant que les M2, produisent des facteurs pro-tumoraux et sont mutuellement impliqués dans la croissance tumorale.</li> <li>2) CD40 influence les interactions paracrines entre les macrophages et les cellules cancéreuses.</li> </ol>	
<b>Objectifs</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Déterminer l'effet des macrophages polarisés (M1 et M2) sur la prolifération des cellules T24 (lignée du cancer de la vessie) et l'expression de facteurs pro-tumoraux par celles-ci.</li> <li>2) Évaluer l'impact de l'activation de CD40 des macrophages sur l'invasion tumorale et l'expression de facteurs pro-tumoraux par les cellules T24.</li> </ol>	
<b>Résultats</b>	
<b>Effet des M1 sur les T24</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) ↑ de l'expression de facteurs pro-tumoraux (COX-2, IL-8, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, GM-CSF, MCP-1).</li> <li>2) ↓ de la prolifération.</li> </ol>
<b>Effet des M2 sur les T24</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) ↑ de l'expression d'un facteur pro-tumoral (CCL22).</li> <li>2) ↑ de la prolifération.</li> </ol>
<b>Effet des M1 activés via CD40 sur les T24</b>	↑ de l'invasion tumorale.
<b>Effet des M2 activés via CD40 sur les T24</b>	↑ de l'expression de facteurs pro-tumoraux (COX-2, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, MCP-1).

ces mêmes gènes chez les T24 stimulées par du MC de M2 activés via CD40. L'activation de CD40 chez les M1 permet également l'augmentation de l'invasion des T24.

Enfin, l'ensemble de nos résultats démontre que les MØ activés expriment des facteurs pro-tumoraux et induisent l'expression de certains de ces facteurs chez les T24. De plus, CD40 influence l'activité pro-tumorale des MØ M1 et M2 en augmentant l'invasion des T24 stimulées avec du MC de M1 et l'expression de protéines pro-tumorales par les T24 stimulées avec du MC de M2.

## 7.9 Perspectives

Malgré les nombreuses études réalisées sur les MØ M1 et M2, les mécanismes intercellulaires par lesquels les MØ participent à la progression tumorale demeurent incompris. Pour éclaircir ces mécanismes, l'étude de l'induction de facteurs pro-tumoraux dans l'environnement néoplasique est essentielle. En effet, l'induction de ces facteurs pro-tumoraux chez les MØ et les cellules tumorales favorise la progression tumorale. De plus, l'étude de l'implication de CD40 dans la dualité inflammation et progression tumorale semble être indispensable puisque CD154, exprimé par les lymphocytes Th, permet à ces derniers d'activer efficacement les MØ.

L'étude de différents facteurs pro-tumoraux dans nos modèles cellulaires pourrait être très utile pour éclaircir le rôle des MØ M1 et M2 dans la progression tumorale. Comme nous l'avons démontré, la plupart de ces facteurs pro-tumoraux sont d'origine inflammatoire et dérive de l'activation des MØ M1. Par conséquent, il serait intéressant de déterminer lesquels inhiber afin de diminuer le plus efficacement possible la progression tumorale. Cependant, la plupart de ces facteurs proviennent de l'induction de voies de signalisation impliquant NF- $\kappa$ B. En plus du rôle central de l'activation de NF- $\kappa$ B dans le système immunitaire et inflammatoire, il est proposé que ce facteur de transcription soit impliqué dans l'habileté qu'ont les cellules pré-néoplasiques et malignes d'échapper à la surveillance immunitaire. La translocation de NF- $\kappa$ B au noyau

aboutit à la transcription d'une panoplie de gènes pro-inflammatoires, tels que les cytokines IL-6 et GM-CSF, les chémokines IL-8 et MCP-1, les enzymes COX-2 et MMP9 ainsi que le facteur pro-angiogénique VEGF (260). Il a été prouvé que tous ces gènes, dépendants de l'activation de NF- $\kappa$ B, ont un rôle important dans l'induction de la cystite, laquelle est un important facteur de risque du cancer de la vessie (134, 247). L'activation de NF- $\kappa$ B peut être supprimée par certains antioxydants ou par le super-répresseur I $\kappa$ B, cependant l'utilisation de ceux-ci dans le traitement du cancer de la vessie requiert encore plusieurs recherches (261).

CD40 permet la production de plusieurs cytokines pro-tumorales telles que IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, GM-CSF et TNF- $\alpha$  (262). Nous avons d'ailleurs démontré une augmentation de l'expression de certaines de ces cytokines chez les T24 stimulées avec du MC de M $\emptyset$  activées via CD40. Plusieurs études ont aussi démontré que l'interaction CD40/CD154 entre les macrophages et les lymphocytes Th permet de prolonger la survie des cellules Th et possiblement des macrophages également. De cette façon, l'inflammation est amplifiée suite à une activation plus importante des macrophages par les lymphocytes Th et peut alors devenir chronique avec toutes les conséquences déjà mentionnées dans le cas du cancer de la vessie (192). Dans le cadre de notre étude, nous avons démontré que l'activation de CD40 chez les M $\emptyset$  M0 et M1 induit l'invasion des T24 via des interactions paracrines. Cependant, nous pouvons supposer que la digestion de la matrice intercellulaire par les métalloprotéases induites par l'activation de CD40 permet également l'invasion de cellules inflammatoires, dont les macrophages, venant renchéir la chronicité de l'inflammation. Ces résultats viennent supporter les études concernant le développement de procédés permettant la suppression des interactions CD40/CD154 prévenant l'induction de l'inflammation chronique (263).

Des résultats prochains viendront éclairer une partie du mécanisme impliquant les M $\emptyset$  M1 et M2 dans la progression tumorale et l'implication de CD40. En effet, il sera intéressant de constater les effets des M $\emptyset$  M0, M1 et M2 sur l'expression des facteurs pro-tumoraux produits par ces mêmes M $\emptyset$ . Il sera alors possible de constater les différentes interactions entre les différents phénotypes de M $\emptyset$ . De plus, il sera



important de déterminer quels sont les facteurs induits chez les MØ suite à l'activation via CD40. Tout comme les MØ, les cellules du cancer de la vessie, telles que les T24, expriment également CD40. Cependant, l'activation de CD40 semble donner des résultats paradoxaux relatifs au type de cancer. En effet, l'activation de CD40 chez les cellules tumorales induit l'apoptose dans le cas de l'ostéosarcome alors qu'elle inhibe celle-ci en ce qui a trait au lymphome (264, 265). Par conséquent, l'analyse de l'expression de facteurs pro-tumoraux chez les T24 activés via CD40 permettra de définir un rôle direct des lymphocytes T CD154<sup>+</sup> sur la progression ou la régression tumorale spécifique au cancer de la vessie. Pour l'heure, l'activation de CD40 chez les cellules du cancer de la vessie semble davantage présenter un effet anti-apoptotique (266). Le rôle de l'activation de CD40 chez les cellules du cancer de la vessie sur l'expression de facteurs pro-tumoraux par les macrophages viendra compléter le tableau des études *in vitro*. Enfin, des études *in vivo* quant à l'implication des macrophages M1 et M2 dans la progression tumorale et l'implication de CD40 dans celle-ci seront de mises. Elles permettront ainsi de tenir compte de tous les facteurs biologiques présents dans l'environnement néoplasique.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. (2000) "Immunology, 4th edition", 4e éd., W. H. Freeman, New York, U. S. A., pp. 371-393.
2. Beutler, B. (2004) "Innate immunity: an overview", *Mol Immunol* 40(12): 845-59.
3. Beutler, B. (2001) "Sepsis begins at the interface of pathogen and host", *Biochem Soc Trans* 29(Pt 6): 853-9.
4. Pfeiffer, R. (1892) "Untersuchungen über das Cholera Gift", *Z. Hygiene* 11: 393-412.
5. Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E. T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M., Schade, U., Imoto, M., Yoshimura, H., et al. (1985) "Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities", *Eur J Biochem* 148(1): 1-5.
6. O'Brien, A. D., Rosenstreich, D. L., Scher, I., Campbell, G. H., MacDermott, R. P., Formal, S. B. (1980) "Genetic control of susceptibility to Salmonella typhimurium in mice: role of the LPS gene", *J Immunol* 124(1): 20-4.
7. Agace, W., Hedges, S., Svanborg, C. (1992) "Lps genotype in the C57 black mouse background and its influence on the interleukin-6 response to E. coli urinary tract infection", *Scand J Immunol* 35(5): 531-8.
8. Mantovani, A. (1999) "The chemokine system: redundancy for robust outputs", *Immunol Today* 20(6): 254-7.
9. Mosser, D. M. (2003) "The many faces of macrophage activation", *J Leukoc Biol* 73(2): 209-12.
10. Philip, M., Rowley, D. A., Schreiber, H. (2004) "Inflammation as a tumor promoter in cancer induction", *Semin Cancer Biol* 14(6): 433-9.
11. Virchow, R. (1858) "Reizung und Reizbarkeit", *Arch Pathol Anat Klin Med* 14: 1-63.
12. Fehleisen, F. (1882) "Über die Züchtung der Erysipel-Kokken auf künstlichen Nährböden und die Übertragbarkeit auf den Menschen", *Deutsche Med wscr* 8: 553-4.
13. Bruns, P. (1888) "Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwülste", *Beitr Klin chir* 3: 443-66.
14. Morales, A., Eiding, D., Bruce, A. W. (1976) "Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors", *J Urol* 116(2): 180-3.
15. Luo, Y., Chen, X., O'Donnell, M. A. (2007) "Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces human CC- and CXC-chemokines in vitro and in vivo", *Clin Exp Immunol* 147(2): 370-8.
16. Balkwill, F., Mantovani, A. (2001) "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* 357(9255): 539-45.
17. Coussens, L. M., Werb, Z. (2002) "Inflammation and cancer", *Nature* 420(6917): 860-7.
18. Negus, R. P., Stamp, G. W., Hadley, J., Balkwill, F. R. (1997) "Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines", *Am J Pathol* 150(5): 1723-34.
19. Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., Ruco, L. (1992) "The origin

- and function of tumor-associated macrophages", *Immunol Today* 13(7): 265-70.
20. Mantovani, A., Bussolino, F., Dejana, E. (1992) "Cytokine regulation of endothelial cell function", *Faseb J* 6(8): 2591-9.
  21. Allavena, P., Sica, A., Vecchi, A., Locati, M., Sozzani, S., Mantovani, A. (2000) "The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues", *Immunol Rev* 177: 141-9.
  22. Kidd, P. (2003) "Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease", *Altern Med Rev* 8(3): 223-46.
  23. Dvorak, H. F. (1986) "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing", *N Engl J Med* 315(26): 1650-9.
  24. Pinedo, H. M., Verheul, H. M., D'Amato, R. J., Folkman, J. (1998) "Involvement of platelets in tumour angiogenesis?" *Lancet* 352(9142): 1775-7.
  25. Burke, F., Relf, M., Negus, R., Balkwill, F. (1996) "A cytokine profile of normal and malignant ovary", *Cytokine* 8(7): 578-85.
  26. Old, L. J. (1988) "Tumor necrosis factor", *Sci Am* 258(5): 59-60, 69-75.
  27. Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W., Sakai, A., Sueoka, E., Fujiki, H. (1999) "Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice", *Cancer Res* 59(18): 4516-8.
  28. Moore, R. J., Owens, D. M., Stamp, G., Arnott, C., Burke, F., East, N., Holdsworth, H., Turner, L., Rollins, B., Pasparakis, M., Kollias, G., Balkwill, F. (1999) "Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis", *Nat Med* 5(7): 828-31.
  29. Lin, A., Karin, M. (2003) "NF-kappaB in cancer: a marked target", *Semin Cancer Biol* 13(2): 107-14.
  30. Micheau, O., Tschopp, J. (2003) "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes", *Cell* 114(2): 181-90.
  31. Tricot, G. (2000) "New insights into role of microenvironment in multiple myeloma", *Lancet* 355(9200): 248-50.
  32. Vidal-Vanaclocha, F., Fantuzzi, G., Mendoza, L., Fuentes, A. M., Anasagasti, M. J., Martin, J., Carrascal, T., Walsh, P., Reznikov, L. L., Kim, S. H., Novick, D., Rubinstein, M., Dinarello, C. A. (2000) "IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1", *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 734-9.
  33. Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., Palucka, A. K. (2000) "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages", *Nat Immunol* 1(6): 510-4.
  34. Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J. M., Evans, J. F., Taketo, M. M. (1996) "Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)", *Cell* 87(5): 803-9.
  35. Inamura, N., Sone, S., Okubo, A., Singh, S. M., Ogura, T. (1990) "Heterogeneity in responses of human blood monocytes to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor", *J Leukoc Biol* 47(6): 528-34.
  36. Pojda, Z., Molineux, G., Dexter, T. M. (1989) "Effects of long-term in vivo treatment of mice with purified murine recombinant GM-CSF", *Exp Hematol* 17(11): 1100-4.

37. Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., Mulligan, R. C. (1993) "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity", *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8): 3539-43.
38. Block, T., Schmid, F., Geffken, B., Treiber, U., Busch, R., Hartung, R. (1992) "Modulation of in vitro cell growth of human and murine urothelial tumor cell lines under the influence of interleukin-3, granulocyte-, macrophage- and granulocyte-colony-stimulating factor", *Urol Res* 20(4): 289-92.
39. Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P. W., Matsushima, K., Yoshie, O. (1999) "Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine", *Int Immunol* 11(1): 81-8.
40. Balkwill, F. (2004) "Cancer and the chemokine network", *Nat Rev Cancer* 4(7): 540-50.
41. Negus, R. P., Stamp, G. W., Relf, M. G., Burke, F., Malik, S. T., Bernasconi, S., Allavena, P., Sozzani, S., Mantovani, A., Balkwill, F. R. (1995) "The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer", *J Clin Invest* 95(5): 2391-6.
42. Luboshits, G., Shina, S., Kaplan, O., Engelberg, S., Nass, D., Lifshitz-Mercer, B., Chaitchik, S., Keydar, I., Ben-Baruch, A. (1999) "Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma", *Cancer Res* 59(18): 4681-7.
43. Ohta, M., Kitadai, Y., Tanaka, S., Yoshihara, M., Yasui, W., Mukaida, N., Haruma, K., Chayama, K. (2002) "Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas", *Int J Cancer* 102(3): 220-4.
44. Haghnegahdar, H., Du, J., Wang, D., Strieter, R. M., Burdick, M. D., Nanney, L. B., Cardwell, N., Luan, J., Shattuck-Brandt, R., Richmond, A. (2000) "The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma", *J Leukoc Biol* 67(1): 53-62.
45. Townsend, P. A., Scarabelli, T. M., Davidson, S. M., Knight, R. A., Latchman, D. S., Stephanou, A. (2004) "STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis", *J Biol Chem* 279(7): 5811-20.
46. Nozawa, H., Oda, E., Nakao, K., Ishihara, M., Ueda, S., Yokochi, T., Ogasawara, K., Nakatsuru, Y., Shimizu, S., Ohira, Y., Hioki, K., Aizawa, S., Ishikawa, T., Katsuki, M., Muto, T., Taniguchi, T., Tanaka, N. (1999) "Loss of transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying the Ha-ras transgene or nullizygosity for p53", *Genes Dev* 13(10): 1240-5.
47. Lohoff, M., Ferrick, D., Mittrucker, H. W., Duncan, G. S., Bischof, S., Rollinghoff, M., Mak, T. W. (1997) "Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo", *Immunity* 6(6): 681-9.
48. Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T. A., Taniguchi, T., Taki, S. (1998) "Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells", *Nature* 391(6668): 700-3.

49. Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T. W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M., Taniguchi, T. (1996) "Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage", *Nature* 382(6594): 816-8.
50. Fogg, D. K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D. R., Cumano, A., Geissmann, F. (2006) "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells", *Science* 311(5757): 83-7.
51. Dai, X. M., Ryan, G. R., Hapel, A. J., Dominguez, M. G., Russell, R. G., Kapp, S., Sylvestre, V., Stanley, E. R. (2002) "Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects", *Blood* 99(1): 111-20.
52. Whitelaw, D. M. (1972) "Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling", *Cell Tissue Kinet* 5(4): 311-7.
53. Nathan, C. (1991) "Mechanisms and modulation of macrophage activation", *Behring Inst Mitt* (88): 200-7.
54. Fujiwara, N., Kobayashi, K. (2005) "Macrophages in inflammation", *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(3): 281-6.
55. Jean-Baptiste, E. (2007) "Cellular mechanisms in sepsis", *J Intensive Care Med* 22(2): 63-72.
56. Lien, E., Ingalls, R. R. (2002) "Toll-like receptors", *Crit Care Med* 30(1 Supp): S1-S11.
57. Li, Q., Verma, I. M. (2002) "NF-kappaB regulation in the immune system", *Nat Rev Immunol* 2(10): 725-34.
58. Oberholzer, A., Oberholzer, C., Moldawer, L. L. (2000) "Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states", *Crit Care Med* 28(4 Suppl): N3-12.
59. Kokkola, R., Sundberg, E., Ulfgren, A. K., Palmblad, K., Li, J., Wang, H., Ulloa, L., Yang, H., Yan, X. J., Furie, R., Chiorazzi, N., Tracey, K. J., Andersson, U., Harris, H. E. (2002) "High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis", *Arthritis Rheum* 46(10): 2598-603.
60. Dries, D. J. (1996) "Activation of the clotting system and complement after trauma", *New Horiz* 4(2): 276-88.
61. Ayala, A., Chaudry, I. H. (1996) "Platelet activating factor and its role in trauma, shock, and sepsis", *New Horiz* 4(2): 265-75.
62. Mosser, D. M., Handman, E. (1992) "Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes", *J Leukoc Biol* 52(4): 369-76.
63. Gruenheid, S., Gros, P. (2000) "Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport", *Curr Opin Microbiol* 3(1): 43-8.
64. Brady, A. J., Poole-Wilson, P. A., Harding, S. E., Warren, J. B. (1992) "Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia", *Am J Physiol* 263(6 Pt 2): H1963-6.
65. Suzuki, T. (1991) "Signal transduction mechanisms through Fc gamma receptors on the mouse macrophage surface", *Faseb J* 5(2): 187-93.
66. Munn, D. H., McBride, M., Cheung, N. K. (1991) "Role of low-affinity Fc

- receptors in antibody-dependent tumor cell phagocytosis by human monocyte-derived macrophages", *Cancer Res* 51(4): 1117-23.
67. Wang, Z. Q., Bapat, A. S., Rayanade, R. J., Dagtas, A. S., Hoffmann, M. K. (2001) "Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (Fc $\gamma$ RIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation", *Immunology* 102(3): 331-7.
  68. Parker, L. C., Prince, L. R., Sabroe, I. (2007) "Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity", *Clin Exp Immunol* 147(2): 199-207.
  69. Ho, A. S., Moore, K. W. (1994) "Interleukin-10 and its receptor", *Ther Immunol* 1(3): 173-85.
  70. Reed, S. G. (1999) "TGF-beta in infections and infectious diseases", *Microbes Infect* 1(15): 1313-25.
  71. Huynh, M. L., Fadok, V. A., Henson, P. M. (2002) "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation", *J Clin Invest* 109(1): 41-50.
  72. Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G., Eichmann, K. (1995) "Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines", *Eur J Immunol* 25(4): 1101-4.
  73. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004) "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization", *Trends Immunol* 25(12): 677-86.
  74. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. (2002) "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes", *Trends Immunol* 23(11): 549-55.
  75. Spellberg, B., Edwards, J. E., Jr. (2001) "Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases", *Clin Infect Dis* 32(1): 76-102.
  76. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., Allavena, P. (2006) "Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy", *Eur J Cancer* 42(6): 717-27.
  77. Verreck, F. A., de Boer, T., Langenberg, D. M., Hoeve, M. A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., Ottenhoff, T. H. (2004) "Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria", *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13): 4560-5.
  78. Schmeisser, A., Christoph, M., Augstein, A., Marquetant, R., Kasper, M., Braun-Dullaeus, R. C., Strasser, R. H. (2006) "Apoptosis of human macrophages by Flt-4 signaling: implications for atherosclerotic plaque pathology", *Cardiovasc Res* 71(4): 774-84.
  79. Khan, K. N., Masuzaki, H., Fujishita, A., Kitajima, M., Sekine, I., Matsuyama, T., Ishimaru, T. (2005) "Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis", *Hum Reprod* 20(7): 2004-13.
  80. Bingle, L., Brown, N. J., Lewis, C. E. (2002) "The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies",

- J Pathol 196(3): 254-65.
81. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. (2004) "Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression", *Eur J Cancer* 40(11): 1660-7.
  82. Duyndam, M. C., Hilhorst, M. C., Schluper, H. M., Verheul, H. M., van Diest, P. J., Kraal, G., Pinedo, H. M., Boven, E. (2002) "Vascular endothelial growth factor-165 overexpression stimulates angiogenesis and induces cyst formation and macrophage infiltration in human ovarian cancer xenografts", *Am J Pathol* 160(2): 537-48.
  83. Nowicki, A., Szenajch, J., Ostrowska, G., Wojtowicz, A., Wojtowicz, K., Kruszewski, A. A., Maruszynski, M., Aukerman, S. L., Wiktor-Jedrzejczak, W. (1996) "Impaired tumor growth in colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-deficient, macrophage-deficient op/op mouse: evidence for a role of CSF-1-dependent macrophages in formation of tumor stroma", *Int J Cancer* 65(1): 112-9.
  84. Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G., Pollard, J. W. (2001) "Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy", *J Exp Med* 193(6): 727-40.
  85. Mantovani, A. (1994) "Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines", *Lab Invest* 71(1): 5-16.
  86. Gu, L., Tseng, S., Horner, R. M., Tam, C., Loda, M., Rollins, B. J. (2000) "Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1", *Nature* 404(6776): 407-11.
  87. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L., Zou, W. (2004) "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival", *Nat Med* 10(9): 942-9.
  88. Dhawan, P., Richmond, A. (2002) "Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma", *J Leukoc Biol* 72(1): 9-18.
  89. Bonocchi, R., Facchetti, F., Dusi, S., Luini, W., Lissandrini, D., Simmelink, M., Locati, M., Bernasconi, S., Allavena, P., Brandt, E., Rossi, F., Mantovani, A., Sozzani, S. (2000) "Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes", *J Immunol* 164(7): 3862-9.
  90. Mantovani, A., Allavena, P., Sozzani, S., Vecchi, A., Locati, M., Sica, A. (2004) "Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors", *Semin Cancer Biol* 14(3): 155-60.
  91. Fujimoto, J., Sakaguchi, H., Aoki, I., Tamaya, T. (2000) "Clinical implications of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers", *Cancer Res* 60(10): 2632-5.
  92. Pollard, J. W. (2004) "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis", *Nat Rev Cancer* 4(1): 71-8.
  93. Robinson, S. C., Scott, K. A., Balkwill, F. R. (2002) "Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha", *Eur J Immunol* 32(2): 404-12.
  94. Sica, A., Sacconi, A., Bottazzi, B., Bernasconi, S., Allavena, P., Gaetano, B., Fei, F., LaRosa, G., Scotton, C., Balkwill, F., Mantovani, A. (2000) "Defective

- expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma", *J Immunol* 164(2): 733-8.
95. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., Coffman, R. L. (1986) "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins", *J Immunol* 136(7): 2348-57.
  96. Lafaille, J. J. (1998) "The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases", *Cytokine Growth Factor Rev* 9(2): 139-51.
  97. Lienhardt, C., Azzurri, A., Amedei, A., Fielding, K., Sillah, J., Sow, O. Y., Bah, B., Benagiano, M., Diallo, A., Manetti, R., Manneh, K., Gustafson, P., Bennett, S., D'Elis, M. M., McAdam, K., Del Prete, G. (2002) "Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo", *Eur J Immunol* 32(6): 1605-13.
  98. Singh, V. K., Mehrotra, S., Agarwal, S. S. (1999) "The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy", *Immunol Res* 20(2): 147-61.
  99. Dent, L. A. (2002) "For better or worse: common determinants influencing health and disease in parasitic infections, asthma and reproductive biology", *J Reprod Immunol* 57(1-2): 255-72.
  100. Moser, M., Murphy, K. M. (2000) "Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development", *Nat Immunol* 1(3): 199-205.
  101. Shurin, M. R., Lu, L., Kalinski, P., Stewart-Akers, A. M., Lotze, M. T. (1999) "Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy", *Springer Semin Immunopathol* 21(3): 339-59.
  102. Sato, M., Goto, S., Kaneko, R., Ito, M., Sato, S., Takeuchi, S. (1998) "Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients", *Anticancer Res* 18(5D): 3951-5.
  103. Filella, X., Alcover, J., Zarco, M. A., Beardo, P., Molina, R., Ballesta, A. M. (2000) "Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer", *Prostate* 44(4): 271-4.
  104. Huang, M., Wang, J., Lee, P., Sharma, S., Mao, J. T., Meissner, H., Uyemura, K., Modlin, R., Wollman, J., Dubinett, S. M. (1995) "Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern", *Cancer Res* 55(17): 3847-53.
  105. McGuirk, P., Mills, K. H. (2002) "Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases", *Trends Immunol* 23(9): 450-5.
  106. Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., Roncarolo, M. G. (1997) "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis", *Nature* 389(6652): 737-42.
  107. Fehervari, Z., Sakaguchi, S. (2004) "CD4+ Tregs and immune control", *J Clin Invest* 114(9): 1209-17.
  108. Hori, S., Sakaguchi, S. (2004) "Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells", *Microbes Infect* 6(8): 745-51.
  109. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., Takahashi, T. (2001) "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in



- controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance", *Immunol Rev* 182: 18-32.
110. Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B., Santarlasci, V., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. (2003) "Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes", *Blood* 102(12): 4107-14.
  111. Fehervari, Z., Sakaguchi, S. (2004) "Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells", *Curr Opin Immunol* 16(2): 203-8.
  112. Piccirillo, C. A., Thornton, A. M. (2004) "Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells", *Trends Immunol* 25(7): 374-80.
  113. Mills, K. H. (2004) "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" *Nat Rev Immunol* 4(11): 841-55.
  114. Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P., Ley, T. J. (2004) "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death", *Immunity* 21(4): 589-601.
  115. Wills-Karp, M., Belkaid, Y., Karp, C. L. (2003) "I-Tim-izing the pathways of counter-regulation", *Nat Immunol* 4(11): 1050-2.
  116. Ishida, T., Ueda, R. (2006) "CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer", *Cancer Sci* 97(11): 1139-46.
  117. Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., Nakayama, E. (1999) "Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody", *Cancer Res* 59(13): 3128-33.
  118. Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakaguchi, S. (1999) "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity", *J Immunol* 163(10): 5211-8.
  119. Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T., Gallimore, A. (2002) "Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens", *Eur J Immunol* 32(11): 3267-75.
  120. Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R., June, C. H. (2001) "Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer", *Cancer Res* 61(12): 4766-72.
  121. Javia, L. R., Rosenberg, S. A. (2003) "CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens", *J Immunother* 26(1): 85-93.
  122. Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M., Takabayashi, A. (2003) "CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression", *Cancer* 98(5): 1089-99.
  123. Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., Linehan, D. C. (2002) "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma", *J Immunol* 169(5): 2756-61.
  124. Lee, I., Wang, L., Wells, A. D., Dorf, M. E., Ozkaynak, E., Hancock, W. W.

- (2005) "Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor", *J Exp Med* 201(7): 1037-44.
125. Canada, I. n. d. c. d. (2007) "Statistiques canadiennes sur le cancer 2006", Ottawa, Agence de santé publique du Canada: pp. 15-16.
  126. Mariappan, P., Smith, G. (2005) "A surveillance schedule for G1Ta bladder cancer allowing efficient use of check cystoscopy and safe discharge at 5 years based on a 25-year prospective database", *J Urol* 173(4): 1108-11.
  127. Hedelin, H., Holmang, S., Wiman, L. (2002) "The cost of bladder tumour treatment and follow-up", *Scand J Urol Nephrol* 36(5): 344-7.
  128. Pashos, C. L., Botteman, M. F., Laskin, B. L., Redaelli, A. (2002) "Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management", *Cancer Pract* 10(6): 311-22.
  129. Marieb, E. N. (1999) "Anatomie et physiologie humaines", 4e éd., Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Saint-Laurent, Canada: pp. 998-9.
  130. Metts, M. C., Metts, J. C., Milito, S. J., Thomas, C. R., Jr. (2000) "Bladder cancer: a review of diagnosis and management", *J Natl Med Assoc* 92(6): 285-94.
  131. Lee, R., Droller, M. J. (2000) "The natural history of bladder cancer. Implications for therapy", *Urol Clin North Am* 27(1): 1-13, vii.
  132. Pow-Sang, J. M., Seigne, J. D. (2000) "Contemporary management of superficial bladder cancer", *Cancer Control* 7(4): 335-9.
  133. Marcus, P. M., Hayes, R. B., Vineis, P., Garcia-Closas, M., Caporaso, N. E., Autrup, H., Branch, R. A., Brockmoller, J., Ishizaki, T., Karakaya, A. E., Ladero, J. M., Mommsen, S., Okkels, H., Romkes, M., Roots, I., Rothman, N. (2000) "Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(5): 461-7.
  134. Johansson, S. L., Cohen, S. M. (1997) "Epidemiology and etiology of bladder cancer", *Semin Surg Oncol* 13(5): 291-8.
  135. Cohen, S. M., Shirai, T., Steineck, G. (2000) "Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes", *Scand J Urol Nephrol Suppl* (205): 105-15.
  136. Young, M. J., Soloway, M. S. (1998) "Office evaluation and management of bladder neoplasms", *Urol Clin North Am* 25(4): 603-11.
  137. Holzbeierlein, J. M., Smith, J. A., Jr. (2000) "Surgical management of noninvasive bladder cancer (stages Ta/T1/CIS)", *Urol Clin North Am* 27(1): 15-24, vii-viii.
  138. Smith, J. A., Jr., Labasky, R. F., Cockett, A. T., Fracchia, J. A., Montie, J. E., Rowland, R. G. (1999) "Bladder cancer clinical guidelines panel summary report on the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1 and TIS). The American Urological Association", *J Urol* 162(5): 1697-701.
  139. Shintani, Y., Sawada, Y., Inagaki, T., Kohjimoto, Y., Uekado, Y., Shinka, T. (2007) "Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guerin for superficial bladder cancer: Study of the mechanism of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy", *Int J Urol* 14(2): 140-6.
  140. Totterman, T. H., Loskog, A., Essand, M. (2005) "The immunotherapy of prostate and bladder cancer", *BJU Int* 96(5): 728-35.
  141. Ratliff, T. L., Ritchey, J. K., Yuan, J. J., Andriole, G. L., Catalona, W. J. (1993)

- "T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer", *J Urol* 150(3): 1018-23.
142. Nadler, R., Luo, Y., Zhao, W., Ritchey, J. K., Austin, J. C., Cohen, M. B., O'Donnell, M. A., Ratliff, T. L. (2003) "Interleukin 10 induced augmentation of delayed-type hypersensitivity (DTH) enhances Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) mediated antitumour activity", *Clin Exp Immunol* 131(2): 206-16.
  143. O'Brien, T., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R., Harris, A. L. (1995) "Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer", *Cancer Res* 55(3): 510-3.
  144. Nguyen, M., Watanabe, H., Budson, A. E., Richie, J. P., Folkman, J. (1993) "Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients", *J Natl Cancer Inst* 85(3): 241-2.
  145. Chopin, D. K., Caruelle, J. P., Colombel, M., Palcy, S., Ravery, V., Caruelle, D., Abbou, C. C., Barritault, D. (1993) "Increased immunodetection of acidic fibroblast growth factor in bladder cancer, detectable in urine", *J Urol* 150(4): 1126-30.
  146. Hanada, T., Nakagawa, M., Emoto, A., Nomura, T., Nasu, N., Nomura, Y. (2000) "Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer", *Int J Urol* 7(7): 263-9.
  147. Yamada, H., Luo, Y., Matsumoto, T., O'Donnell, M. A. (2005) "A novel expression of macrophage derived chemokine in human bladder cancer", *J Urol* 173(3): 990-5.
  148. Schonbeck, U., Libby, P. (2001) "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad", *Cell Mol Life Sci* 58(1): 4-43.
  149. van Kooten, C., Banchereau, J. (2000) "CD40-CD40 ligand", *J Leukoc Biol* 67(1): 2-17.
  150. Braesch-Andersen, S., Paulie, S., Koho, H., Nika, H., Aspenstrom, P., Perlmann, P. (1989) "Biochemical characteristics and partial amino acid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CDw40", *J Immunol* 142(2): 562-7.
  151. Smith, C. A., Farrah, T., Goodwin, R. G. (1994) "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death", *Cell* 76(6): 959-62.
  152. Hostager, B. S., Hsing, Y., Harms, D. E., Bishop, G. A. (1996) "Different CD40-mediated signaling events require distinct CD40 structural features", *J Immunol* 157(3): 1047-53.
  153. Krzesz, R., Wagner, A. H., Cattaruzza, M., Hecker, M. (1999) "Cytokine-inducible CD40 gene expression in vascular smooth muscle cells is mediated by nuclear factor kappaB and signal transducer and activation of transcription-1", *FEBS Lett* 453(1-2): 191-6.
  154. Craxton, A., Shu, G., Graves, J. D., Saklatvala, J., Krebs, E. G., Clark, E. A. (1998) "p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes", *J Immunol* 161(7): 3225-36.
  155. Nguyen, V. T., Walker, W. S., Benveniste, E. N. (1998) "Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor-beta", *Eur J Immunol* 28(8): 2537-48.

156. Kehry, M. R. (1996) "CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death", *J Immunol* 156(7): 2345-8.
157. Hsu, Y. M., Lucci, J., Su, L., Ehrenfels, B., Garber, E., Thomas, D. (1997) "Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes", *J Biol Chem* 272(2): 911-5.
158. Reyes-Moreno, C., Sharif-Askari, E., Girouard, J., Leveille, C., Jundi, M., Akoum, A., Lapointe, R., Darveau, A., Mourad, W. (2007) "Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling", *J Biol Chem*.
159. Girouard, J., Reyes-Moreno, C., Darveau, A., Akoum, A., Mourad, W. (2005) "Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression", *Mol Immunol* 42(7): 773-80.
160. Reyes-Moreno, C., Girouard, J., Lapointe, R., Darveau, A., Mourad, W. (2004) "CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes", *J Biol Chem* 279(9): 7799-806.
161. Paulie, S., Rosen, A., Ehlin-Henriksson, B., Braesch-Andersen, S., Jakobson, E., Koho, H., Perlmann, P. (1989) "The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction", *J Immunol* 142(2): 590-5.
162. Clark, E. A., Shu, G. (1990) "Association between IL-6 and CD40 signaling. IL-6 induces phosphorylation of CD40 receptors", *J Immunol* 145(5): 1400-6.
163. Hu, H. M., O'Rourke, K., Boguski, M. S., Dixit, V. M. (1994) "A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40", *J Biol Chem* 269(48): 30069-72.
164. Graf, D., Korthauer, U., Mages, H. W., Senger, G., Kroczeck, R. A. (1992) "Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells", *Eur J Immunol* 22(12): 3191-4.
165. Suttles, J., Milhorn, D. M., Miller, R. W., Poe, J. C., Wahl, L. M., Stout, R. D. (1999) "CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action", *J Biol Chem* 274(9): 5835-42.
166. Mathur, R. K., Awasthi, A., Wadhone, P., Ramanamurthy, B., Saha, B. (2004) "Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses", *Nat Med* 10(5): 540-4.
167. Inui, S., Kaisho, T., Kikutani, H., Stamenkovic, I., Seed, B., Clark, E. A., Kishimoto, T. (1990) "Identification of the intracytoplasmic region essential for signal transduction through a B cell activation molecule, CD40", *Eur J Immunol* 20(8): 1747-53.
168. Sutherland, C. L., Krebs, D. L., Gold, M. R. (1999) "An 11-amino acid sequence in the cytoplasmic domain of CD40 is sufficient for activation of c-Jun N-terminal kinase, activation of MAPKAP kinase-2, phosphorylation of I kappa B alpha, and protection of WEHI-231 cells from anti-IgM-induced growth arrest", *J Immunol* 162(8): 4720-30.
169. Subauste, C. S., Andrade, R. M., Wessendarp, M. (2007) "CD40-TRAF6 and Autophagy-Dependent Anti-Microbial Activity in Macrophages", *Autophagy* 3(3): 245-8.

170. Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., Stark, G. R. (1994) "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins", *Science* 264(5164): 1415-21.
171. Villa, A., Notarangelo, L. D., Di Santo, J. P., Macchi, P. P., Strina, D., Frattini, A., Lucchini, F., Patrosso, C. M., Giliani, S., Mantuano, E., et al. (1994) "Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis", *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6): 2110-4.
172. Bajorath, J., Marken, J. S., Chalupny, N. J., Spoon, T. L., Siadak, A. W., Gordon, M., Noelle, R. J., Hollenbaugh, D., Aruffo, A. (1995) "Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis", *Biochemistry* 34(31): 9884-92.
173. Wykes, M., Poudrier, J., Lindstedt, R., Gray, D. (1998) "Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells", *Eur J Immunol* 28(2): 548-59.
174. Fanslow, W. C., Srinivasan, S., Paxton, R., Gibson, M. G., Spriggs, M. K., Armitage, R. J. (1994) "Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function", *Semin Immunol* 6(5): 267-78.
175. Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Strockbine, L., Sato, T. A., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Davis-Smith, T., Maliszewski, C. R., et al. (1992) "Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40", *Nature* 357(6373): 80-2.
176. Lederman, S., Yellin, M. J., Krichevsky, A., Belko, J., Lee, J. J., Chess, L. (1992) "Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help)", *J Exp Med* 175(4): 1091-101.
177. Gauchat, J. F., Aubry, J. P., Mazzei, G., Life, P., Jomotte, T., Elson, G., Bonnefoy, J. Y. (1993) "Human CD40-ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production", *FEBS Lett* 315(3): 259-66.
178. Roy, M., Waldschmidt, T., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Noelle, R. J. (1993) "The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells", *J Immunol* 151(5): 2497-510.
179. Lederman, S., Yellin, M. J., Inghirami, G., Lee, J. J., Knowles, D. M., Chess, L. (1992) "Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B-cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help", *J Immunol* 149(12): 3817-26.
180. Casamayor-Palleja, M., Khan, M., MacLennan, I. C. (1995) "A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex", *J Exp Med* 181(4): 1293-301.
181. Jaiswal, A. I., Dubey, C., Swain, S. L., Croft, M. (1996) "Regulation of CD40 ligand expression on naive CD4 T cells: a role for TCR but not co-stimulatory signals", *Int Immunol* 8(2): 275-85.
182. Castle, B. E., Kishimoto, K., Stearns, C., Brown, M. L., Kehry, M. R. (1993) "Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes", *J Immunol* 151(4): 1777-88.

183. Peng, X., Remacle, J. E., Kasran, A., Huylebroeck, D., Ceuppens, J. L. (1998) "IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells", *J Immunol* 160(3): 1166-72.
184. Pinchuk, L. M., Klaus, S. J., Magaletti, D. M., Pinchuk, G. V., Norsen, J. P., Clark, E. A. (1996) "Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation", *J Immunol* 157(10): 4363-70.
185. Stout, R. D., Suttles, J., Xu, J., Grewal, I. S., Flavell, R. A. (1996) "Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice", *J Immunol* 156(1): 8-11.
186. Karmann, K., Hughes, C. C., Schechner, J., Fanslow, W. C., Pober, J. S. (1995) "CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression", *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4342-6.
187. Hollenbaugh, D., Mischel-Petty, N., Edwards, C. P., Simon, J. C., Denfeld, R. W., Kiener, P. A., Aruffo, A. (1995) "Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells", *J Exp Med* 182(1): 33-40.
188. Kiener, P. A., Moran-Davis, P., Rankin, B. M., Wahl, A. F., Aruffo, A., Hollenbaugh, D. (1995) "Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes", *J Immunol* 155(10): 4917-25.
189. Kato, T., Hakamada, R., Yamane, H., Nariuchi, H. (1996) "Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction", *J Immunol* 156(10): 3932-8.
190. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., Banchereau, J. (1994) "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking", *J Exp Med* 180(4): 1263-72.
191. Stout, R. D., Suttles, J. (1996) "The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses", *Immunol Today* 17(10): 487-92.
192. Sakata, K., Sakata, A., Kong, L., Vela-Roch, N., Talal, N., Dang, H. (1999) "Monocyte rescue of human T cells from apoptosis is CD40/CD154 dependent", *Scand J Immunol* 50(5): 479-84.
193. Mangan, D. F., Wahl, S. M. (1991) "Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines", *J Immunol* 147(10): 3408-12.
194. Burger, D., Molnarfi, N., Gruaz, L., Dayer, J. M. (2004) "Differential induction of IL-1beta and TNF by CD40 ligand or cellular contact with stimulated T cells depends on the maturation stage of human monocytes", *J Immunol* 173(2): 1292-7.
195. Inoue, Y., Otsuka, T., Niino, H., Nagano, S., Arinobu, Y., Ogami, E., Akahoshi, M., Miyake, K., Ninomiya, I., Shimizu, S., Nakashima, H., Harada, M. (2004) "Novel regulatory mechanisms of CD40-induced prostanoid synthesis by IL-4 and IL-10 in human monocytes", *J Immunol* 172(4): 2147-54.
196. Tian, L., Noelle, R. J., Lawrence, D. A. (1995) "Activated T cells enhance nitric oxide production by murine splenic macrophages through gp39 and LFA-1", *Eur J Immunol* 25(1): 306-9.
197. Nolan, A., Weiden, M. D., Hoshino, Y., Gold, J. A. (2004) "Cd40 but not CD154 knockout mice have reduced inflammatory response in polymicrobial sepsis: a

- potential role for Escherichia coli heat shock protein 70 in CD40-mediated inflammation in vivo", *Shock* 22(6): 538-42.
198. Blom, A. M., Villoutreix, B. O., Dahlback, B. (2004) "Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system?" *Mol Immunol* 40(18): 1333-46.
  199. Qin, H., Wilson, C. A., Lee, S. J., Zhao, X., Benveniste, E. N. (2005) "LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia", *Blood* 106(9): 3114-22.
  200. Alderson, M. R., Armitage, R. J., Tough, T. W., Strockbine, L., Fanslow, W. C., Spriggs, M. K. (1993) "CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40", *J Exp Med* 178(2): 669-74.
  201. Larner, A. C., Petricoin, E. F., Nakagawa, Y., Finbloom, D. S. (1993) "IL-4 attenuates the transcriptional activation of both IFN-alpha and IFN-gamma-induced cellular gene expression in monocytes and monocytic cell lines", *J Immunol* 150(5): 1944-50.
  202. Ito, S., Ansari, P., Sakatsume, M., Dickensheets, H., Vazquez, N., Donnelly, R. P., Larner, A. C., Finbloom, D. S. (1999) "Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1", *Blood* 93(5): 1456-63.
  203. Stuber, E., Strober, W., Neurath, M. (1996) "Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion", *J Exp Med* 183(2): 693-8.
  204. Harigai, M., Hara, M., Nakazawa, S., Fukasawa, C., Ohta, S., Sugiura, T., Inoue, K., Kashiwazaki, S. (1999) "Ligation of CD40 induced tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a novel mechanism of activation of synoviocytes", *J Rheumatol* 26(5): 1035-43.
  205. Eliopoulos, A. G., Young, L. S. (2004) "The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer", *Curr Opin Pharmacol* 4(4): 360-7.
  206. Nakajima, A., Kodama, T., Morimoto, S., Azuma, M., Takeda, K., Oshima, H., Yoshino, S., Yagita, H., Okumura, K. (1998) "Antitumor effect of CD40 ligand: elicitation of local and systemic antitumor responses by IL-12 and B7", *J Immunol* 161(4): 1901-7.
  207. Mackey, M. F., Gunn, J. R., Ting, P. P., Kikutani, H., Dranoff, G., Noelle, R. J., Barth, R. J., Jr. (1997) "Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154", *Cancer Res* 57(13): 2569-74.
  208. Imaizumi, K., Kawabe, T., Ichiyama, S., Kikutani, H., Yagita, H., Shimokata, K., Hasegawa, Y. (1999) "Enhancement of tumoricidal activity of alveolar macrophages via CD40-CD40 ligand interaction", *Am J Physiol* 277(1 Pt 1): L49-57.
  209. Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M., Charles, I. G. (2002) "The role of nitric oxide in cancer", *Cell Res* 12(5-6): 311-20.
  210. Balkwill, F. (2002) "Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?" *Cytokine Growth Factor Rev* 13(2): 135-41.
  211. Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., Alber, G. (1996) "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via

- APC activation", *J Exp Med* 184(2): 747-52.
212. Opdenakker, G., Van Damme, J. (1992) "Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells", *Immunol Today* 13(11): 463-4.
  213. Luca, M., Huang, S., Gershenwald, J. E., Singh, R. K., Reich, R., Bar-Eli, M. (1997) "Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis", *Am J Pathol* 151(4): 1105-13.
  214. Van Ranst, M., Norga, K., Masure, S., Proost, P., Vandekerckhove, F., Auwerx, J., Van Damme, J., Opdenakker, G. (1991) "The cytokine-protease connection: identification of a 96-kD THP-1 gelatinase and regulation by interleukin-1 and cytokine inducers", *Cytokine* 3(3): 231-9.
  215. Klein, G., Vellenga, E., Fraaije, M. W., Kamps, W. A., de Bont, E. S. (2004) "The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia", *Crit Rev Oncol Hematol* 50(2): 87-100.
  216. Smith, W. L., Garavito, R. M., DeWitt, D. L. (1996) "Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2", *J Biol Chem* 271(52): 33157-60.
  217. Tamura, K., Sakurai, T., Kogo, H. (2006) "Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells", *Vascul Pharmacol* 44(6): 411-6.
  218. Reinders, M. E., Sho, M., Robertson, S. W., Geehan, C. S., Briscoe, D. M. (2003) "Proangiogenic function of CD40 ligand-CD40 interactions", *J Immunol* 171(3): 1534-41.
  219. Tai, Y. T., Podar, K., Mitsiades, N., Lin, B., Mitsiades, C., Gupta, D., Akiyama, M., Catley, L., Hideshima, T., Munshi, N. C., Treon, S. P., Anderson, K. C. (2003) "CD40 induces human multiple myeloma cell migration via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/NF-kappa B signaling", *Blood* 101(7): 2762-9.
  220. Legrand, C., Polette, M., Tournier, J. M., de Bentzmann, S., Huet, E., Monteau, M., Birembaut, P. (2001) "uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration", *Exp Cell Res* 264(2): 326-36.
  221. Xu, Y., Hagege, J., Doublet, J. D., Callard, P., Sraer, J. D., Ronne, E., Rondeau, E. (1997) "Endothelial and macrophage upregulation of urokinase receptor expression in human renal cell carcinoma", *Hum Pathol* 28(2): 206-13.
  222. Hildenbrand, R., Wolf, G., Bohme, B., Bleyl, U., Steinborn, A. (1999) "Urokinase plasminogen activator receptor (CD87) expression of tumor-associated macrophages in ductal carcinoma in situ, breast cancer, and resident macrophages of normal breast tissue", *J Leukoc Biol* 66(1): 40-9.
  223. Buhtoiarov, I. N., Lum, H., Berke, G., Paulnock, D. M., Sondel, P. M., Rakhmilevich, A. L. (2005) "CD40 ligation activates murine macrophages via an IFN-gamma-dependent mechanism resulting in tumor cell destruction in vitro", *J Immunol* 174(10): 6013-22.
  224. McKay, L. I., Cidlowski, J. A. (1999) "Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways", *Endocr Rev* 20(4): 435-59.
  225. Seager Danciger, J., Lutz, M., Hama, S., Cruz, D., Castrillo, A., Lazaro, J., Phillips, R., Premack, B., Berliner, J. (2004) "Method for large scale isolation,



- culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation", *J Immunol Methods* 288(1-2): 123-34.
226. Gordon, S. (1999) "Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation", *Immunol Lett* 65(1-2): 5-8.
  227. Witmer-Pack, M. D., Hughes, D. A., Schuler, G., Lawson, L., McWilliam, A., Inaba, K., Steinman, R. M., Gordon, S. (1993) "Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse", *J Cell Sci* 104 ( Pt 4): 1021-9.
  228. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. (1980) "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)", *Int J Cancer* 26(2): 171-6.
  229. Bubenik, J., Baresova, M., Viklicky, V., Jakoubkova, J., Sainerova, H., Donner, J. (1973) "Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen", *Int J Cancer* 11(3): 765-73.
  230. Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Ali, I. U. (1988) "T24 human bladder carcinoma cells with activated Ha-ras protooncogene: nontumorigenic cells susceptible to malignant transformation with carcinogen", *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14): 5107-11.
  231. Rietschel, E. T., Brade, H. (1992) "Bacterial endotoxins", *Sci Am* 267(2): 54-61.
  232. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J. C. (1997) "Cellular responses to interferon-gamma", *Annu Rev Immunol* 15: 749-95.
  233. Goerdt, S., Orfanos, C. E. (1999) "Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells", *Immunity* 10(2): 137-42.
  234. Kuroiwa, T., Lee, E. G., Danning, C. L., Illei, G. G., McInnes, I. B., Boumpas, D. T. (1999) "CD40 ligand-activated human monocytes amplify glomerular inflammatory responses through soluble and cell-to-cell contact-dependent mechanisms", *J Immunol* 163(4): 2168-75.
  235. Hamilton, J. A. (1997) "CSF-1 signal transduction", *J Leukoc Biol* 62(2): 145-55.
  236. Davies, J. Q., Gordon, S. (2005) "Isolation and culture of human macrophages", *Methods Mol Biol* 290: 105-16.
  237. Brauner, A., Lu, Y., Hallden, G., Hylander, B., Lundahl, J. (1998) "Difference in the blood monocyte phenotype between uremic patients and healthy controls: its relation to monocyte differentiation into macrophages in the peritoneal cavity", *Inflammation* 22(1): 55-66.
  238. Ramprasad, M. P., Terpstra, V., Kondratenko, N., Quehenberger, O., Steinberg, D. (1996) "Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein", *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14833-8.
  239. Lynch, R. G. (2000) "Regulatory roles for FcγRIII (CD16) and FcγRII (CD32) in the development of T- and B-lineage lymphoid cells", *J Leukoc Biol* 67(3): 279-84.
  240. Griffin, J. D., Cannistra, S. A., Sullivan, R., Demetri, G. D., Ernst, T. J., Kanakura, Y. (1990) "The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor", *Int J Cell Cloning* 8 Suppl 1: 35-44; discussion 44-5.

241. Bermudez, L. E., Covaro, G., Remington, J. (1993) "Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors", *Infect Immun* 61(10): 4126-30.
242. Champisi, J., Young, L. S., Bermudez, L. E. (1995) "Production of TNF-alpha, IL-6 and TGF-beta, and expression of receptors for TNF-alpha and IL-6, during murine *Mycobacterium avium* infection", *Immunology* 84(4): 549-54.
243. Bermudez, L. E., Wu, M., Young, L. S. (1995) "Interleukin-12-stimulated natural killer cells can activate human macrophages to inhibit growth of *Mycobacterium avium*", *Infect Immun* 63(10): 4099-104.
244. Wakefield, L. M., Roberts, A. B. (2002) "TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis", *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 22-9.
245. Champelovier, P., El Atifi, M., Mantel, F., Rostaing, B., Simon, A., Berger, F., Seigneurin, D. (2005) "In vitro tumoral progression of human bladder carcinoma: role for TGFbeta", *Eur Urol* 48(5): 846-51.
246. Sica, A., Sacconi, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., van Damme, J., Mantovani, A. (2000) "Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages", *J Immunol* 164(2): 762-7.
247. Abdel-Mageed, A. B., Bajwa, A., Shenassa, B. B., Human, L., Ghoniem, G. M. (2003) "NF-kappaB-dependent gene expression of proinflammatory cytokines in T24 cells: possible role in interstitial cystitis", *Urol Res* 31(5): 300-5.
248. Komhoff, M., Guan, Y., Shappell, H. W., Davis, L., Jack, G., Shyr, Y., Koch, M. O., Shappell, S. B., Breyer, M. D. (2000) "Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas", *Am J Pathol* 157(1): 29-35.
249. Shirahama, T. (2000) "Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder", *Clin Cancer Res* 6(6): 2424-30.
250. Kim, S. I., Kwon, S. M., Kim, Y. S., Hong, S. J. (2002) "Association of cyclooxygenase-2 expression with prognosis of stage T1 grade 3 bladder cancer", *Urology* 60(5): 816-21.
251. Shirahama, T., Arima, J., Akiba, S., Sakakura, C. (2001) "Relation between cyclooxygenase-2 expression and tumor invasiveness and patient survival in transitional cell carcinoma of the urinary bladder", *Cancer* 92(1): 188-93.
252. Klein, R. D., Van Pelt, C. S., Sabichi, A. L., Dela Cerda, J., Fischer, S. M., Furstenberger, G., Muller-Decker, K. (2005) "Transitional cell hyperplasia and carcinomas in urinary bladders of transgenic mice with keratin 5 promoter-driven cyclooxygenase-2 overexpression", *Cancer Res* 65(5): 1808-13.
253. Sorimachi, K., Akimoto, K., Hattori, Y., Ieiri, T., Niwa, A. (1999) "Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with polyanions, and involvement of interferon-gamma in the regulation of cytokine secretion", *Cytokine* 11(8): 571-8.
254. Guevara, I., Iwanejko, J., Dembinska-Kiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Golabek, I., Bartus, S., Malczewska-Malec, M., Szczudlik, A. (1998) "Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction", *Clin Chim Acta* 274(2): 177-88.

255. Peters, K. M., Diokno, A. C., Steinert, B. W. (1999) "Preliminary study on urinary cytokine levels in interstitial cystitis: does intravesical bacille Calmette-Guerin treat interstitial cystitis by altering the immune profile in the bladder?" *Urology* 54(3): 450-3.
256. Bottazzi, B., Polentarutti, N., Acero, R., Balsari, A., Boraschi, D., Ghezzi, P., Salmona, M., Mantovani, A. (1983) "Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants", *Science* 220(4593): 210-2.
257. Wu, Q., Mahendran, R., Esuvaranathan, K. (2003) "Nonviral cytokine gene therapy on an orthotopic bladder cancer model", *Clin Cancer Res* 9(12): 4522-8.
258. Albini, A., Benelli, R., Noonan, D. M., Brigati, C. (2004) "The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes", *Int J Dev Biol* 48(5-6): 563-71.
259. Hagemann, T., Wilson, J., Kulbe, H., Li, N. F., Leinster, D. A., Charles, K., Klemm, F., Pukrop, T., Binder, C., Balkwill, F. R. (2005) "Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK", *J Immunol* 175(2): 1197-205.
260. Karin, M. (2006) "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression", *Nature* 441(7092): 431-6.
261. Bessho, R., Matsubara, K., Kubota, M., Kuwakado, K., Hirota, H., Wakazono, Y., Lin, Y. W., Okuda, A., Kawai, M., Nishikomori, R., et al. (1994) "Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes", *Biochem Pharmacol* 48(10): 1883-9.
262. Alexandroff, A. B., Jackson, A. M., Paterson, T., Haley, J. L., Ross, J. A., Longo, D. L., Murphy, W. J., James, K., Taub, D. D. (2000) "Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours", *Mol Immunol* 37(9): 515-26.
263. Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Shimizu, K., Mach, F., Libby, P. (2000) "Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice", *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7458-63.
264. Lollini, P. L., Landuzzi, L., Frabetti, F., Rossi, I., Nicoletti, G., Scotlandi, K., Serra, M., Baldini, N., De Giovanni, C., Nanni, P. (1998) "Expression of functional CD40 on human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells", *Clin Cancer Res* 4(8): 1843-9.
265. Voorzanger-Rousselot, N., Favrot, M., Blay, J. Y. (1998) "Resistance to cytotoxic chemotherapy induced by CD40 ligand in lymphoma cells", *Blood* 92(9): 3381-7.
266. Jakobson, E., Jonsson, G., Bjorck, P., Paulie, S. (1998) "Stimulation of CD40 in human bladder carcinoma cells inhibits anti-Fas/APO-1 (CD95)-induced apoptosis", *Int J Cancer* 77(6): 849-53.