

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

---



ANNEE 2008

THESE N° 3106 11

**ESSAI DE MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE PERMETTANT  
DE METTRE EN ÉVIDENCE LES CELLULES D'ORIGINE MYÉLOÏDE  
IMPLIQUÉES DANS L'ANGIOGENÈSE TUMORALE**

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE  
obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE  
du Diplôme d'Etudes spécialisées de Biologie Médicale**

présentée et soutenue publiquement le : 7 mars 2008

**PAR**

Stéphanie GILARD

née le 01/09/1978 au Puy-en-Velay



**EXAMINATEURS DE LA THESE**

M. le Professeur RIGAUD..... - Président, Directeur de thèse  
M. le Professeur BERTIN..... - Juge  
M. le Professeur DUROUX..... - Juge  
M. le Professeur MONTEIL..... - Juge

---

**UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE MEDECINE**

---

**DOYEN DE LA FACULTE:**

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

**ASSESEURS:**

Monsieur le Professeur LASKAR Marc  
Monsieur le Professeur VALLEIX Denis  
Monsieur le Professeur COGNE Michel

**SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS**

**ROCHE** Doriane

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:**

\* C.S = Chef de Service

ACHARD Jean-Michel  
ADENIS Jean-Paul \* (C.S)  
ALAIN Sophie  
ALDIGIER Jean-Claude (C.S)  
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)  
ARNAUD Jean-Paul (C.S)  
AUBARD Yves (C.S)  
BEDANE Christophe (C.S)  
BERTIN Philippe FF (C.S)  
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)  
BONNAUD François (C.S)  
BONNETBLANC Jean-Marie  
BORDESSOULE Dominique (C.S)  
CHARISSOUX Jean-Louis  
CLAVERE Pierre (C.S)  
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)  
COGNE Michel (C.S)  
COLOMBEAU Pierre  
CORNU Elisabeth  
COURATIER Philippe  
DANTOINE Thierry  
DARDE Marie-Laure (C.S)  
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)  
DENIS François (C.S)  
DESCOTTES Bernard (C.S)  
DESSPORT Jean-Claude  
DUDOGNON Pierre (Sur 31/08/2009)  
DUMAS Jean-Philippe (C.S)  
DUMONT Daniel (C.S)  
FEISS Pierre (C.S)  
FEUILLARD Jean (C.S)  
GAINANT Alain (C.S)  
GAROUX Roger (C.S)  
GASTINNE Hervé (C.S)  
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile  
LABROUSSE François (C.S)  
LACROIX Philippe  
LASKAR Marc (C.S)  
LIENHARDT-ROUSSIE Anne  
MABIT Christian  
MARQUET Pierre

PHYSIOLOGIE  
OPHTALMOLOGIE  
BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE  
NEPHROLOGIE  
MEDECINE INTERNE  
CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE  
GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE  
DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE  
THERAPEUTIQUE  
OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE  
PNEUMOLOGIE  
DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE  
HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION  
CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE  
RADIOTHERAPIE  
PSYCHIATRIE ADULTES  
IMMUNOLOGIE  
UROLOGIE  
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE  
NEUROLOGIE  
GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT  
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE  
PEDIATRIE  
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE  
CHIRURGIE DIGESTIVE  
NUTRITION  
MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION  
UROLOGIE  
MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL  
ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE  
HEMATOLOGIE  
CHIRURGIE DIGESTIVE  
PEDOPSYCHIATRIE  
REANIMATION MEDICALE  
IMMUNOLOGIE  
ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE  
MEDECINE VASCULAIRE  
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE  
PEDIATRIE  
ANATOMIE  
PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

**MATHONNET** Muriel  
**MAUBON** Antoine (C.S)  
**MELLONI** Boris  
**MERLE** Louis (C.S)  
**MONTEIL** Jacques  
**MOREAU** Jean-Jacques (C.S)  
**MOULIES** Dominique (C.S)  
**NATHAN-DENIZOT** Nathalie  
**PARAF** François  
**PILLEGAND** Bernard (Surnombre 31/08/2008)  
**PIVA** Claude (Surnombre 31/08/2008)  
**PLOY** Marie-Cécile  
**PREUX** Pierre-Marie  
**RIGAUD** Michel (Surnombre 31/08/2010)  
**SALLE** Jean-Yves  
**SAUTEREAU** Denis (C.S)  
**SAUVAGE** Jean-Pierre (C.S)  
**STURTZ** Franck  
**TEISSIER-CLEMENT** Marie-Pierre  
**TREVES** Richard  
**TUBIANA-MATHIEU** Nicole (C.S)  
**VALLAT** Jean-Michel (C.S)  
**VALLEIX** Denis  
**VANDROUX** Jean-Claude (C.S)  
**VERGNENEGRE** Alain (C.S)  
**VIDAL** Elisabeth (C.S)  
**VIGNON** Philippe  
**VIROT** Patrice (C.S)  
**WEINBRECK** Pierre (C.S)  
**YARDIN** Catherine (C.S)

CHIRURGIE DIGESTIVE  
 RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE  
 PNEUMOLOGIE  
 PHARMACOLOGIE  
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE  
 NEUROCHIRURGIE  
 CHIRURGIE INFANTILE  
 ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE  
 ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE  
 GASTRO ENTEROLOGIE, HEPATHOLOGIE  
 MEDECINE LEGALE  
 BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE  
 EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION  
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE  
 MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION  
 GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE  
 OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE  
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE  
 ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES  
 RHUMATOLOGIE  
 CANCEROLOGIE  
 NEUROLOGIE  
 ANATOMIE – CHIRURGIE GENERALE  
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE  
 EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE-PREVENTION  
 MEDECINE INTERNE  
 REANIMATION MEDICALE  
 CARDIOLOGIE  
 MALADIES INFECTIEUSES  
 CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

#### **MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS**

<b>AJZENBERG</b> Daniel	Parasitologie et Mycologie
<b>ANTONINI</b> Marie-Thérèse	Physiologie
<b>BOUTEILLE</b> Bernard	Parasitologie - Mycologie
<b>CHABLE</b> Hélène	Biochimie et Biologie Moléculaire
<b>DAVIET</b> Jean-Christophe	Médecine physique et réadaptation
<b>DRUET-CABANAC</b> Michel	Médecine et Santé au Travail
<b>DURAND-FONTANIER</b> Sylvaine	Anatomie – Chirurgie Digestive
<b>ESCLAIRE</b> Françoise	Biologie Cellulaire
<b>JULIA</b> Annie	Hématologie
<b>LE GUYADER</b> Alexandre	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
<b>MOUNIER</b> Marcelle	Bactériologie – virologie – hygiène hospitalière
<b>PETIT</b> Barbara	Anatomie et cytologie pathologiques
<b>PICARD</b> Nicolas	Pharmacologie Fondamentale
<b>QUELVEN-BERTIN</b> Isabelle	Biophysique et Médecine Nucléaire
<b>RONDELAUD</b> Daniel	Cytologie et Histologie
<b>TERRO</b> Faraj	Biologie Cellulaire
<b>VERGNE-SALLE</b> Pascale	Thérapeutique
<b>VINCENT</b> François	Physiologie

#### **P.R.A.G.**

<b>GAUTIER</b> Sylvie	Anglais
-----------------------	---------

#### **PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS**

<b>BUCHON</b> Daniel	Médecine générale
<b>BUISSON</b> Jean-Gabriel	Médecine générale

#### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS**

<b>DUMOITIER</b> Nathalie	Médecine Générale
<b>PREVOST</b> Martine	Médecine Générale

## REMERCIEMENTS

A **Monsieur le Professeur RIGAUD**, Professeur des universités de Biochimie et Biologie Moléculaire, de nous faire l'honneur de présider ce jury et de m'avoir accordé votre confiance pour réaliser ce travail.

A **Monsieur le Professeur BERTIN**, Professeur des universités de Thérapeutique, Docteur en Médecine, Docteur es Sciences, Rhumatologue des Hôpitaux, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de participer à ce jury de thèse.

A **Monsieur le Professeur DUROUX**, Professeur de Physique - Biophysique, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de participer à ce jury de thèse.

A **Monsieur le Professeur MONTEIL**, Professeur des universités de Biophysique et traitement de l'image, nous vous remercions de l'intérêt que vous portez à ce travail en acceptant de le juger. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde considération.

Et tout particulièrement,

A **Mademoiselle le docteur Guislaine BARRIERE**, je te remercie de m'avoir initiée aux joies de la biologie moléculaire, de m'avoir soutenue et encadrée tout au long de ce travail. Et un sincère remerciement pour ta gentillesse et ta disponibilité.

A **Madame Hélène CHABLE**, Maître de Conférence des Universités, Praticien Hospitalier, je vous remercie pour votre gentillesse et votre disponibilité.

A **Monsieur le Docteur Ahmed BOUMEDIENE**, Praticien Hospitalier, je te remercie pour ton aide précieuse en cytométrie de flux.

Aux internes courageux qui m'ont donné leur sang,  
David, Clothilde, Delphine, Marie-Laurence, Mathilde.  
Merci d'avoir fait partie de ma gamme de témoins, et de ne pas avoir eu peur qu'on vous découvre des métastases !

A mes co-internes du laboratoire de bactériologie,  
Paméla, Axel, Elodie, Aurélie, Hélène, Nathalie,  
qui m'ont soutenu avec bonne humeur pendant toute la rédaction de cette thèse.  
Je passe un excellent stage avec vous.

Aux amis de Clermont, Bordeaux et Toulouse,  
Mahussi, Marie, Sébastien, Vanina, Stéphanie, Mathieu, Bénédicte, Magalie

A mes parents, mes sœurs Armelle et Maud, mes grands-parents, toute ma famille,  
Particulièrement à Yann, de m'avoir copieusement aidée pour la mise en page,  
Et à mon petit Matthieu, d'avoir été très sage chez ses grands-parents pendant que je rédigeais.

## ABRÉVIATIONS

**ACE** : antigène carcino-embryonnaire  
**ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire  
**Ang** : angiopoïétine  
**ARNm** : acide ribonucléique messenger  
**Bcl** : B cell lymphoma  
**BET** : bromure d'éthidium  
**bFGF** : basic fibroblast growth factor  
**BMDC** : bone marrow derived cells  
**BSA** : bovine serumalbumin  
**CCL** : C-C chemokine ligand  
**CCR** : C-C chemokine receptor  
**CD** : cluster of differentiation  
**CEC** : cellule endothéliale circulante  
**cellule NK** : cellule natural killer  
**CEP** : progéniteurs des cellules endothéliales  
**CMF** : cytométrie de flux  
**CSF-1** : colony-stimulating factor-1  
**CTC** : cellule tumorale circulante  
**CXCR4** : CXC chemokine receptor 4  
**dNTP** : désoxyribonucléotides triphosphate  
**EDTA** : ethylene diamine tetracetic acid  
**EGF** : epidermal growth factor,  
**EMT** : epithelial to mesenchymal transition  
**FGF** : fibroblast growth factor  
**FISH** : fluorescence in situ hybridisation  
**FITC** : fluorescéine isothiocyanate  
**FSC** : forward scattering  
**5-FU** : 5-fluoro-uracil  
**G-CSF** : granulocyte colony stimulating factor  
**HIF-1 $\alpha$**  : hypoxia inducible factor-1 $\alpha$

**Id3** : inhibitor of differentiation 3  
**IgG** : immunoglobuline G  
**IL** : interleukine  
**KitL** : Kit ligand  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**MCP** : monocyte chemoattractant protein  
**M-CSFR** : macrophage-colony stimulating factor receptor  
**MET** : mesenchymal to epithelial transition  
**MGG** : may grunewald giemsa  
**MIP-1** : macrophage inflammatory protein-1  
**MMP** : matrix metalloproteinase  
**MTC** : microembols tumoraux circulants  
**Muc-1** : mucine-1  
**NO** : monoxyde d'azote  
**NP** : neuropiline  
**pb** : paire de bases  
**PBS** : phosphate buffer saline  
**PCR** : polymerase chain reaction  
**PDGF** : platelet derived growth factor  
**PE** : phycoérythrine  
**PECAM 1** : platelet-endothelial cell adhesion molecule  
**PE-Cy5** : phycoérythrine-cyanine5  
**PE-Cy7** : phycoérythrine-cyanine7  
**PIGF** : placental growth factor  
**RANTES** : regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted  
**RPMI** : roswell park memorial institute  
**RT** : reverse transcription  
**SDF-1** : stromal derived factor-1  
**sKitL** : soluble Kit Ligand  
**SSC** : side scattering  
**TAM** : tumor associated macrophage  
**TBE** : tris borate EDTA  
**TEM** : Tie2 expressing monocyte/macrophage  
**TEP** : tomographie à émission de positons

**TGF $\beta$**  : transforming growth factor  $\beta$   
**TIMP-1** : tissue inhibitor of metalloproteinase-1  
**TNF $\alpha$**  : tumor necrosis factor  $\alpha$   
**TPO** : thrombopoïétine  
**uPA** : urokinase plasmogen activator  
**VCAM** : vascular cell adhesion molecule  
**VEGF** : vascular endothelial growth factor  
**VEGF-R** : vascular endothelial growth factor receptor  
**VLA-4** : very late antigen-1  
**vWF** : von Willebrand factor  
 **$\alpha$ -SMA** :  $\alpha$ -smooth muscle actin

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	12
<b>PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	13
<b>I. L'angiogenèse tumorale</b> .....	13
1) Quelques généralités sur l'angiogenèse.....	13
2) Les différentes étapes de l'angiogenèse tumorale.....	13
3) Les caractéristiques des vaisseaux tumoraux.....	15
4) Les thérapeutiques anti-angiogéniques.....	16
<b>II. Les cellules d'origine myéloïde et endothéliale impliquées dans l'angiogenèse tumorale</b> .....	18
1) Le rôle des leucocytes en général.....	18
2) Le recrutement des monocytes / macrophages dans la tumeur.....	19
3) Les macrophages associés aux tumeurs (TAM).....	20
4) Les macrophages exprimant Tie2 (TEM).....	21
a. <i>Le phénotype des TEM</i> .....	21
b. <i>La répartition des TEM dans le sang et les tissus</i> .....	22
5) Les cellules accessoires ou Bone marrow derived cells (BMDC).....	23
a. <i>Une définition</i> .....	23
b. <i>Les cellules Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup></i> .....	25
c. <i>Les autres types de cellules accessoires</i> .....	26
d. <i>Les marqueurs des cellules accessoires</i> .....	28
6) Les cellules endothéliales circulantes (CEC).....	28
a. <i>L'intérêt des cellules endothéliales circulantes</i> .....	28
b. <i>Les causes du détachement des cellules endothéliales du mur vasculaire</i> .....	29
c. <i>Le phénotype des CEC</i> .....	29
7) Les progéniteurs des cellules endothéliales (CEP).....	29
a. <i>Une définition des CEP</i> .....	29
b. <i>Le phénotype des CEP</i> .....	30
8) Le phénotype des cellules d'origine myéloïde et endothéliale impliquées dans l'angiogenèse tumorale.....	32
<b>III. Les mécanismes permettant le recrutement des cellules d'origine médullaire par la tumeur</b> .....	35
1) Quelques généralités.....	35
2) Les rôles de l'angiopoïétine-2 et de l'hypoxie dans le recrutement des TEM.....	37
a. <i>Quelques généralités sur les angiopoïétines</i> .....	37
b. <i>Le rôle de l'angiopoïétine-2 pour le recrutement des TEM</i> .....	38
c. <i>Le rôle de l'hypoxie pour le recrutement des TEM</i> .....	39
d. <i>L'association de ces deux facteurs</i> .....	39
3) Le VEGF (vascular endothelial growth factor).....	39
a. <i>Une définition</i> .....	39
b. <i>Les récepteurs du VEGF</i> .....	40
c. <i>Les fonctions du VEGF dans la néovascularisation</i> .....	42
4) L'axe SDF-1 / CXCR4.....	43

5) Le rôle des intégrines dans le recrutement des cellules accessoires .....	46
a. <i>Quelques généralités</i> .....	46
b. <i>L'intégrine <math>\alpha 4\beta 1</math> ou VLA-4 (very late antigen-1)</i> .....	46
6) MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) et soluble Kit ligand .....	47
a. <i>MMP-9</i> .....	47
b. <i>Soluble Kit ligand</i> .....	47
7) Les gènes Id.....	48
8) La niche pré-métastatique .....	49
<b>PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODE</b> .....	51
<b>I. Les prérequis</b> .....	51
1) Les patients.....	51
2) Les témoins .....	52
3) Le prélèvement.....	52
<b>II. La technique d'isolement des cellules accessoires et des TEM</b> .....	53
1) Les billes magnétiques .....	53
2) Les anticorps .....	54
3) La première étape : marquage des billes magnétiques.....	55
4) La deuxième étape : enrichissement en cellules accessoires et TEM .....	55
<b>III. Les techniques de biologie moléculaire</b> .....	57
1) L'extraction des ARNm :.....	57
a. <i>La préparation des billes Oligo(dT)<sub>25</sub></i> .....	57
b. <i>L'extraction des ARNm</i> .....	57
2) La Transcription Reverse (RT) : .....	58
a. <i>La préparation du mélange réactionnel</i> .....	58
b. <i>La synthèse d'ADNc</i> .....	59
3) La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) multiplexe : .....	59
a. <i>Les amorces utilisées</i> .....	59
b. <i>La préparation du mélange réactionnel</i> .....	61
c. <i>L'amplification</i> .....	61
d. <i>L'électrophorèse des produits de PCR</i> .....	61
<b>IV. La technique de cytométrie de flux</b> .....	63
1) Quelques généralités sur la cytométrie de flux .....	63
2) Le marquage cytométrique.....	63
<b>PARTIE III : RÉSULTATS</b> .....	64
<b>I. Mise au point</b> .....	65
1) L'isolement des cellules accessoires et des TEM.....	65
2) La PCR Multiplexe.....	65
<b>II. La première série de manipulations</b> .....	68
1) Le choix des anticorps.....	68
2) Le choix des amorces .....	69
3) Les résultats de la PCR multiplexe .....	70
a. <i>Chez les témoins</i> .....	70
b. <i>Chez les patients</i> .....	71
4) Un essai de semi-quantification .....	73
5) Quelques statistiques .....	75
6) La corrélation de nos résultats avec la clinique au sein du groupe de malades .....	76
<b>III. La deuxième série de manipulations</b> .....	79
1) Les résultats de la cytométrie .....	81

a.	<i>L'isolement avec un anticorps anti-CD16 seul</i>	81
b.	<i>L'isolement avec un anticorps anti-CD16 couplé à un anticorps anti-Tie2</i>	82
c.	<i>L'isolement avec un anticorps anti-CD14 seul</i>	83
d.	<i>L'isolement avec un anticorps anti-CD14 couplé à un anticorps anti-Tie2</i>	84
e.	<i>L'isolement avec un anticorps anti-Tie2 seul</i>	84
<b>IV.</b>	<b>La troisième série de manipulations</b>	86
1)	L'isolement des TEM	86
2)	Le choix des amorces	86
3)	Les résultats de la PCR multiplexe	87
<b>V.</b>	<b>Comparaison avec la détection des cellules tumorales circulantes</b>	89
1)	Quelques généralités sur les cellules tumorales circulantes (CTC)	89
a.	<i>Les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses</i>	89
b.	<i>La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)</i>	89
c.	<i>Les marqueurs des cellules tumorales circulantes</i>	91
2)	Quelques généralités sur les méthodes de détection des cellules tumorales circulantes (CTC)	91
a.	<i>Les méthodes indirectes immuno-magnétiques</i>	92
b.	<i>La RT-PCR dans le cadre de la détection des CTC</i>	92
3)	La méthode de détection des cellules tumorales circulantes du kit AdnaGen®	93
a.	<i>L'isolement des cellules tumorales circulantes avec les anticorps fournis par le kit AdnaGen®</i>	93
b.	<i>La RT-PCR du kit Adnagen®</i>	94
<b>PARTIE IV : DISCUSSION</b>		98
<b>I.</b>	<b>Bilan des différentes manipulations</b>	99
1)	Un problème de spécificité lors de l'isolement	99
a.	<i>Lors de l'utilisation de la double combinaison d'anticorps</i>	99
b.	<i>Lors des analyses par cytométrie de flux</i>	100
c.	<i>Lors de l'isolement réalisé avec l'anticorps dirigé contre Tie2 seul</i>	100
d.	<i>Comparaison de nos isolements avec ceux obtenus grâce au kit Adnagen®</i>	100
2)	Un problème de spécificité de la PCR	101
3)	Les limites de la cytométrie de flux	101
4)	Un échantillon de patients trop réduit	102
a.	<i>Lors de l'isolement avec la double combinaison d'anticorps</i>	102
b.	<i>Lors de l'isolement avec l'anticorps dirigé contre Tie2</i>	102
<b>II.</b>	<b>Perspectives</b>	103
1)	Quelques pistes d'amélioration	103
2)	Impact thérapeutique	103
<b>CONCLUSION</b>		104
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		105

## INTRODUCTION

Pour comprendre les mécanismes cancéreux et tenter de les combattre, l'approfondissement des connaissances sur l'angiogenèse tumorale est sans doute une étape déterminante. Le but de nombreux spécialistes est d'identifier, au sein de ce processus complexe, des indicateurs du développement tumoral pour détecter le plus tôt possible la maladie.

Dans cette optique, les cellules d'origine myéloïde ayant une activité proangiogénique attirent leur attention depuis quelques années. Parmi elles, nous avons étudié :

- les TEM (Tie2 expressing monocytes / macrophages),
- les cellules accessoires, encore appelées BMDC (cellules dérivées de la moelle osseuse) ou « hémangiocytes ».

Ces cellules précèdent l'arrivée des cellules tumorales circulantes sur les lieux des futures métastases. A ce jour, elles font partie des marqueurs connus les plus précoces de l'angiogenèse tumorale.

Notre travail a consisté en la mise au point d'une technique permettant de mettre en évidence les cellules accessoires et les TEM dans le sang de patients et de témoins. Celle-ci a combiné :

- une première étape d'enrichissement immunomagnétique,
- une seconde étape de biologie moléculaire permettant la comparaison de l'expression de différents marqueurs entre un groupe de malades et un groupe de témoins.

# PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## **I. L'angiogenèse tumorale**

### 1) Quelques généralités sur l'angiogenèse

Les vaisseaux sanguins peuvent se former selon deux mécanismes [1]:

- la vasculogenèse, qui se produit seulement à la période embryonnaire et qui correspond à la génération des vaisseaux à partir de progéniteurs endothéliaux ;
- l'angiogenèse, qui correspond à un mécanisme de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant. Elle est particulièrement importante et indispensable au cours de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire ou l'implantation du placenta. Mais elle est aussi déterminante dans des situations pathologiques, en particulier lors de la croissance des tumeurs et du développement des métastases.

Le processus angiogénique est un mécanisme hautement régulé dans les conditions physiologiques par :

- des molécules activatrices : entre autres, VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), angiopoïétines 1 et 2, intégrines et protéases de la matrice extracellulaire [2] ;
- et des molécules inhibitrices : angiostatine, endostatine, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1), fragment de 140 kDa de la thrombospondine [2].

### 2) Les différentes étapes de l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale correspond à la création d'un réseau vasculaire dérivé des vaisseaux sanguins préexistants de l'hôte, en réponse à une augmentation de la demande en nutriments et en oxygène des cellules tumorales qui prolifèrent. En effet, les cellules tumorales ont besoin d'un apport en oxygène et en nutriments proportionnel à leur forte consommation

énergétique. Il leur est également indispensable de pouvoir éliminer les déchets provenant de leur métabolisme. Tant que l'épaisseur de la tumeur est inférieure à 1 ou 2 mm<sup>3</sup>, la diffusion à travers la paroi des vaisseaux à proximité suffit à permettre ces échanges [3]. De plus, l'activité mitotique des cellules tumorales diminue considérablement en s'éloignant des vaisseaux. La tumeur répond donc à la nécessité d'être vascularisée en sécrétant des facteurs proangiogéniques.

Le processus angiogénique tumoral est déclenché par l'hypoxie intratumorale. Il se déroule en quatre grandes étapes :

- sécrétion de VEGF (vascular endothelial growth factor) par la tumeur, entraînant l'activation, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Celles-ci se mettent à produire de nombreuses enzymes comme les collagénases, héparinases, métalloprotéinases qui dégradent la matrice extracellulaire, créant ainsi un espace libre pour les cellules endothéliales migrantes, et libérant des facteurs de croissance qui, en l'absence de dégradation, resteraient séquestrés dans la matrice ;
- formation d'un réseau primitif de cellules endothéliales,
- puis recrutement de cellules périvasculaires stabilisatrices,
- enfin, formation d'une lumière vasculaire fonctionnelle et apparition du flux sanguin [4].

Il a été démontré récemment que pendant cette dernière étape, il existe une forte interaction entre les cellules immunitaires de l'hôte et le réseau vasculaire [1, 5]. Les macrophages, granulocytes et cellules dendritiques sont des composants majoritaires des tissus précancéreux et cancéreux qui promeuvent l'angiogenèse en sécrétant de nombreux facteurs angiogéniques.

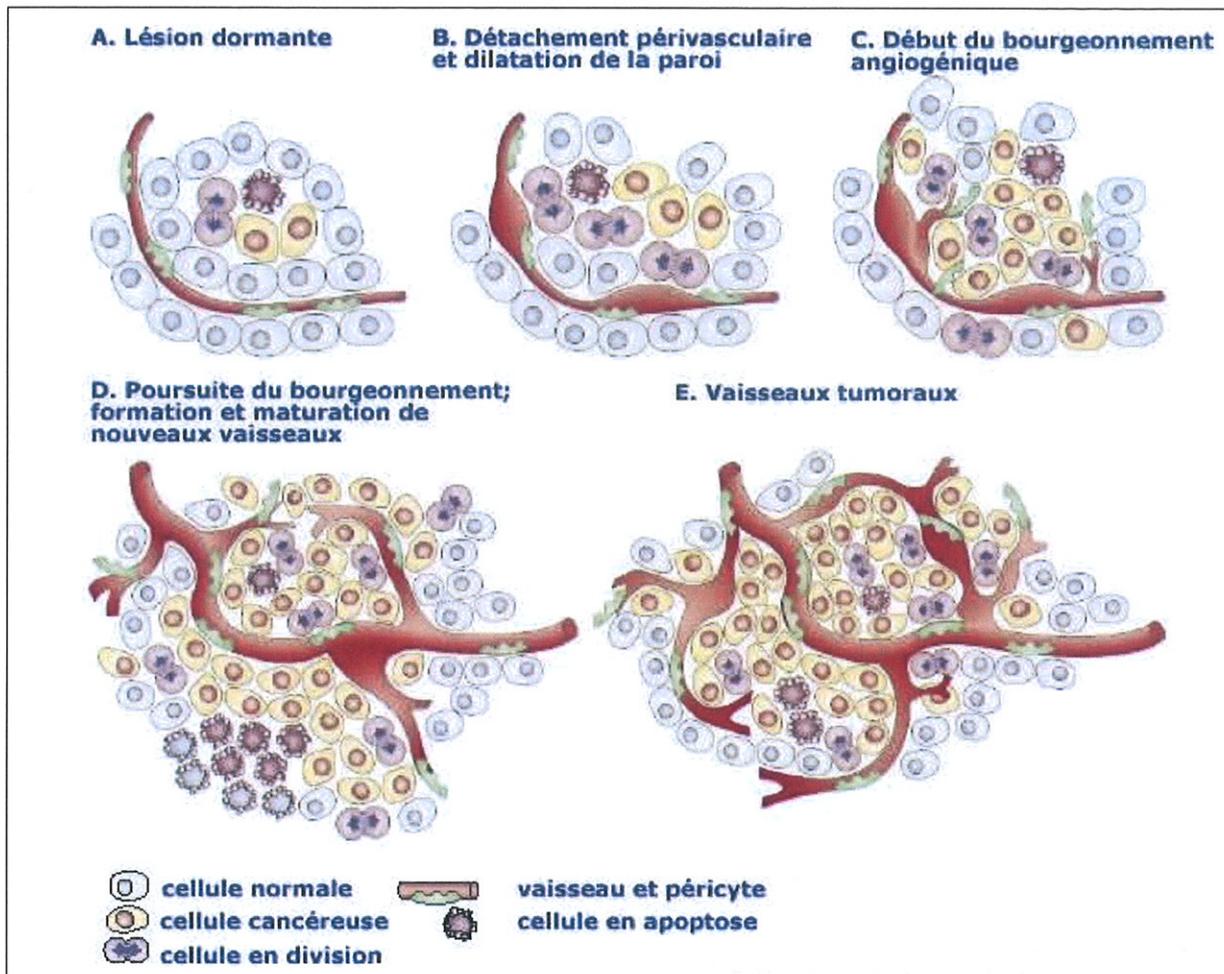


Schéma n° 1 : La formation des vaisseaux tumoraux [6]

### 3) Les caractéristiques des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux irriguant les tumeurs fournissent l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance tumorale. Leur membrane basale est interrompue, parfois même absente, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'extravasation d'hématies.

Le réseau vasculaire est alors chaotique, tortueux, fragilisé. Sa morphologie rappelle celle des capillaires aux stades précoces de l'angiogenèse physiologique. Les vaisseaux tumoraux opposent une résistance anormale au flux sanguin. Leur perfusion est inadéquate en l'absence de structure hiérarchisée, avec la présence de shunts artério-veineux, d'extrémités aveugles, de circonvolutions des vaisseaux et d'irrégularités de leurs contours, de l'adhérence des lymphocytes aux parois et de l'agrégation des plaquettes [7, 8].

#### 4) Les thérapeutiques anti-angiogéniques

C'est en 1971 qu'un biologiste américain, le docteur Judah Folkman, formula un concept novateur pour l'époque : celui des médicaments "anti-angiogéniques". Il émit l'hypothèse qu'en entravant la formation de ces nouveaux vaisseaux, on affamerait la tumeur et on empêcherait les cellules tumorales d'emprunter le réseau sanguin pour aller former des métastases dans d'autres organes. Son article, publié dans le *New England Journal of Medicine*, permit le développement des recherches contre la néo-angiogenèse tumorale.

Il est maintenant bien établi que le développement d'une vascularisation intra ou péri-tumorale est un événement clé, autant pour la croissance d'une tumeur que pour sa dissémination métastatique par voie sanguine.

Un des arguments présentés en faveur des thérapies anti-angiogéniques repose sur le fait que les cellules endothéliales sont des cellules normales. Elles ne sont donc pas génétiquement instables comme le sont les cellules cancéreuses, et on peut s'attendre à ce qu'elles ne développent pas de résistance aux traitements dirigés contre elles.

Cette hypothèse a été vérifiée à la fin de l'année 1997, avec l'endostatine, un fragment du collagène XVIII. L'administration d'une suspension d'endostatine provoque la régression de tumeurs implantées sous la peau. Ces tumeurs demeurent assoupies aussi longtemps que le traitement est maintenu. Dès la fin du traitement, elles se réveillent et croissent à nouveau. L'administration d'endostatine provoque à nouveau leur régression. Il est possible de répéter plusieurs fois ce cycle de traitement sans observer de changement de la vitesse de régression des tumeurs. Qui plus est, les tumeurs restent définitivement endormies, après 2 à 6 cycles de traitement selon les cellules cancéreuses utilisées [9].

Depuis, de nombreuses molécules inhibant les principaux facteurs proangiogéniques ont été testées au cours d'essais cliniques [10, 11]:

- des inhibiteurs du VEGF et de ses récepteurs,
- des inhibiteurs des métalloprotéinases.

Un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A, le bevacizumab (Avastin®), est maintenant utilisé pour traiter les cancers colorectaux métastasés en association au 5-fluorouracil (5-FU) [11].

La combinaison de la thérapie anti-angiogénique avec une chimiothérapie cytotoxique ou une radiothérapie entraîne une synergie des effets anti-tumoraux et augmente la survie des patients. En effet, l'accélération de la prolifération des cellules tumorales entre les cures de chimiothérapie ou de radiothérapie est une importante cause d'échec du traitement.

L'instauration d'un traitement anti-angiogénique pendant ces intervalles inhibe cette prolifération tumorale.

Si les cellules endothéliales sont génétiquement stables, les cibles ultimes des traitements anti-angiogéniques sont les cellules tumorales. Elles sont capables de s'adapter aux variations d'environnement qui leur sont imposées. La microcirculation est très hétérogène à l'intérieur des tumeurs humaines ; le flux sanguin varie considérablement dans des tumeurs de même grade aux mêmes sites. Ces variations peuvent conduire à une hétérogénéité de l'efficacité du blocage de l'angiogenèse. Si, dans certaines régions, l'anoxie est capable de tuer les cellules tumorales, il peut subsister des régions dans lesquelles les cellules restent en hypoxie. Dans ces régions, la production de facteurs angiogéniques sera stimulée, des cellules résistantes plus malignes pourront être sélectionnées [9, 11].

## II. Les cellules d'origine myéloïde et endothéliale impliquées dans l'angiogenèse tumorale

### 1) Le rôle des leucocytes en général

Les nombreuses sous-populations leucocytaires produisent des facteurs angiogéniques :

- vascular endothelial growth factor (VEGF),
- platelet derived growth factor (PDGF),
- basic Fibroblast growth factor (bFGF),
- angiopoïétine-2 (Ang-2),
- epidermal growth factor (EGF),
- transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1),
- monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1),
- ainsi que des interleukines et des protéases : tryptase, chymase, MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), héparinase et uPA (urokinase plasmogen activator).

A titre d'exemple :

- les polynucléaires neutrophiles et les cellules NK sont impliqués dans l'angiogenèse cyclique utérine et ses anomalies (endométriose) ;
- les macrophages associés aux tumeurs induisent la croissance tumorale en relarguant et en induisant la sécrétion de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales ;
- les mastocytes se situent à la périphérie des tumeurs invasives et s'y accumulent pendant les stades précancéreux. Ils ont une activité proangiogénique directe par production de MMP-9, bFGF, VEGF, interleukine 8 et de TNF $\alpha$ . Ils sécrètent des sérine protéases spécifiques (MCP-4 et MCP-6) qui activent les proMMP, ce qui stimule la synthèse de collagène par les fibroblastes du stroma tumoral. Leur production de VEGF entraîne une augmentation de l'expression de MMP-9 par les cellules du stroma, et ainsi une augmentation de la réponse angiogénique du microenvironnement tumoral [12].

Les leucocytes produisent aussi des inhibiteurs angiogéniques, leur rôle dans l'inhibition ou la promotion de l'angiogenèse dépend de la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques.

## 2) Le recrutement des monocytes / macrophages dans la tumeur

Les monocytes dérivent d'un progéniteur médullaire CD34<sup>+</sup>, qui prolifère continuellement et donne des promonocytes qui passent dans le sang. Les promonocytes subissent une maturation et deviennent monocytes. Mobilisés par une grande variété de stimuli inflammatoires, ces monocytes sont capables de s'extravaser dans les tissus où ils débutent leur transformation en macrophages "résidents" [13].

Le phénotype des macrophages résidents varie beaucoup en fonction du tissu où ils logent :

- au niveau cérébral : cellules microgliales,
- au niveau hépatique : cellules de Kupffer,
- au niveau cutané : cellules de Langherans.

Les monocytes et macrophages représentent plus de 5 % des cellules d'une tumeur, où ils développent aussi un phénotype particulier [14].

Les macrophages résidents des tissus non tumoraux sont capables :

- de lyser les cellules tumorales,
- de présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T,
- de sécréter des cytokines stimulant la prolifération et les fonctions anti-tumorales des lymphocytes T et des cellules NK (natural killer).

Au sein d'une tumeur et dans le sang circulant de témoins et de malades, on dénombre trois sous-populations monocytaires [15, 16, 17]. Elles sont différenciées par leurs marqueurs de surface. On distingue ainsi :

- les monocytes de l'inflammation : CD14<sup>fort</sup>/CD16<sup>-</sup>,
- les TAM (tumor associated macrophages) : CD14<sup>faible</sup>/CD16<sup>+</sup>/Tie2<sup>-</sup>,
- les TEM (Tie2 expressing macrophages) : CD14<sup>faible</sup>/CD16<sup>+</sup>/Tie2<sup>+</sup>.

Toutes ces populations possèdent le marqueur CD14 spécifique de la lignée monocyttaire. Les TEM sont les seuls à exprimer le récepteur de l'angiopoïétine, Tie2. Nous étudierons plus loin leurs particularités.

Enfin, plusieurs scientifiques pensent que des monocytes recrutés dans une tumeur peuvent également se différencier en cellules endothéliales (sans qu'ils aient encore découvert quelles substances seraient responsables de ce phénomène) [12].

### 3) Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

Les TAM (tumor associated macrophages) sont capables de stimuler *in vivo* :

- l'angiogenèse : *Jin et al.* [18] ont montré que des monocytes exprimant le marqueur CD11b sont capables de stimuler directement l'angiogenèse et de potentialiser les effets du VEGF-A ;
- mais aussi la lymphangiogenèse (ils expriment les VEGF-C et D) : celle-ci permet la dispersion métastatique dans le système lymphatique [19].

Contrairement aux macrophages résidents des tissus sains, les TAM ont une mauvaise capacité de présentation des antigènes et inhibent la prolifération ainsi que l'activité des lymphocytes T [13].

En libérant des facteurs chimiotactiques, les TAM sont impliqués dans toutes les étapes de la progression tumorale :

- invasion du tissu sain entourant la tumeur,
- croissance tumorale,
- angiogenèse,
- formation des métastases [20].

Il existe une forte corrélation entre la densité de TAM et la densité vasculaire de plusieurs types de tumeurs humaines. Ainsi, un nombre élevé de TAM est généralement associé à un mauvais pronostic dans les cancers du sein, prostatiques, ovariens et cervicaux [13]. Le rôle des TAM est très important, car en bloquant leur recrutement par la tumeur dans un modèle utilisant des souris déficientes en CSF-1 (colony-stimulating factor-1, un puissant facteur chimioattractant), il n'y a plus d'angiogenèse, ni de croissance tumorale, ni de métastases [13].

Les macrophages associés aux tumeurs sont répartis en deux groupes [14] :

- les macrophages M1, qui promeuvent l'immunité anticancéreuse en sécrétant du TNF $\alpha$  et de l'interleukine 12 ;
- les macrophages M2, qui potentialisent la néovascularisation en relarguant de nombreuses cytokines proangiogéniques (VEGF, IL8, bFGF). Ils expriment aussi de nombreuses protéases connues pour faciliter les processus angiogéniques en remodelant la matrice extracellulaire : activateur du plasminogène (uPA), métalloprotéinases (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12), élastases. La dégradation de la matrice extracellulaire permet la mobilisation des facteurs de croissance et facilite la migration des cellules vasculaires dans ce nouveau microenvironnement.

Généralement, au sein d'une tumeur, la population M2 est majoritaire.

#### 4) Les macrophages exprimant Tie2 (TEM)

Les études de *De Palma et al.* [15, 21, 22] ont mis en évidence la présence d'une population appelée TEM (Tie2 expressing macrophages) dans plusieurs modèles tumoraux murins et humains. Ils représentent une petite sous-population des leucocytes CD11b<sup>+</sup> infiltrant le tissu cancéreux : environ 15 % [12]. Ils sont absents des tissus sains adjacents à la tumeur.

Les TEM se distinguent des TAM par :

- leurs marqueurs de surface (Tie2<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>),
- leur localisation préférentielle au niveau des zones d'angiogenèse,
- leur activité proangiogénique supérieure.

Les TEM tissulaires auraient comme précurseurs les monocytes circulants exprimant le récepteur particulier Tie2. Ce récepteur n'était auparavant décrit que sur les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques. Il est exprimé par deux autres types de cellules impliquées dans l'angiogenèse tumorale : les TEM et les précurseurs des péricytes [21]. Un des ligands de Tie2, l'angiopoïétine-2, est produite par les vaisseaux tumoraux et attirerait les TEM dans les tissus. À l'intérieur de la tumeur, l'hypoxie augmenterait l'expression de Tie2 sur les TEM et associée à l'angiopoïétine-2, inhiberait leur activité anti-tumorale [16, 17].

La grande activité proangiogénique des monocytes circulants exprimant le récepteur Tie2 et des TEM infiltrant les tumeurs a été mise en évidence dans des modèles murins. Ces modèles comparent la vascularisation tumorale dans trois cas :

- après injection de cellules tumorales seules,
- après injection de cellules tumorales associées à des cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup>/Tie2<sup>-</sup>,
- après injection de cellules tumorales associées à des TEM.

L'aire vasculaire est multipliée par quatre chez les souris co-injectées avec les TEM, ce qui montre l'importance de ces cellules [21].

##### *a. Le phénotype des TEM*

La cytométrie de flux a permis d'étudier le phénotype complet des TEM. Ce sont des cellules myéloïdes CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, qui expriment [15, 17]:

- faiblement le marqueur monocytaire CD14,
- fortement le CD16 (un marqueur des cellules dendritiques),

- Tie2 plus faiblement que les cellules endothéliales,
- VEGFR-2 dans 1 à 2 % des cas. Il s'agit d'un des récepteurs du VEGF, utilisé pour identifier les cellules endothéliales circulantes et leurs progéniteurs, ce qui sous-entend que cette population monocyttaire possède une capacité de différenciation endothéliale ;
- CCR5 (C-C chemokine receptor 5). C'est un récepteur des chimiokines RANTES (regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted), MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ) et MIP-1 $\beta$ . CCR5 est exprimé par les macrophages, mais aussi par les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les astrocytes cérébraux.

Les TEM expriment également des marqueurs généralement associés au phénotype des cellules immatures ou progénitrices : le CD33 ou le M-CSFR (macrophage-colony stimulating factor receptor, aussi appelé c-FMS ou CD115) et le CD13 (aminopeptidase N, un marqueur myéloïde).

Les TEM n'expriment pas :

- le CCR2, à la différence des autres macrophages. CCR2 est le récepteur de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, aussi appelé CCL2), une chimiokine impliquée dans le recrutement des monocytes de l'inflammation,
- la L-selectine, une molécule d'adhésion facilitant la progression des leucocytes inflammatoires le long de l'endothélium vasculaire,
- le CD56, un marqueur spécifique des cellules NK,
- les marqueurs spécifiques des lymphocytes B (CD19) ou T (CD3). Ils peuvent en revanche exprimer faiblement le CD4 [15].

De par leur phénotype L-selectine<sup>-</sup>/CCR2<sup>-</sup>, les TEM ne sont pas recrutés dans les tissus inflammatoires.

#### *b. La répartition des TEM dans le sang et les tissus*

Dans le sang périphérique, les TEM représentent :

- 1,6 à 7,4 % (moyenne  $3,3 \pm 1,5$  %) des cellules mononuclées chez des témoins sains,
- 1,8 à 10,1 % (moyenne  $4,9 \pm 3$  %) des cellules mononuclées chez des patients atteints de tumeur. Leur taux est corrélé à la sévérité clinique de la maladie [15].

Si on compare l'expression de Tie2 et :

- du marqueur pan leucocytaire CD45,
- des marqueurs monocytaires CD14 ou CD11b,

- du marqueur de cellules endothéliales CD31, à l'intérieur d'une tumeur et en zone saine, on retrouve que :
  - la majorité des cellules endothéliales CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> ou CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> exprime Tie2,
  - 1 à 12 % des leucocytes intra tumoraux CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>faible</sup> ou <sup>-</sup> exprime aussi Tie2 ; de façon intéressante, 37 à 72 % de cette population est CD14<sup>+</sup>,
  - cette population CD45<sup>+</sup>/Tie2<sup>+</sup> est indétectable dans les tissus non néoplasiques adjacents.

Donc, les TEM Tie2<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ CD14<sup>faible</sup>/ CD16<sup>+</sup> infiltrent les tissus cancéreux mais pas les zones saines à proximité. Dans les tissus sains, l'expression de Tie2 concerne seulement les cellules endothéliales.

## 5) Les cellules accessoires ou Bone marrow derived cells (BMDC)

### a. Une définition

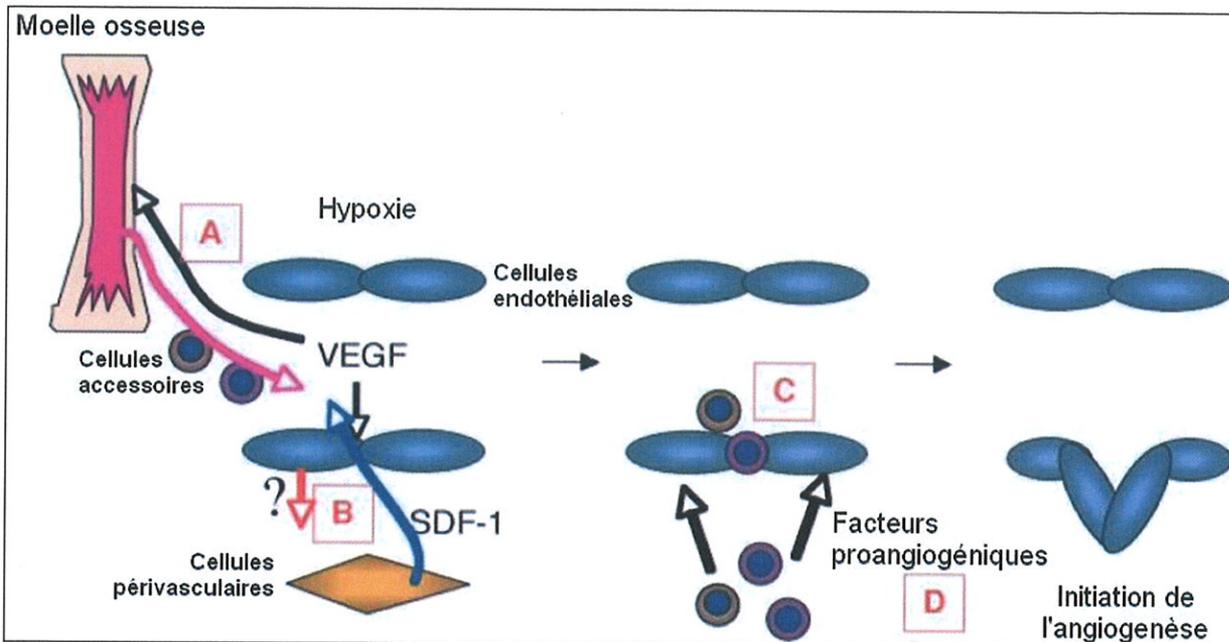
Les cellules accessoires, ou BMDC (bone marrow derived cells), constituent un ensemble très hétérogène de cellules plus ou moins matures d'origine hématopoïétique [5]. Ce sont ces cellules que nous allons chercher à isoler. À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus scientifique pour les caractériser précisément, et des critères stricts d'isolement restent à définir.

La plupart des auteurs [18, 23, 24, 25] s'accordent sur le fait que ce sont des cellules ayant une forte activité proangiogénique, et qui jouent un rôle clé dans l'angiogenèse tumorale.

Il y a quelques années, il était admis que les cellules d'origine hématopoïétique ne participaient à la mise en place de la vascularisation que pendant la période embryonnaire. En effet, chez l'embryon, des cellules souches hématopoïétiques migrent dans les zones non vascularisées et entraînent la croissance des cellules endothéliales en relarguant des facteurs angiogéniques comme l'angiopoïétine-1.

On a récemment prouvé que de façon similaire, chez l'adulte, sous l'influence de divers facteurs angiogéniques (VEGF, PlGF : placental growth factor, angiopoïétines) et de chimiokines (MCP-1, SDF-1), des cellules accessoires, qui expriment le récepteur du VEGF (VEGFR-1), sont attirées de la moelle osseuse vers la circulation périphérique, puis vers la tumeur [25]. Elles se positionnent alors autour des vaisseaux sanguins tumoraux, et stimulent l'angiogenèse en sécrétant des facteurs angiogéniques ainsi que des métalloprotéinases, dont MMP-9. Cette localisation à proximité des vaisseaux suggère que les cellules accessoires pourraient avoir un rôle paracrine sur les cellules endothéliales [5]. En effet, *in vitro*, les

cellules accessoires induisent une prolifération des cellules endothéliales supérieure à celle provoquée par le VEGF seul [26].



#### Schéma n° 2 : Le recrutement des cellules accessoires

A : Les cellules accessoires, originaires de la moelle osseuse, sont recrutées en réponse à une sécrétion de VEGF induite par l'hypoxie tissulaire tumorale.

B : Le VEGF induit une augmentation de la sécrétion de SDF-1 par les cellules entourant les vaisseaux.

C : Les cellules accessoires CXCR4<sup>+</sup> sont piégées et positionnées correctement autour des vaisseaux afin de sécréter des facteurs proangiogéniques.

D : Cela entraîne la multiplication des cellules endothéliales [27].

Lors de la dissémination métastatique, les cellules accessoires précèdent l'apparition des cellules tumorales dans la circulation sanguine et les attirent sur le lieu des futures métastases. On dit qu'elles sont capables de former des niches pré-métastatiques (c'est ainsi que l'on nomme le lieu de la future métastase d'une tumeur) dépendantes de la localisation de la tumeur initiale. En effet, lorsqu'on injecte diverses tumeurs à des souris, les cellules accessoires ne se nichent pas aux mêmes sites [25]:

- dans le cas d'un mélanome, la localisation est pulmonaire, hépatique, testiculaire, splénique et rénale ;
- dans le cas d'un cancer pulmonaire, la localisation est hépatique et pulmonaire.

La caractérisation précise des cellules accessoires ne fait pas consensus. Leur description varie en fonction des auteurs qui les ont étudiées :

- pour *Yang L. et al.*, les cellules accessoires seraient des cellules myéloïdes Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> [23] ;
- pour *Jin H. et al.*, les cellules accessoires seraient plutôt des monocytes/macrophages CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> possédant l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  [18],
- pour *Jin DK. et al.*, les cellules accessoires ou "hémangiocytes" possèderaient les récepteurs CXCR4 et VEGFR-1 [24],
- pour *Kaplan et al.*, les cellules accessoires expriment le gène Id3 et, pour les plus matures, le marqueur CD11b [25].

#### *b. Les cellules Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>*

*Yang L. et al.*, ont identifié des cellules myéloïdes Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, très nombreuses dans la rate et la moelle osseuse d'animaux ayant des tumeurs étendues [23]. Elles sont aussi retrouvées chez l'homme. Elles semblent être d'autant plus présentes dans les tissus dans le cas de tumeurs de grande taille et de longue durée de croissance tumorale.

Ces cellules co-expriment, contrairement aux précurseurs myéloïdes conventionnels :

- Gr-1 : un marqueur de la lignée granuleuse,
- et CD11b, un marqueur de la lignée granulo-monocytaire.

Bien que plus différenciées que les cellules progénitrices classiques, elles expriment quelques uns de leurs marqueurs :

- c-Kit (ou CD117) : 4,82 %,
- CD34 : 7,1 % (le CD34 est un marqueur particulier exprimé à la fois par toutes les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et par les progéniteurs de l'hématopoïèse. C'est une intégrine de la famille des sialoglycoprotéines, possédant des isoformes exprimées dans un grand nombre de tissus, en particulier dans le tissu hématopoïétique [28]),
- Sca-1 (chez la souris).

La particularité des cellules Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> est qu'elles peuvent aussi exprimer des marqueurs endothéliaux : VEGFR-2 et VE-cadhérine dans 4,5 % des cas. L'expression de ces marqueurs est augmentée dans les cellules résidant à l'intérieur des tissus tumoraux. Ceci prouverait qu'elles sont capables de se différencier en cellules endothéliales, et de s'incorporer à l'endothélium dans des conditions de culture proangiogénique.

Lorsqu'on analyse par cytométrie de flux différents tissus tumoraux, les cellules Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> représentent :

- 5,64 % des cellules d'une tumeur colique,
- 5,41 % des cellules du carcinome pulmonaire de Lewis.

Des études réalisées sur des patients atteints de tumeurs montrent qu'il s'agit d'une population hétérogène composée :

- de macrophages immatures,
- de cellules dendritiques immatures,
- de cellules myéloïdes immatures à des stades précoces de différenciation,
- et de moins de 2 % de progéniteurs hématopoïétiques.

Les cellules Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> agissent :

- en potentialisant l'angiogenèse tumorale et la maturation vasculaire,
- en inhibant l'apoptose et la nécrose tumorale.

Les cellules Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> seraient associées à une diminution de la réactivité immune de l'hôte [23, 29]. En effet, elles expriment peu de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ce qui les rend incapables de présenter un antigène et donc, d'induire une réponse immune efficace.

Les cellules Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> issues de patients atteints de tumeurs produisent aussi beaucoup plus de MMP-9 et de proMMP-9 que celles de sujets sains. Ce qui entraîne la régulation :

- de la stabilité vasculaire par recrutement des péricytes,
- de la biodisponibilité du VEGF au sein des tissus cancéreux,
- du relargage de sKitL (soluble Kit Liguand) dans la moelle osseuse, dont la fixation au récepteur c-Kit permet d'attirer d'autres cellules Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> vers les zones à vasculariser.

### *c. Les autres types de cellules accessoires*

Selon *Jin H. et al.*, les cellules accessoires seraient surtout des monocytes/macrophages CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> qui possèderaient l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  [18]. La liaison de cette intégrine à son récepteur, la fibronectine, leur permettrait d'adhérer à l'endothélium vasculaire et d'extravaser dans les tissus tumoraux.

Cette équipe met ainsi en évidence que 59 % des macrophages infiltrant les tumeurs sécrètent de l'interleukine 8, du VEGF-A et du VEGF-C. Les macrophages stimuleraient donc à la fois l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale.

Une autre équipe, *Jin DK. et al.* nomme les cellules accessoires "hémangiocytes" [24]. Pour eux, il s'agit d'une population hétérogène de cellules possédant les récepteurs CXCR4 et VEGFR-1. Le terme "hémangiocyte" caractérise un mélange de progéniteurs hématopoïétiques et de cellules myélo-monocytaires immatures et différenciées ayant une activité proangiogénique.

Les "hémangiocytes" expriment des marqueurs caractéristiques :

- des cellules progénitrices hématopoïétiques : c-Kit, Tie2, Sca-1 chez la souris,
- et de la lignée myéloïde : CD11b.

Bien qu'ayant des fonctions communes avec les progéniteurs des cellules endothéliales, les "hémangiocytes" n'expriment pas leurs marqueurs caractéristiques (VE-cadhérine, E-sélectine, facteur Willebrand). De même, bien qu'ils aient quelques fonctionnalités communes avec les cellules musculaires lisses, ils n'expriment pas l' $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin).

C'est l'hypoxie qui induit le recrutement des "hémangiocytes" à l'intérieur de la moelle osseuse. En effet, l'ischémie entraîne une élévation plasmatique de cytokines activatrices (VEGF, sKitL, thrombopoïétine). Celles-ci induisent la sécrétion de SDF-1 par les plaquettes, et l'attraction des hémangiocytes au niveau des zones néovascularisées.

Pour *Kaplan et al.*, les cellules accessoires sont des cellules myélo-monocytaires qui expriment le gène Id3 (inhibitor of differentiation 3) [25]. Pendant le switch angiogénique, ces cellules se multiplient et passent dans la circulation sanguine, afin d'aller stabiliser les néovaisseaux tumoraux. Elles participent aussi à la formation de la niche pré-métastatique.

Comme la plupart des autres auteurs, ils mettent en évidence qu'une sous-population des cellules accessoires exprime les marqueurs des cellules progénitrices hématopoïétiques : CD133, CD34, c-Kit. Le marqueur CD11b est retrouvé sur les cellules les plus matures incorporées aux vaisseaux. Elles possèdent aussi le récepteur VEGFR-1, l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  et expriment le gène Id3. Elles produisent beaucoup de MMP-9, ce qui altère le microenvironnement des niches pré-métastatiques et entraîne un gradient d'expression de SDF-1, permettant l'attraction des cellules tumorales circulantes et le développement d'une lésion métastatique.

#### *d. Les marqueurs des cellules accessoires*

Tous les auteurs s'accordent sur le fait que les cellules accessoires possèdent :

- des marqueurs de progéniteurs ou de cellules souches hématopoïétiques : CD133, CD34, c-Kit (ou CD117),
- des marqueurs de la lignée myélo-monocytaire : CD45, CD11b dont l'expression augmente avec la maturation cellulaire,
- le récepteur VEGFR-1, généralement situé sur les cellules endothéliales,
- le récepteur de SDF-1, CXCR4.

Elles n'expriment pas les marqueurs endothéliaux (sauf pour *Yang L. et al.* [23]) : VEGFR-2, CD31. Ceci les différencie des progéniteurs des cellules endothéliales circulantes (CEP).

#### 6) Les cellules endothéliales circulantes (CEC)

Chez l'individu sain, moins d'une cellule circulante sur mille est une cellule endothéliale circulante (CEC), néanmoins, ce taux peut être multiplié par 1,5 à 2 chez la femme en période menstruelle ; ces CEC possèdent généralement des marqueurs précoces ou tardifs d'apoptose [30].

La présence de cellules endothéliales circulantes est le témoin d'altérations vasculaires.

Une augmentation du nombre de CEC a été rapportée dans de nombreuses situations, celle-ci est souvent corrélée à la gravité de la maladie [31] :

- pathologies cardiovasculaires mécaniques, ischémiques hypertensives,
- maladies infectieuses : lorsque l'endothélium est la cible des agents pathogènes (rickettsioses, cytomégalovirus) et au cours du choc septique,
- maladies auto-immunes : purpura thrombotique thrombocytopénique, maladie de Behçet, lupus érythémateux disséminé, maladie de Kawasaki et vascularites inflammatoires,
- transplantations,
- tumeurs.

#### *a. L'intérêt des cellules endothéliales circulantes*

Une élévation des CEC a été décrite dans de nombreux cancers : lymphomes, tumeurs mammaires, coliques, gastriques, oesophagiennes, rénales, ovariennes, cervicales, prostatiques... Leur numération redevient normale lorsque le patient est en rémission complète [32].

Il y a trois hypothèses pouvant expliquer la présence de cellules endothéliales circulantes chez les patients atteints de tumeur :

- le détachement des vaisseaux tumoraux lié à un dysfonctionnement de l'endothélium,
- la perte par les vaisseaux systémiques normaux, activés par la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance des cellules tumorales,
- les CEC pourraient aussi être une sous-population de CEP (progéniteurs des cellules endothéliales) originaires de la moelle osseuse ; cette dernière hypothèse n'a pas encore été démontrée à ce jour.

#### *b. Les causes du détachement des cellules endothéliales du mur vasculaire*

Le détachement des CEC de l'endothélium implique de nombreux facteurs, dont :

- un traumatisme mécanique,
- une altération des molécules d'adhésion endothéliales (intégrine  $\alpha v\beta 3$ ),
- un défaut d'adhésion aux protéines d'ancrage de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine ou collagène de type IV),
- l'apoptose cellulaire.

#### *c. Le phénotype des CEC*

Pendant longtemps, l'isolement et l'identification de ces cellules a posé problème. Elle est devenue plus facile avec la découverte de marqueurs spécifiques de l'endothélium comme le CD146 [30, 31, 32, 33].

La cytométrie de flux a permis de mettre en évidence leurs marqueurs. Elles expriment le CD146, le CD34, la VE-cadhérine, le facteur Willebrand (vWF) et le récepteur du VEGF VEGFR-2 [34].

### 7) Les progéniteurs des cellules endothéliales (CEP)

#### *a. Une définition des CEP*

Les CEP (progéniteurs des cellules endothéliales) sont des cellules originaires de la moelle osseuse. On ne sait pas exactement si elles dérivent de cellules progénitrices (hémangioblastes) ou de cellules plus différenciées (comme les monocytes) qui acquièrent un phénotype de cellule "endothelial like" [35]. Pendant de nombreuses années, on a pensé que

ces cellules ne participaient à la formation des vaisseaux sanguins que pendant la vie embryonnaire. Des études récentes ont montré qu'elles participent aussi à la néovascularisation des tissus ischémiques, tumoraux et inflammatoires chez l'adulte [1].

Les CEP passent dans le sang circulant en réponse à leur stimulation par de nombreux facteurs de croissance, entre autres VEGF, G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), FGF (fibroblast growth factor) et SDF-1 (stromal derived growth factor-1) afin de participer au processus de néovascularisation des tissus tumoraux ou ischémiques. Ces cellules vont alors se loger dans les zones hypoxiques (niches angiogéniques), où elles sont incorporées aux nouveaux vaisseaux sanguins [14].

La contribution à la vascularisation tumorale des CEP dépend du type de cancer et de son grade [30]. Lorsqu'elles sont incorporées aux vaisseaux tumoraux, ces cellules acquièrent de nouvelles caractéristiques :

- elles surexpriment et relarguent dans la circulation des chimiokines de type MCP-1, ce qui entraîne la mobilisation d'autres CEP possédant les récepteurs correspondants créant ainsi une véritable boucle d'autoamplification,
- elles peuvent proliférer et se différencier afin d'acquérir les caractéristiques des cellules endothéliales matures [14, 36].

#### *b. Le phénotype des CEP*

Les CEP possèdent des marqueurs exprimés par :

- les cellules endothéliales : VE-cadhérine, VEGFR-2, CD31, CD146, facteur Willebrand, Tie2 [36],
- et les cellules d'origine hématopoïétique : CD133, CD34, c-Kit (ou CD117), Sca-1 (chez la souris).

Caractéristiques	Cellule endothéliale circulante	Progéniteur des cellules endothéliales
Origine	Endothélium mature	Moelle osseuse
Morphologie	Cellule mature (20 à 50 µm de diamètre)	Cellule immature (moins de 20 µm de diamètre)
Potentiel prolifératif	non	oui
Physiopathologie	Traumatisme, maladies	Néovascularisation
Phénotype :		
CD133	-	+
CD45	-	-
CD34	+ faible	+ fort
CD31	+	+
CD146	+	+
CD117	-	+
CD13	+	+
VEGFR-1	+	-
VEGFR-2	+	+
VEGFR-3	+ faible	+ faible

Tableau n° 1 : Les principales différences entre les CEC et les CEP [30, 32, 34]

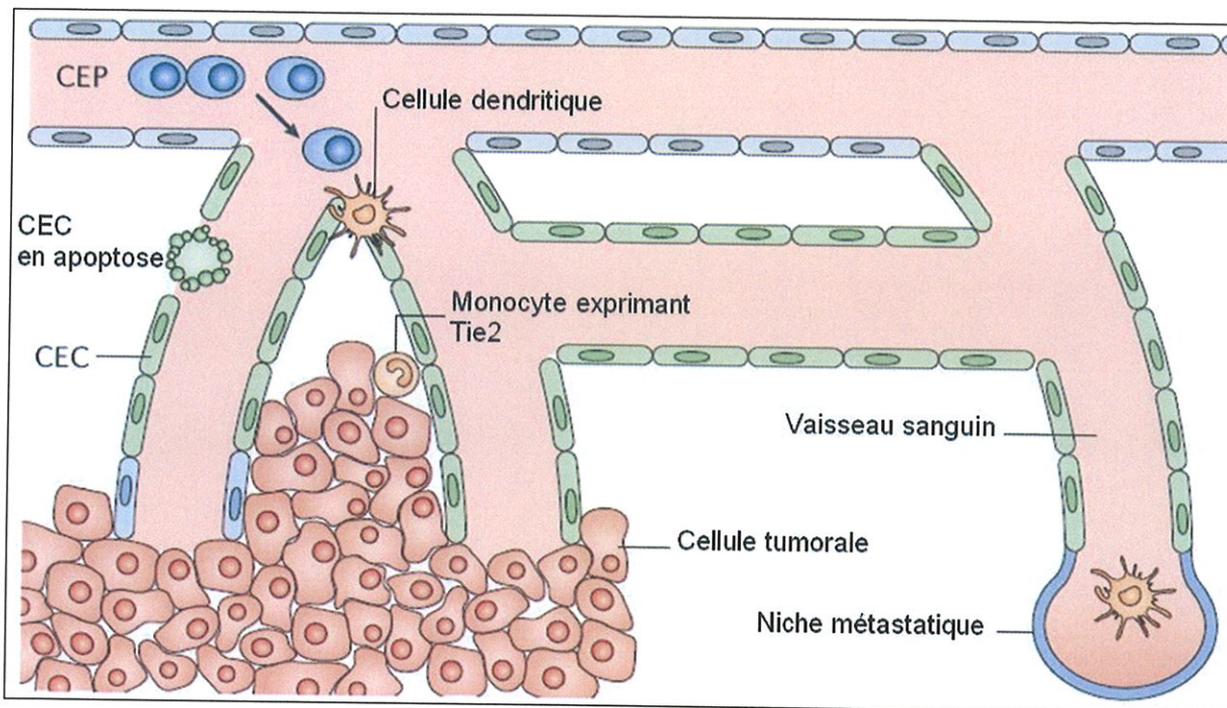


Schéma n° 3 : Le rôle des CEC et des CEP dans les tumeurs [30]

Les CEC, qui proviennent du renouvellement vasculaire, sont augmentés chez les patients souffrant de nombreux types de tumeurs. La fréquence de la présence et le rôle des CEP est variable selon les différents types de tumeurs et les différentes phases de la croissance tumorale. En plus des CEC et des CEP, la vascularisation tumorale et son extension sont modulées par d'autres cellules : les cellules dendritiques, les monocytes exprimant Tie2 qui promeuvent l'angiogenèse de façon paracrine, ou les cellules accessoires VEGFR-1<sup>+</sup> qui peuvent également initier des niches métastatiques.

#### 8) Le phénotype des cellules d'origine myéloïde et endothéliale impliquées dans l'angiogenèse tumorale

Nous avons essayé de mettre en évidence la présence de cellules accessoires et de TEM dans le sang de patients atteints de tumeurs métastasées et de témoins. Ces cellules n'expriment pas de marqueurs spécifiques, mais une combinaison de marqueurs pouvant être retrouvés au sein des différentes populations myéloïdes circulantes. Il est nécessaire de bien connaître les récepteurs qu'elles possèdent afin de les distinguer des autres cellules d'origine myéloïde ou endothéliale impliquées dans l'angiogenèse tumorale.

- *Les cellules accessoires expriment des marqueurs de la lignée myéloïde :*

Des marqueurs présents à des stades précoces de différenciation hématopoïétique :

- CD133 : exprimé par les cellules souches hématopoïétiques (et aussi par les progéniteurs des cellules endothéliales circulantes),
- CD34 : exprimé par les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques,
- CD117 (ou c-Kit) : aussi exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques (dans la moelle osseuse : 70 % des cellules CD34<sup>+</sup> sont CD117<sup>+</sup>) et les mastocytes.

Des marqueurs leucocytaires :

- CD45 : marqueur pan-leucocytaire,
- Sca-1 : 30 % des cellules CD45<sup>+</sup>/Tie2<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> sont Sca-1<sup>+</sup>. Ce marqueur est intéressant chez la souris, car c'est un marqueur pan leucocytaire identique au CD45 chez l'homme. Il n'est pas encore décrit sur les cellules accessoires humaines.
- Gr-1 : marqueur de la lignée granuleuse,
- CD11b (ou intégrine  $\alpha$ M $\beta$ 2) : marqueur de la lignée myélomonocytaire dont l'expression augmente avec le degré de maturation des cellules accessoires.

- *Les cellules accessoires possèdent les récepteurs :*

- VEGFR-1 : aussi exprimé faiblement par les cellules endothéliales circulantes et certaines sous populations myéloïdes matures,
- CXCR4 (encore désigné par CD184): présent sur de nombreuses cellules lymphocytes B et T normaux et sur les cellules tumorales (en particulier mélanome, cancer du colon). Récepteur de SDF-1 : permettant l'attraction et la rétention des cellules accessoires et des cellules tumorales dans les niches métastatiques,
- intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (encore appelée VLA-4),
- Tie2 (récepteur de l'angiopoïétine 2).

- *Les cellules accessoires expriment :*

- Id3 (inhibitor of differentiation 3) : qui pourrait faciliter la migration des cellules VEGFR-1<sup>+</sup> vers la niche pré métastatique, régulerait l'expression d'intégrines spécifiques et serait responsable d'interactions entre les cellules du stroma et les cellules accessoires.
- MMP-9 (matrix metalloproteinase 9).

• *En revanche, ces cellules n'expriment pas :*

- VEGFR-2 : exprimé par les progéniteurs de cellules endothéliales circulants et par les cellules endothéliales circulantes.
- CD31 (ou PECAM 1 : platelet-endothelial cell adhesion molecule) : marqueur des cellules endothéliales. Cette intégrine est un récepteur d'adhérence au collagène impliqué dans la liaison et l'agglutination plaquettaire à l'endothélium sous-jacent.

	Progéniteurs des cellules endothéliales	Cellules endothéliales circulantes	Cellules accessoires	TEM	TAM
CD146	+	+	-	-	-
CD133	+	-	+	- ?	- ?
CD31	+	+	-	- ou + faible	-
CD34	+ fort	+ faible	+	-	-
CD45	- ou (+ faible)	-	+	+	+
CD11b	-	-	+, ↗ avec la maturation cellulaire	+	+
CD14	- ?	- ?	- ? (+ pour <i>Jin H. et al</i> )	+ faible	+ faible
CD16	- ?	- ?	- ?	+ fort	+ fort
c-Kit	+	-	+	-	- ?
CXCR4	?	?	+	?	?
intégrine $\alpha 4\beta 1$	?	?	+	+	+
Tie2	+	+	+	+	-
Sca-1 (chez la souris)	+	?	+	+	-
Id3	?	?	+	?	?
Gr-1	-	-	+	-	-
CCR2	-	-	-	-	+
VEGFR-1	-	+	+	?	?
VEGFR-2	+	+	- (sauf pour <i>Yang L. et al.</i> : + à 4,5 %)	+ dans 1 à 2 % des cas	-

Tableau n° 2 : Une comparaison de l'expression des différents marqueurs des cellules accessoires, des CEP et des CEC, des TEM et des TAM

### III. Les mécanismes permettant le recrutement des cellules d'origine médullaire par la tumeur

#### 1) Quelques généralités

Lorsque la tumeur grossit, des zones d'hypoxie se créent à l'intérieur de celle-ci. Elles entraînent l'augmentation de l'expression de protéines de réponse à l'hypoxie, qui attirent les cellules myéloïdes dans les tissus.

SDF-1, une chimiokine, joue un rôle clé dans le recrutement des progéniteurs cellulaires.

D'autres molécules chimioattractantes attirent plus particulièrement les monocytes. Les principales sont :

- MCP-1 (CCL2) et RANTES (CCL5) qui augmentent l'infiltration des TAM dans les tumeurs primaires mammaires, ovariennes, les mélanomes et les glioblastomes. Elles stimulent aussi la sécrétion de métalloprotéinases par les macrophages. En particulier, CCL2 attire puissamment les monocytes ayant le récepteur CCR2 [19].
- L'interleukine-8 (IL-8), aussi considérée comme un facteur pro-angiogénique et de croissance autocrine pour de nombreux types cellulaires tumoraux humains. Elle stimule l'adhésion des monocytes qui possèdent son récepteur (CXCR1 ou CXCR2) à l'endothélium vasculaire.

Plusieurs autres cytokines et facteurs de croissance sont aussi impliqués dans le recrutement tumoral des monocytes [14] :

- le CSF-1 (colony stimulating factor-1) , qui associé à l'EGF (epidermal growth factor) dans les tumeurs mammaires, augmente leur infiltration par des cellules myéloïdes,
- le VEGF,
- le PlGF (placental growth factor),
- la  $\beta$ -défensine, qui permet le recrutement des précurseurs des cellules dendritiques, par l'intermédiaire de son récepteur CCR6.

Une grande variété de stimuli inflammatoires participe donc au recrutement des monocytes dans les tissus tumoraux. Une fois à l'intérieur de la tumeur, la plupart des monocytes se différencie en macrophages (l'IL-10 stimule la transformation en macrophages M2).

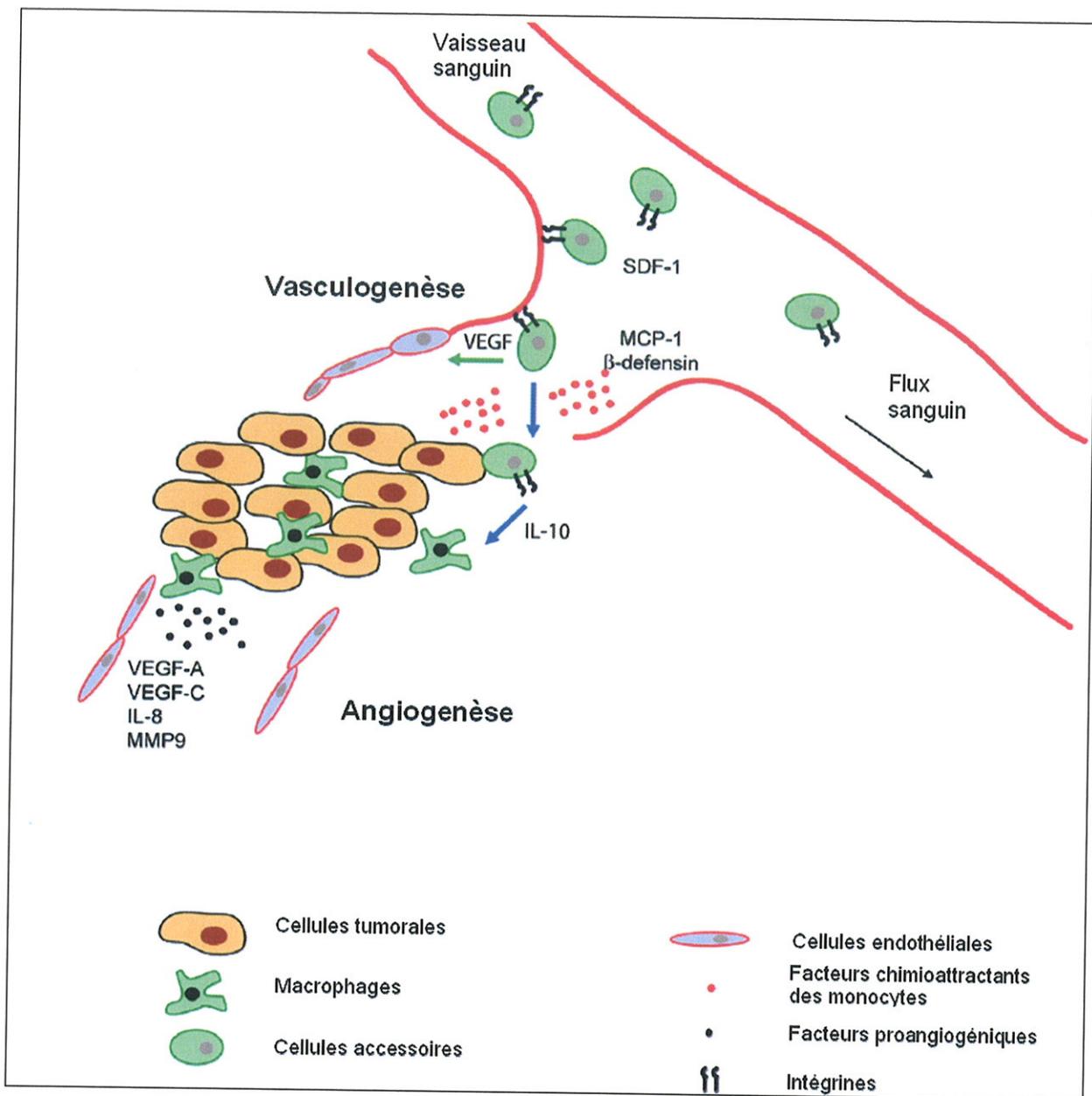


Schéma n° 4 : La contribution des cellules myéloïdes à l'angiogenèse tumorale [14]

Les cellules myéloïdes sont mobilisées par de nombreux facteurs (SDF-1, MCP-1, β-défensine), adhèrent à l'endothélium grâce à l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  ou aux  $\beta 2$  intégrines. Puis, elles se positionnent autour des nouveaux vaisseaux et sécrètent des facteurs proangiogéniques (VEGF-A, VEGF-C, IL-8, MMP-9). L'interleukine IL-10 induit la différenciation des monocytes en macrophages M2.

## 2) Les rôles de l'angiopoïétine-2 et de l'hypoxie dans le recrutement des TEM

### a. *Quelques généralités sur les angiopoïétines*

Les angiopoïétines sont importantes pour la formation et le fonctionnement des vaisseaux sanguins. Il en existe quatre types. Les plus étudiées sont les angiopoïétines 1 et 2, qui régulent l'angiogenèse en se liant spécifiquement au récepteur à tyrosine kinase Tie2/Tek des cellules endothéliales. Elles induisent la phosphorylation de ce dernier en se fixant à sa surface.

- L'angiopoïétine-1 (Ang-1) agit comme un agoniste de Tie2 pour promouvoir, maintenir et stabiliser les vaisseaux sanguins matures en encourageant les interactions entre les cellules endothéliales, les péricytes, la membrane basale et la matrice extracellulaire. Elle est produite par les cellules murales.
- L'angiopoïétine-2 (Ang-2) est la forme d'angiopoïétine qui prédomine dans les tissus inflammatoires et tumoraux. Elle agit comme un antagoniste d'Ang-1, entraînant la déstabilisation des vaisseaux sanguins existants. Elle coopère avec le VEGF pour induire la formation et la croissance de nouveaux vaisseaux. *In vitro*, elle stimulerait la migration des cellules endothéliales et la formation de tubules, et pourrait agir aussi comme un agoniste de Tie2 [17].

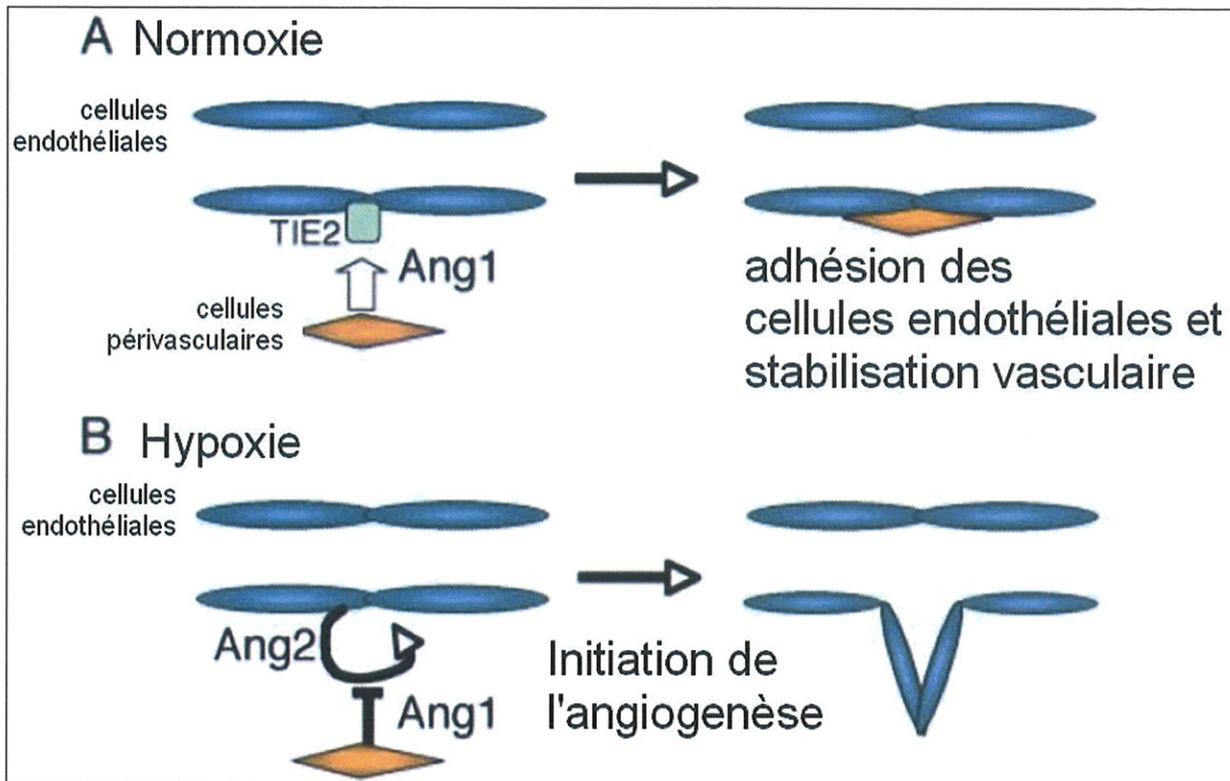


Schéma n° 5 : Tie2 et ses deux ligands [27]

A : En situation de normoxie, Ang-1 produite par les cellules murales stimule Tie2, ce qui induit l'adhésion des cellules endothéliales et la stabilisation vasculaire.

B : En cas d'hypoxie, Ang-2 inhibe la liaison d'Ang-1, ce qui entraîne la dissociation des cellules endothéliales et le début de l'angiogenèse.

#### b. Le rôle de l'angiopoïétine-2 pour le recrutement des TEM

L'angiopoïétine-2 induit le chimiotactisme des monocytes et des macrophages : deux nouvelles études ont démontré que l'angiopoïétine-2 sécrétée par les vaisseaux sanguins tumoraux stimule la migration des monocytes Tie2<sup>+</sup> *in vitro* [15, 17]. Elle recrute les TEM en les attirant à travers la lumière vasculaire. Cette attraction est reproductible, mais moins prononcée que lorsqu'on réalise des essais d'attraction des monocytes avec CCL2 (la plus puissante des molécules chimioattractante des monocytes) [17].

L'autre rôle de l'angiopoïétine-2 est de réguler la sécrétion de cytokines par les TEM. Elle inhibe en particulier leur sécrétion de TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ). De fortes concentrations de TNF $\alpha$  entraîneraient l'apoptose des cellules endothéliales et tumorales, alors que l'inhibition de sa sécrétion à proximité des vaisseaux tumoraux Ang2<sup>+</sup> augmenterait la survie des cellules tumorales et endothéliales, voire faciliterait la formation des métastases et l'angiogenèse tumorale.

### *c. Le rôle de l'hypoxie pour le recrutement des TEM*

*Lewis et al.* [16] ont montré que les TEM isolés à l'intérieur des tissus tumoraux ont un niveau d'expression de Tie2 plus élevé que les TEM circulants.

En situation d'hypoxie :

- l'expression de l'angiopoïétine-2 serait stimulée par les cellules endothéliales et tumorales,
- l'expression de Tie2 par les TEM serait amplifiée, ce qui les rendrait ainsi plus sensibles à l'action de l'angiopoïétine-2 dans les zones insuffisamment vascularisées [17].

### *d. L'association de ces deux facteurs*

L'association de l'angiopoïétine-2 et de l'hypoxie inhibe la sécrétion par les TEM [17]:

- de TNF $\alpha$  : encore plus qu'avec l'angiopoïétine-2 seule ;
- de l'interleukine-12 (cytokine antiangiogénique et immunostimulante) : ce qui révèle un mécanisme important par lequel le microenvironnement tumoral inhibe les activités anti-angiogéniques des macrophages associés aux tumeurs ;
- de MCP-1.

En revanche, l'hypoxie et l'angiopoïétine-2 n'agissent pas sur la sécrétion d'autres cytokines, en particulier des interleukines 4, 6, 10 ou 8.

## 3) Le VEGF (vascular endothelial growth factor)

### *a. Une définition*

Le VEGF est sécrété par les cellules accessoires. Il entraîne leur recrutement grâce à son interaction avec leur récepteur VEGFR-1. De même, le VEGF recrute les CEP par l'intermédiaire de leur récepteur VEGFR-2.

Le VEGF est un régulateur clé de l'angiogenèse physiologique pendant la vie embryonnaire, la croissance, et dans les fonctions reproductives. Il est aussi impliqué dans l'angiogenèse pathologique tumorale et la néovascularisation intra-oculaire [37].

Il constitue une famille incluant cinq isoformes différentes (A, B, C, D, E) et le PlGF d'un poids moléculaire de 35 à 44 kDa ; chacune lie spécifiquement un récepteur cellulaire (VEGFR-1,-2,-3 et neuropilines).

Le VEGF natif (ou VEGF-A) est une glycoprotéine homodimérique de liaison à l'héparine de 45 kDa. Il est sécrété, mais :

- une fraction importante reste liée à la surface cellulaire et à la matrice extracellulaire,

- les formes liées à la matrice extracellulaire peuvent devenir diffusibles grâce à un clivage par la plasmine à son extrémité C-terminale qui génère un fragment bioactif.

Le VEGF-A régule fortement la croissance vasculaire ; les VEGF-C et D régulent la lymphangiogenèse.

Les principaux rôles du VEGF-A sont :

- la promotion de la croissance des cellules endothéliales,
- la prévention de l'apoptose de ces cellules, en induisant l'expression des protéines Bcl-2 et A1. Les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux sont très dépendantes du VEGF jusqu'à l'arrivée des péricytes ;
- la promotion du chimiotactisme des monocytes et la formation de colonies par des progéniteurs des granulocytes et des macrophages,
- la régulation de la perméabilité vasculaire,
- l'induction d'une vasodilatation *in vitro* grâce à la production de NO (monoxyde d'azote) par la cellule.

L'augmentation de l'expression de l'ARNm du VEGF est induite :

- par l'hypoxie : elle entraîne l'activation du facteur HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ), qui amplifie à son tour l'activation du VEGF,
- par de nombreux facteurs de croissance, cytokines inflammatoires et oncogènes (mutations de Ras).

#### *b. Les récepteurs du VEGF*

Le VEGF possède trois récepteurs, qui sont présents sur les cellules endothéliales et sur les cellules dérivées de la moelle osseuse :

- VEGFR-1 et R-2 de type tyrosine kinase, avec sept domaines extracellulaires de type "immunoglobuline like" et une région transmembranaire, qui lient le VEGF-A,
- VEGFR-3 qui lie plutôt les VEGF-C et D.

Le VEGF interagit aussi avec une famille de corécepteurs, les neuropilines.

L'interaction du VEGF avec les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 est très importante dans l'angiogenèse tumorale. En effet, si on traite des souris atteintes de tumeur avec des anticorps dirigés contre :

- VEGFR-1 : on observe une diminution du recrutement des cellules périavasculaires
- VEGFR-2 : il y a une diminution de la densité vasculaire, hémorragies diffuses.

- VEGFR-1 et VEGFR-2 : on observe une nécrose tumorale extensive, par blocage des phases précoces de la croissance tumorale (absence de recrutement de précurseurs médullaires) [38].

i. *VEGFR-1 ou Flt-1*

C'est le premier récepteur, identifié il y a dix ans [39]. Il lie non seulement les VEGF-A et B mais aussi le PlGF. Il est capable d'inhiber l'action du VEGF au niveau de l'endothélium en l'empêchant de se fixer à VEGFR-2.

VEGFR-1 permet le recrutement des progéniteurs endothéliaux. Son activation par le PlGF facilite aussi le recrutement des cellules souches hématopoïétiques [40].

Dans les tumeurs, il est plus fréquemment exprimé que VEGFR-2.

ii. *VEGFR-2 ou Flk-1*

Ce récepteur joue un rôle fondamental dans l'angiogenèse. Il entraîne la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales par stimulation de leur activité mitogène [41].

iii. *Neuropilines 1 et 2 (NP-1 et NP-2)*

Les neuropilines 1 et 2 ont été d'abord décrites comme des récepteurs des sémaphorines (molécules impliquées dans le guidage et la régénération axonale) au niveau du système nerveux central [42].

La neuropiline 1 est exprimée sur de nombreuses cellules hématopoïétiques (lymphocytes B et T, cellules myéloïdes, érythrocytaires et cellules souches), sur les cellules endothéliales et les neurones [34]. Ce récepteur ne possède pas de domaine tyrosine kinase intra-cellulaire.

La neuropiline 1 est un corécepteur qui augmente l'activité du VEGF-A en activant VEGFR-2. En effet, le récepteur NP-1 des cellules hématopoïétiques lie le VEGF sérique et stimule le récepteur VEGFR-2 des cellules endothéliales, entraînant ainsi une vive prolifération [27, 37, 42, 43].

La neuropiline 2 agit aussi comme co-récepteur des VEGF-C et -D. Elle est exprimée dans les capillaires lymphatiques avec VEGFR-3 [44].

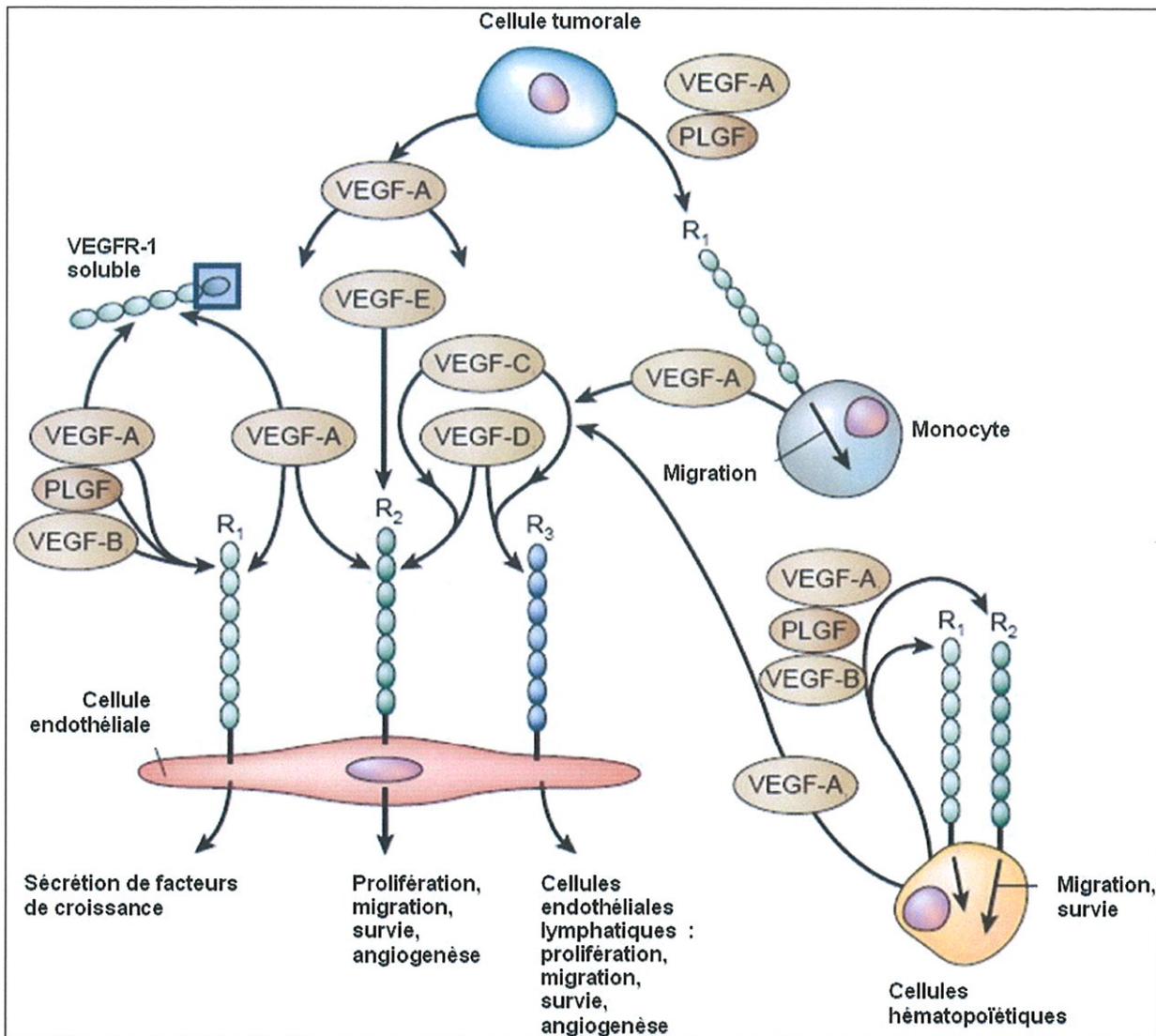


Schéma n° 6 : Le rôle des récepteurs du VEGF dans différents types cellulaires [37]

VEGFR-1 et VEGFR-2 sont exprimés à la surface de la plupart des cellules endothéliales sanguines, alors que VEGFR-3 n'est exprimé que sur les cellules endothéliales lymphatiques. Le VEGF-A lie VEGFR-1 et VEGFR-2, alors que le PLGF et le VEGF-A interagissent uniquement avec VEGFR-1. Le VEGF-E est un agoniste sélectif de VEGFR-2. Les VEGF-C et D se lient avec VEGFR-2 et VEGFR-3.

### c. Les fonctions du VEGF dans la néovascularisation

La néovascularisation chez l'adulte est habituellement initiée par un stress environnemental (hypoxie) ou par des changements génétiques au sein de la tumeur. Ces deux facteurs sont responsables d'une augmentation de l'expression du VEGF.

L'augmentation de l'expression du VEGF dans un organe donné [26]:

- permet le recrutement des cellules accessoires possédant le récepteur VEGFR-1 et des progéniteurs des cellules endothéliales possédant le récepteur VEGFR-2 de la moelle osseuse vers la circulation sanguine périphérique,
- induit dans cet organe, une augmentation de l'expression périvasculaire de la chimiokine SDF-1, qui piège les cellules accessoires et les positionne correctement autour des vaisseaux sanguins naissant dans les tissus ischémiques. Ces cellules proangiogéniques entraînent la prolifération des cellules endothéliales activées de façon paracrine ; elles ne sont pas intégrées à l'endothélium. Dans les phases précoces de la croissance tumorale, la plupart des vaisseaux contiennent des cellules issues de la moelle osseuse.

Alors que le VEGF et ses récepteurs (R1 et R2) sont présents dans les tissus normaux, on ne détecte l'association à ses récepteurs que dans les tissus angiogéniques. La biodisponibilité du VEGF est donc limitée dans les tissus sains [41].

#### 4) L'axe SDF-1 / CXCR4

Nous avons vu que SDF-1 est un facteur qui permet la rétention des cellules accessoires possédant le récepteur CXCR4. Cette cytokine est habituellement peu exprimée dans les tissus quiescents.

SDF-1 fait partie de la famille des chimiokines. Ce sont de petites protéines qui peuvent être divisées en deux sous-familles en fonction de la localisation des résidus cystéine par rapport aux acides aminés terminaux [19, 45]. Il existe plus de 40 chimiokines et 18 récepteurs qui sont présents sur de nombreux types cellulaires. Initialement, ces récepteurs ont été identifiés sur les leucocytes, où ils servent à les piéger sur les sites inflammatoires [45]. Les récepteurs des chimiokines possèdent 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G [19, 45].

La sécrétion de SDF-1 par les cellules stromales de la moelle osseuse est la principale source de SDF-1 chez l'adulte. Les cellules stromales créent des niches vasculaires dans lesquelles les cellules souches et les progéniteurs sont retenues pour se différencier.

L'expression de SDF-1 par les cellules endothéliales est induite au niveau des zones inflammatoires, ischémiques ou tumorales :

- par une augmentation de l'expression du VEGF en réponse à l'hypoxie [26],
- et par l'hypoxie elle-même, par l'intermédiaire de l'augmentation de l'expression du facteur HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  augmente aussi l'expression et les fonctions de CXCR4 sur les cellules normales et malignes [45].

L'axe SDF-1/CXCR4 joue un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale. En effet, lorsqu'on inhibe SDF-1, on bloque complètement l'angiogenèse [26].

À l'intérieur de la tumeur, SDF-1 est produite par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses périvasculaires [26]. *In vitro*, le VEGF induit directement la sécrétion de SDF-1 par les fibroblastes des tissus tumoraux, mais pas celle des cellules musculaires lisses [38].

Alors que la plupart des chimiokines sont capables de se lier à plusieurs récepteurs, et que réciproquement leurs récepteurs peuvent se lier à plusieurs chimiokines, SDF-1 a un seul récepteur spécifique, CXCR4, qui ne lie que cette chimiokine [46].

Le récepteur CXCR4 est présent à la surface de nombreuses cellules hématopoïétiques. Beaucoup de cellules tumorales sont CXCR4<sup>+</sup>, ce qui expliquerait leur recrutement sur le lieu des métastases.

Lorsqu'on bloque CXCR4 avec un inhibiteur spécifique (AMD3100) et donc SDF-1, il se produit une diminution du nombre de cellules accessoires recrutées dans le tissu et de la prolifération endothéliale ; ce pourrait être une cible intéressante pour de futurs traitements anti-angiogéniques [26].

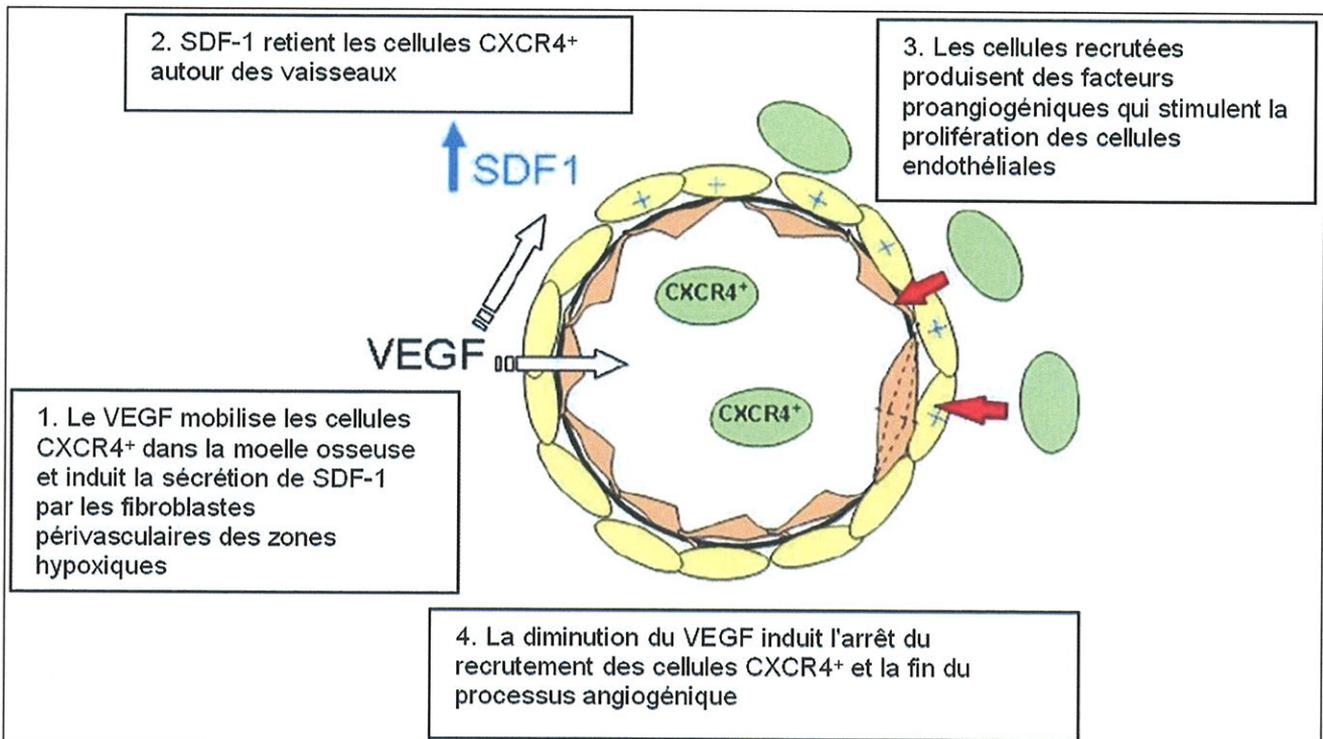


Schéma n° 7 : Le recrutement par le VEGF et l'action paracrine des cellules accessoires [26]

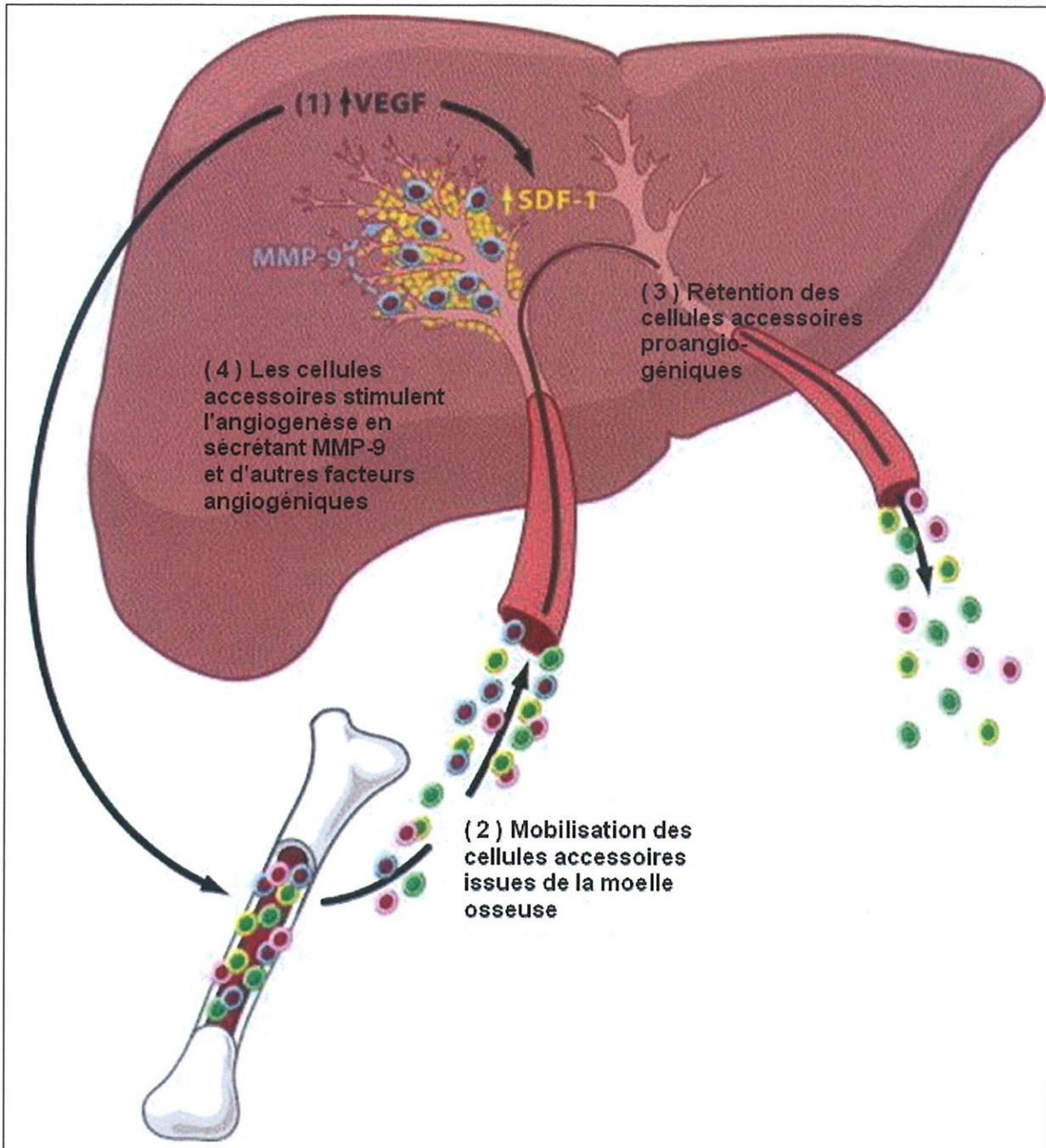


Schéma n° 8 : La rétention des cellules myéloïdes par SDF-1 induit l'angiogenèse [5]

(1-2) : En réponse à une surexpression du VEGF, les cellules accessoires sont recrutées de la moelle osseuse vers la circulation sanguine.

(3) : La surexpression de VEGF induit aussi la sécrétion de SDF-1 par les cellules périvasculaires. Les cellules accessoires, qui expriment CXCR4 sont alors piégées et correctement positionnées autour des vaisseaux.

(4) : Les cellules accessoires vont stimuler la croissance des cellules endothéliales en sécrétant MMP-9 et d'autres facteurs angiogéniques.

## 5) Le rôle des intégrines dans le recrutement des cellules accessoires

### a. *Quelques généralités*

Les cellules myéloïdes expriment un grand nombre d'intégrines ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 3$ ,  $\alpha \nu\beta 5$ ,  $\alpha M\beta 2$  ou CD11b, et  $\alpha X\beta 2$  ou CD11c), qui permettent le recrutement de ces cellules vers les zones néovascularisées [18].

Les monocytes expriment les intégrines  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 3$  et  $\alpha \nu\beta 5$  :

- $\alpha \nu\beta 3$  et  $\alpha \nu\beta 5$  permettent l'adhésion à la vitronectine,
- $\alpha 5\beta 1$ , puis  $\alpha \nu\beta 3$  sont responsables de l'adhésion à la fibronectine plasmatique [18].

### b. *L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ou VLA-4 (very late antigen-1)*

Pendant le développement embryonnaire, l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  est responsable de la fusion du chorion avec l'allantoïde et de l'endocarde avec le myocarde. Elle régule aussi la circulation des lymphocytes T, des cellules NK, et la sortie de la moelle osseuse des cellules hématopoïétiques.

L'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  est un récepteur :

- des VCAM (vascular cell adhesion molecule) : molécule ayant 6 ou 7 domaines "immunoglobuline", exprimée sur les vaisseaux sanguins après stimulation des cellules endothéliales par des cytokines. Son interaction avec l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  *in vivo* entraîne une forte adhésion cellulaire.
- et de la fibronectine (domaine CS-1).

L'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  est indispensable :

- pour promouvoir le transit des monocytes et des CEP vers les zones nouvellement vascularisées,
- pour la participation de ces cellules à la croissance tumorale, à l'angiogenèse et à la lymphangiogenèse. Dans les carcinomes pulmonaires de Lewis, l'inhibition de cette molécule entraîne une diminution de 25 % de la croissance tumorale et de 25 % de l'angiogenèse ;
- pour l'adhésion des cellules myéloïdes à l'endothélium vasculaire et aux VCAM. En effet, les anticorps dirigés contre  $\alpha 4\beta 1$  inhibent l'attachement des monocytes à l'endothélium activé, ce qui n'est pas le cas des anticorps dirigés contre les autres intégrines.

D'autres intégrines, en particulier les  $\beta 2$  intégrines favorisent la migration des précurseurs hématopoïétiques vers les zones d'ischémie et l'adhésion des CEP à l'endothélium.

Ainsi, l'intégrine  $\alpha M\beta 2$  ou CD11b promeut le transit des cellules myéloïdes à l'intérieur des tissus inflammatoires [18].

## 6) MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) et soluble Kit ligand

### *a. MMP-9*

Les cellules accessoires expriment fortement MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), qui n'est pas exprimée par les cellules tumorales [5, 23, 26]. Son blocage par un inhibiteur spécifique (GM6001) empêche fortement l'angiogenèse induite par ces cellules [26]. L'expression de MMP-9 s'accroît avec la liaison de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  des cellules accessoires à la fibronectine [25].

MMP-9 fait partie de la famille des métalloprotéinases. Ce sont des protéines qui dégradent la matrice extracellulaire et qui jouent un grand rôle dans le remodelage des tissus lors de situations pathologiques : inflammation, cicatrisation, invasion et dissémination métastatique tumorale [47]. Récemment, il a été démontré que plusieurs MMP régulent l'angiogenèse et la progression tumorale, ce sont les MMP-9 (gélatinase B), MMP-2 (gélatinase A), MMP-3 (stromelysine-1) et MMP-7 (matrilysine) [47]. Nous nous intéresserons plus particulièrement à MMP-9.

MMP-9 induit la libération de :

- soluble Kit Ligand [48],
- VEGF-A dans la matrice extra cellulaire, ce qui le rend plus accessible à son récepteur VEGFR-1. La liaison du VEGF à son récepteur entraîne la mobilisation des CEP, des cellules souches hématopoïétiques [25] et des cellules accessoires [25, 26, 38].

Enfin, MMP-9 permet le recrutement des péricytes [23].

### *b. Soluble Kit ligand*

Le Kit ligand (KitL) se lie au récepteur c-Kit des cellules souches hématopoïétiques, endothéliales et des cellules accessoires, ce qui module leur survie, leur adhésion et leur mobilité. En effet, la liaison de sKitL à son récepteur sur les cellules souches médullaires induit leur entrée en cycle cellulaire et leur mobilisation, c'est une étape très importante pour la régénération médullaire post-aplasie [40].

Le KitL possède une forme membranaire (mKitL) de 248 acides aminés, qui peut être clivée en une forme soluble (sKitL) active de 164 acides aminés. Depuis peu, on a mis en évidence

que le domaine extracellulaire de mKitL possède deux séquences pouvant être hydrolysées par MMP-9 [49]. La seule enzyme connue auparavant capable de cliver mKitL était une chymase mastocytaire.

### 7) Les gènes Id

La régulation des gènes Id est essentielle à la mobilisation des progéniteurs qui permettent la croissance des tumeurs primaires. Lorsque l'on crée un modèle de souris adultes déficientes en gènes Id, elles sont incapables d'assurer la néovascularisation d'une tumeur [38].

De plus, les gènes Id régulent l'expression d'intégrines spécifiques, qui permettent :

- des interactions entre les cellules accessoires et le stroma,
- leur mobilité,
- et leur recrutement.

Chez l'embryon, des mutations au niveau de l'un des gènes Id entraîne des malformations vasculaires et des hémorragies.

Les gènes Id :

- codent pour des protéines appartenant à une classe de facteurs de transcription nucléaires appelées "protéines hélice-boucle-hélice",
- sont des inhibiteurs de différenciation [30].

Les gènes Id ne sont pas exprimés dans la moelle osseuse des souris sauvages, c'est l'augmentation de la concentration plasmatique en VEGF-A qui restaure leur expression. L'angiogenèse induite par le VEGF est sévèrement bloquée chez les souris mutantes déficientes en gènes Id. Cet effet est dû à une insuffisance de recrutement des CEP, plutôt qu'à une diminution de leur nombre dans la moelle osseuse. Un déficit en recrutement de précurseurs myéloïdes, à la phase précoce de l'angiogenèse, est à l'origine de l'absence de croissance tumorale chez ces souris [38].

L'expression de deux gènes Id, Id1 et Id3, induite par le VEGF, est essentielle à la mobilisation et au recrutement des CEP VEGFR-2<sup>+</sup> et des cellules hématopoïétiques VEGFR-1<sup>+</sup> [38]. Id3 est exprimé à l'intérieur de la niche pré-métastatique. Il faciliterait la mobilisation des cellules myéloïdes possédant le récepteur VEGFR-1 [25].

## 8) La niche pré-métastatique

Nous avons vu que les cellules accessoires contribuent à la transformation maligne, à la vascularisation tumorale et à la migration des cellules néoplasiques. Pendant le switch angiogénique, ces cellules se multiplient et passent dans la circulation sanguine avec les CEP afin de contribuer à la vascularisation et la croissance de la tumeur primaire.

Les cellules accessoires VEGFR-1<sup>+</sup> jouent aussi un très grand rôle dans la formation de la niche pré-métastatique, puisqu'elles y précèdent les cellules tumorales CXCR4<sup>+</sup> et les cellules endothéliales VEGFR-2<sup>+</sup>. C'est la tumeur primaire qui induit la migration des cellules accessoires vers les organes cibles.

C'est un milieu très riche en fibronectine. Une augmentation de la fibronectine précède l'arrivée des cellules accessoires dans le tissu pré-métastatique. En effet, l'adhésion des cellules accessoires dans la niche pré-métastatique nécessite tout d'abord l'interaction de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  avec son ligand, la fibronectine [25].

L'expression de MMP-9 est également augmentée à l'intérieur de la niche pré-métastatique : la liaison de la fibronectine à l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  entraîne aussi une forte augmentation de l'expression de MMP-9 dans ces cellules. Cette métalloprotéinase altère le micro-environnement local permettant la libération de VEGF-A et de soluble Kit ligand ; cela permet d'attirer d'autres cellules accessoires possédant les récepteurs VEGFR-1 et c-Kit à l'intérieur de la niche [25].

Le gène Id3 est surexprimé à ce niveau : cela facilite aussi le recrutement des cellules accessoires.

Enfin, l'axe SDF-1/CXCR4 joue aussi un rôle très important dans l'attraction et la rétention des cellules tumorales à l'intérieur de la niche pré-métastatique. En effet, SDF-1 est très fortement exprimé à l'intérieur des colonies pré-métastatiques contenant des BMDC, des fibroblastes, et de la fibronectine. De nombreux types de cellules tumorales possédant le récepteur CXCR4 sont ainsi retenues par SDF-1, ce qui aboutit à la formation d'une lésion métastatique complète [25].

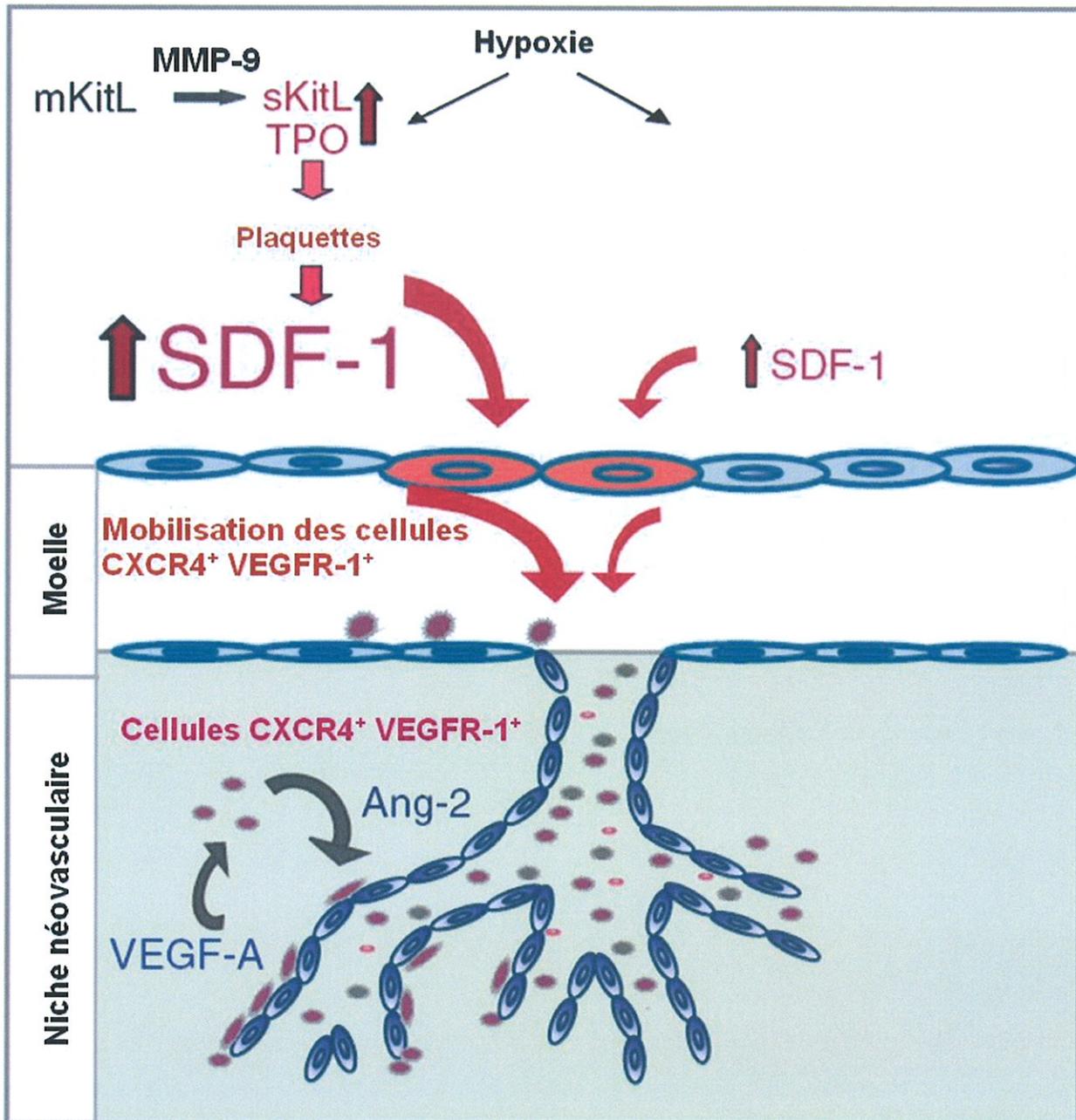


Schéma n° 9 : Un récapitulatif [5]

L'hypoxie entraîne :

- une augmentation de la sécrétion de SDF-1 par les zones périvasculaires des zones à vasculariser,
- une augmentation de la sécrétion de sKitL et de thrombopoïétine (TPO) qui induisent la libération de SDF-1 par les plaquettes.

L'augmentation de la concentration en SDF-1 attire les cellules médullaires CXCR4<sup>+</sup> VEGFR-1<sup>+</sup> dans les zones hypoxiques. Ces cellules sécrètent de nombreux facteurs stimulant l'angiogenèse et permettant le recrutement de nouvelles cellules proangiogéniques (VEGF-A, Ang-2).

## **PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODE**

Les cellules accessoires et les TEM sont des régulateurs clés de l'angiogenèse tumorale, présents physiologiquement dans la circulation sanguine. Leur nombre est augmenté chez les patients souffrant de tumeurs. Il serait intéressant de les mettre en évidence afin de pouvoir mieux les caractériser.

L'objectif de notre travail est la mise au point d'une technique permettant :

- d'isoler les cellules accessoires et les TEM dans le sang circulant de patients et de témoins,
- de mettre en évidence une différence d'expression de quatre gènes d'intérêt entre le groupe de malades et le groupe de témoins.

### **I. Les prérequis**

#### 1) Les patients

La mise au point de la technique est effectuée chez 14 patients souffrant d'une tumeur solide métastasée. Ils sont recrutés de façon prospective lors de leur rendez-vous en médecine nucléaire pour le passage d'une tomographie à émission de positons (TEP). Nous avons exclu les patients atteints de pathologies hématologiques variées.

Le prélèvement sanguin est effectué après la mise en place du cathéter permettant l'injection radioactive nécessaire à la réalisation du TEP.

Patient	Sexe	Type de tumeur	Localisations métastatiques connues avant la TEP
N° 1 : DEB	H	pulmonaire PT2 N2 M1	pulmonaire controlatérale
N° 2 : GRA	H	broncho-pulmonaire	surrénale gauche et atteinte ganglionnaire de la loge de Baretty
N° 3 : LAB	F	mammaire	pulmonaire
N° 4 : FIO	F	col de l'utérus	ganglionnaire locorégionale
N° 5 : GIL	H	colique	hépatique
N° 6 : BAR	H	pulmonaire	ganglionnaire, loge de Baretty
N° 7 : LEG	H	colique	hépatique
N° 8 : BRA	H	pulmonaire	osseuse
N° 9 : OZD	H	œsophagienne	ganglionnaire sus-claviculaire
N° 10 : CHA	F	pulmonaire (bilan pré-thérapeutique)	aucune
N° 11 : BOU	F	colique	pulmonaires multiples
N° 12 : DEL	F	oesophagienne	ganglionnaire
N° 13 : EVE	H	ovarienne	carcinose péritonéale
N° 14 : BAS	H	mélanome	ganglionnaires multiples

Tableau n° 3 : Les caractéristiques des patients

## 2) Les témoins

Par ailleurs, nous avons testé une population témoin constituée de douze individus sains, choisis parmi les internes en biologie médicale de Limoges. Onze témoins ont entre 24 et 31 ans, un seul témoin a 42 ans.

## 3) Le prélèvement

Le prélèvement était effectué sur tube EDTA de 5 mL. Nous avons prélevé un ou deux tubes selon le nombre de combinaisons d'anticorps à tester afin d'isoler les TEM et les cellules accessoires. Les prélèvements doivent être traités dans les quatre heures suivant la prise de sang. En effet, si cet horaire est dépassé, les leucocytes peuvent souffrir et exprimer des marqueurs inhabituels.

## II. La technique d'isolement des cellules accessoires et des TEM

Notre technique comporte quatre étapes :

- l'isolement suivi de la lyse des cellules accessoires et des TEM à partir du sang circulant,
- l'extraction des ARN messagers (ARNm) de ce lysat cellulaire,
- une reverse transcription (RT) afin d'obtenir les ADN complémentaires (ADNc) des ARNm extraits,
- et enfin une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) multiplexe permettant l'amplification simultanée de séquences spécifiques de quatre gènes d'intérêt et d'un gène de ménage.

### 1) Les billes magnétiques

L'isolement des cellules accessoires et des TEM est effectué à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre des récepteurs de surface que nous avons couplé à des billes magnétiques (Dynabeads®Pan Mouse IgG, Dynal®).

Ces billes magnétiques sont des billes de polystyrène de 4,5 µm de diamètre. Elles sont fournies liées à un anticorps monoclonal humain anti-immunoglobulineG (IgG) de souris.

Cet anticorps :

- est spécifique du fragment Fc des IgG, il reconnaît toutes les sous-classes d'IgG de souris,
- ne donne pas de réactions croisées avec les IgG humaines, de rat, ou de lapin.

Les anticorps primaires que nous utilisons pour isoler les cellules accessoires et les TEM se couplent aux billes magnétiques par liaison de leur fragment Fc à l'anticorps déjà lié à la bille. En présence du prélèvement sanguin à tester, les billes magnétiques couplées à l'anticorps primaire que nous avons choisi se fixent aux cellules cibles (ici cellules accessoires et TEM). Lorsque l'on met le tube de sang au contact d'un aimant (MPC de Dynal®), les cellules cibles liées aux billes magnétiques sont retenues par cet aimant, le reste du sang est éliminé dans le surnageant.

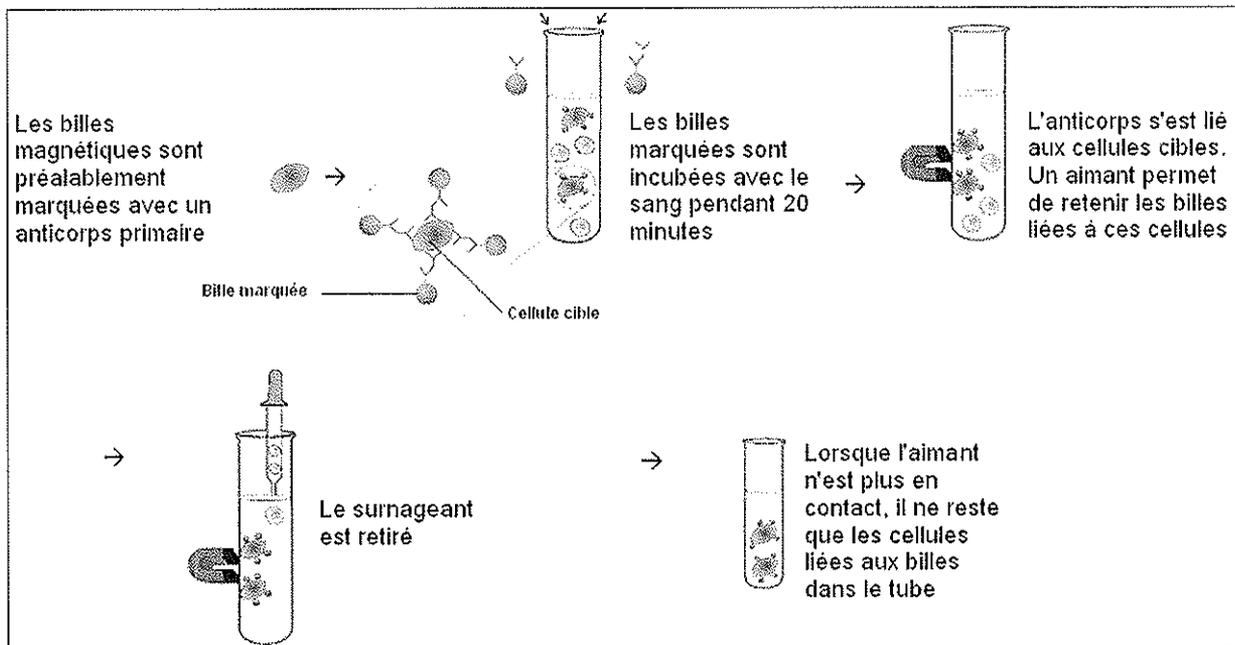


Schéma n° 10 : La technique d'isolement des cellules par billes magnétiques

## 2) Les anticorps

Les cellules accessoires et les TEM n'exprimant pas de marqueurs spécifiques, nous avons testé plusieurs combinaisons d'anticorps monoclonaux afin de les isoler.

Nous avons choisi ces anticorps en fonction de plusieurs critères :

- fréquence de la description des marqueurs contre lesquels ils sont dirigés dans les publications,
- fréquence d'expression de ces marqueurs sur les autres cellules hématopoïétiques.

En effet, pour que ces anticorps soient suffisamment spécifiques des cellules accessoires et des TEM, ils doivent être dirigés contre les marqueurs retrouvés le plus fréquemment sur ces cellules, et si possible, peu exprimés par les autres leucocytes.

Nous avons ainsi sélectionné sept anticorps monoclonaux, tous commandés chez Abcam® : anti-CD11b (ab46677), anti-Tie2 (ab47182), anti-VEGFR-1 (ab9541), anti-CD14 (ab46678), anti-CD16 (ab46679), anti-intégrine  $\alpha\beta 1$  (ab24695), et anti-c-Kit (ab11289), tous sont concentrés à  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sauf l'anti-c-Kit concentré à  $0,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Nous avons réalisé successivement plusieurs séries d'isollements en essayant différentes combinaisons d'anticorps :

- au départ, pour chaque patient ou témoin, nous avons testé 2 combinaisons de trois anticorps : CD11b /  $\alpha\beta 1$  / CD117 et CD11b / Tie2 / VEGFR-1,

- puis, nous avons essayé deux doubles combinaisons dans le but de restreindre notre isolement aux TEM : Tie2 et CD16 ou Tie2 et CD14,
- et enfin nous avons réalisé l'isolement des TEM en n'utilisant plus qu'un seul anticorps : CD14, CD16 ou Tie2.

### 3) La première étape : marquage des billes magnétiques

On utilise 100  $\mu$ L de billes magnétiques par tube de sang de 5 mL.

La quantité voulue de billes magnétiques est lavée préalablement avec la même quantité de la solution suivante : tampon PBS (Phosphate Buffer Saline : 50 mM potassium phosphate, 150 mM NaCl, pH = 7,4), auquel est ajouté 0,1 % de sérumalbumine bovine (BSA).

On met ensuite 100  $\mu$ L de billes lavées en contact avec une quantité totale de 4 $\mu$ g d'anticorps primaire.

Ainsi :

- s'il y a 3 anticorps à utiliser (triple combinaison), on fait 3 aliquots de 33 $\mu$ L de billes lavées, et on rajoute dans chacun l'équivalent de 1,33  $\mu$ g de l'anticorps,
- s'il y a 2 anticorps à utiliser (double combinaison), on fait 2 aliquots de 50  $\mu$ L billes et on rajoute dans chaque l'équivalent de 2  $\mu$ g de l'anticorps,
- en cas de marquage simple, on rajoute 4  $\mu$ L de l'anticorps sélectionné aux 100  $\mu$ L de billes lavées.

Les tubes contenant les billes et les anticorps sont ensuite incubés 45 minutes sur un agitateur rotatif (5 tours par minute) à température ambiante. Les billes liées aux anticorps sont lavées deux fois avec 1 mL de tampon PBS avec 0,1 % de BSA.

### 4) La deuxième étape : enrichissement en cellules accessoires et TEM

Le contenu de chaque tube de sang est transvasé dans un tube Eppendorf de 15 mL, dans lequel on rajoute une quantité totale de 100  $\mu$ L de billes couplées aux différents anticorps.

Le mélange du sang et des complexes billes-anticorps est mis à incuber vingt minutes sur un agitateur rotatif à 4°C.

Les tubes sont ensuite mis en contact avec un aimant pendant 2 minutes, puis on jette le surnageant.

Après quatre lavages, les cellules sont remises en suspension dans 200  $\mu$ L de tampon de lyse du kit d'extraction d'ARN Dynal (Dynabeads® mRNA direct micro kit).

Les tubes sont alors replacés au contact de l'aimant pendant une minute, afin de récupérer le lysat cellulaire dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 mL. Les tubes contenant les billes peuvent alors être jetés.

A la fin de cette étape d'isolement et de lyse cellulaire, deux choix s'offrent à nous :

- soit la conservation des lysats cellulaires à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant au maximum deux semaines,
- soit la poursuite immédiate par l'extraction des ARNm des lysats cellulaires.

### III. Les techniques de biologie moléculaire

#### 1) L'extraction des ARNm :

Afin d'extraire les ARNm, nous utilisons le kit Dynabeads mRNA direct Micro Kit (Dyna®) qui contient des billes magnétiques couplées à des Oligo(dT)<sub>25</sub> à l'aide de liaisons covalentes. Ces billes permettent de capturer les ARNm via leur séquence poly(A) située à l'extrémité 3'. L'intérêt de l'utilisation de ce type de billes est de permettre de récupérer l'ARNm toujours fixé sur les billes dont la surface est un polymère chimiquement inerte : il est ainsi possible d'effectuer directement une transcription inverse, sans passer par une étape d'élution qui pourrait aboutir à une dilution des ARNm et à des pertes de matériel.

##### *a. La préparation des billes Oligo(dT)<sub>25</sub>*

Pour chaque prélèvement, 20 µL de billes Oligo(dT)<sub>25</sub> sont utilisées. Celles-ci sont préalablement lavées deux fois avec le tampon de lyse fourni dans le kit.

##### *b. L'extraction des ARNm*

Les billes lavées sont ajoutées à chaque tube de lysat cellulaire, laissées dix minutes à température ambiante sur un agitateur rotatif.

Les tubes sont placés au contact de l'aimant pendant une minute, puis les surnageants sont éliminés.

Deux séries de lavages sont ensuite nécessaires, avec deux solutions de lavage A et B différentes.

Les billes sont remises en suspension par pipetage dans 100 µL de tampon Tris-HCl 10 mM refroidi par la glace.

Les tubes sont réinsérés dans l'aimant, puis la totalité du surnageant est éliminée.

Les complexes billes – ARNm sont mis en suspension dans 29,5 µL d'eau RNase free.

Enfin, les tubes sont incubés au bain-marie pendant cinq minutes à 50° C avec une agitation de 650 tours par minute, puis sont refroidis immédiatement dans la glace pendant au moins deux minutes.

Il faut alors continuer immédiatement (dans les cinq minutes) par une reverse transcription.

En effet, les complexes billes-ARNm ne peuvent pas être stockés.

## 2) La Transcription Reverse (RT) :

La transcription reverse (RT) a pour but de transcrire l'ARN messager (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc), en utilisant une enzyme : la transcriptase inverse. Cette enzyme utilise les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) pour former une chaîne d'ADN complémentaire à la chaîne d'ARNm servant de matrice.

Comme toutes les ADN polymérases, la transcriptase inverse n'est capable d'ajouter des nucléotides qu'à l'extrémité 3' d'une amorce déjà appariée à la matrice ; comme amorce, on ajoute au préalable des oligo-dT qui s'hybrident à la queue poly(A) en 3' des matrices d'ARNm. La rétrotranscription se déroule en trois étapes :

- hybridation des amorces oligo-dT sur la séquence polyadénylée de l'ARN matrice,
- formation et élongation des molécules d'ADN complémentaires à la séquence d'ARN,
- destruction de la matrice d'ARN.

Dans notre cas, les billes Oligo(dT)<sub>25</sub> liées à la queue poly(A) des ARNm extraits servent d'amorce à la reverse transcriptase. La transcription inverse est effectuée en une seule étape grâce au kit Sensiscript Reverse Transcriptase (Qiagen®) en réalisant un mélange réactionnel contenant des dNTP, du tampon de RT 10x, la transcriptase inverse et un inhibiteur de RNase auquel on ajoute les complexes billes Oligo(dT)<sub>25</sub>-ARNm extraits précédemment, en suivant les instructions du kit que nous utilisons.

### *a. La préparation du mélange réactionnel*

La préparation du mélange réactionnel doit se faire dans la glace. Nous devons toujours préparer un contrôle négatif sans ARNm (RT contrôle).

Composés			Volume
<b>RT Master Mix</b>	Kit Sensiscript	10x Buffer RT	4,0 µL
	reverse transcriptase Qiagen®	dNTP	4,0 µL
		Sensiscript RT	2,0 µL
	RNase inhibiteur 40U/µL, Promega®		0,5 µL
<b>Volume du mélange réactionnel</b>			<b>10,5 µL</b>

Tableau n° 4 : La composition du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel est homogénéisé et centrifugé brièvement. Ce mélange (10,5 µL) est réparti dans de petits tubes Eppendorf individuels de 0,2 µL adaptés à la PCR. On lui ajoute ensuite 29,5 µL de complexe billes/ARNm ou d'eau RNase free (contrôle négatif de la RT), ce qui fait un volume réactionnel total de 40 µL.

#### *b. La synthèse d'ADNc*

La transcription reverse se fait dans un thermocycleur de type GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), pendant une heure à 37° C, cinq minutes à 93° C, puis à 4° C.

A la fin de la réaction, les tubes contenant l'ADNc peuvent être congelés à -20 °C ou conservés dans la glace avant de poursuivre par la PCR multiplexe.

### 3) La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) multiplexe :

La réaction de polymérisation en chaîne permet d'amplifier spécifiquement et en quantité très importante une ou plusieurs séquences d'ADN d'intérêt. La PCR est basée sur la répétition 30 à 40 fois d'un cycle constitué de trois étapes :

- dénaturation, c'est-à-dire séparation des doubles brins d'ADNc issus de l'appariement des brins sens et antisens obtenus après la réaction de transcription inverse,
- hybridation des amorces spécifiquement sélectionnées sur les séquences d'intérêt,
- synthèse et élongation des brins complémentaires grâce à l'activité d'une enzyme de polymérisation de l'ADN, ici, la HotStarTaq DNA polymérase fournie par le kit Qiagen PCR multiplex®.

#### *a. Les amorces utilisées*

Nous avons décidé de réaliser une PCR multiplexe permettant d'amplifier simultanément quatre transcrits d'intérêt et un gène de ménage. L'intérêt du gène de ménage est de posséder une expression stable. Pour un patient donné, il est donc possible d'étudier la variation d'expression des transcrits d'intérêt, en rapportant leur expression à celle du gène de ménage.

Dans notre cas, les six transcrits étudiés sont :

- $\beta$ -actine (NM\_001101), le gène de ménage : l'amorce sens s'hybride à 869 paires de bases (pb), à la jonction des exons 4-5, l'amorce antisens jusqu'à 1012 pb, sur l'exon 5. Ce qui permet l'amplification d'un fragment de 143 paires de bases.
- MMP-9 (NM\_004994) : l'amorce sens s'hybride à 119 pb sur l'exon 1, l'amorce antisens jusqu'à 346 pb sur l'exon 2. Le fragment amplifié fait 231 paires de bases.

- CD11b (NM\_000632) : l'amorce sens s'hybride à 1421 pb à la jonction des exons 11 et 12, l'amorce antisens jusqu'à 1778 pb. Le fragment amplifié fait 358 paires de bases.
- CXCR4 : il existe deux variants du gène de CXCR4 (variant 1 : NM\_001008540, variant 2 : NM\_003467). L'amorce sens s'hybride à 903 pb sur le variant 1 et à 682 pb sur le variant 2. L'amorce antisens s'hybride jusqu'à 1331 pb sur le variant 1 et jusqu'à 1110 pb sur le variant 2. Le fragment amplifié fait 429 paires de bases.
- Tie2 (NM\_000459) : l'amorce sens s'hybride à 1595 pb sur l'exon 11 et l'antisens jusqu'à 2063 pb sur l'exon 13. Le fragment amplifié compte 468 paires de bases.
- VEGFR-1 (NM\_002019) : l'amorce sens s'hybride à 1903 pb à la jonction des exons 12-13, l'antisens jusqu'à 2456 pb sur l'exon 15. Le fragment amplifié fait 553 paires de bases.

Les amorces utilisées pour réaliser la PCR sont commandées chez Sigma-Proligo®. Leurs séquences sont reportées dans le tableau suivant :

amorces : $\beta$ -actine sens	5' TTCCTGGGCATGGAGTCCTGTGGCA 3'
$\beta$ -actine antisens	5' CATCCTGTCGGCAATGCCAGGGTAC 3'
amorces : MMP-9 sens	5' GACCTGAGAACCAATCTCACCGACA 3'
MMP-9 antisens	5' AAAGGTTTGGAATCTGCCAGGTCT 3'
amorces : CD11b sens	5' GTGGGAGTCCAACGCTAATGTCAAG 3'
CD11b antisens	5' TCCTGAGGTTCCGTGAAACAGGTAA 3'
amorces : Tie2 sens	5' CTGTGAGACGCTTCACAACAGCTTC 3'
Tie2 antisens	5' TTCACATCAACGTGCTGGTCTTCAT 3'
amorces : CXCR4 sens	5' TGGTTGTGTTCCAGTTTCAGCACAT 3'
CXCR4 antisens	5' ATGAATGTCCACCTCGCTTTCCTTT 3'
amorces : VEGFR-1 sens	5' ATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTC 3'
VEGFR-1 antisens	5' GGTTGGTGGCTTTGCAGTGATAGAC 3'

Tableau n° 5 : Les séquences des six couples d'amorces

Les amorces sens et antisens sont diluées de façon à avoir une concentration finale de 0,2 mM dans les tubes de réaction PCR.

*b. La préparation du mélange réactionnel*

Le tableau suivant résume les quantités de réactifs et d'ADNc nécessaires pour un échantillon. Un tube de contrôle négatif contenant le mélange amorces et Taq polymérase, sans ADNc, est préparé afin de mettre en évidence une éventuelle contamination.

Le volume final dans chaque tube de PCR est de 50  $\mu$ L.

Composés	Volume
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix : mélange de dNTP, tampon et Taq polymérase	25 $\mu$ L
Amorce sens concentrée à 40 $\mu$ M	0,2 $\mu$ L
Amorce antisens concentrée à 40 $\mu$ M	0,2 $\mu$ L
Eau RNase free	15 $\mu$ L (+8 $\mu$ L pour tube C-)
ADNc	8 $\mu$ L sauf pour le tube C-

Tableau n° 6 : La composition du mélange réactionnel de la PCR multiplexe

*c. L'amplification*

La réaction d'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur de type GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), selon la programmation suivante :

95° → 15 min,  
94° → 30 sec,  
63° → 90 sec,  
72° → 90 sec,  
72° → 10 min,  
4° → ∞.

} 30 cycles

*d. L'électrophorèse des produits de PCR*

Les produits de PCR sont dilués dans un tampon échantillon 6X : Blue/Orange Loading Dye 6X, Promega® référence G1881 (orange G 0,4 %, bleu de bromophénol 0,03 %, xylène cyanol FF, Ficoll®400 15 %, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 50 mM (pH 8,0)).

Ils sont ensuite déposés sur gel d'agarose à 2 %, réalisé avec 30 ml de tampon TBE 1X (tris borate EDTA 1X : 89 mM tris, 89 mM borate, 2 mM EDTA pH=7,4) et 0,6g d'agarose. La migration dans la cuve d'électrophorèse dure environ 30 minutes à 100V.

Le gel est ensuite contre-coloré dans un bain de bromure d'éthidium (BET) pendant 15 minutes. Le BET est un agent intercalant qui s'insinue entre les bases des acides nucléiques et permet leur visualisation lors de leur irradiation par des rayonnements ultra-violets.

Les produits PCR de la troisième série de manipulations sont aussi analysés par électrophorèse capillaire grâce au Bioanalyser 2100 (Agilent®).

## IV. La technique de cytométrie de flux

### 1) Quelques généralités sur la cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une technique permettant la détection et la quantification des signaux lumineux émis par une particule en suspension, après excitation par un ou plusieurs lasers. Lorsque chaque particule passe devant le faisceau laser, la lumière transmise recueillie dans l'axe du laser par une photodiode donne des indications sur la taille des cellules (FSC : forward scattering). D'autre part, la lumière diffusée recueillie à 90° par un photomultiplicateur donne des informations sur la granulosité et la structure des cellules (SSC : side scattering).

De plus, des marqueurs de surface peuvent être analysés, grâce aux couplages d'anticorps spécifiques à des fluorochromes. Une fluorescence est émise lorsque ces molécules, excitées par la lumière laser, reviennent à leur état initial en émettant une lumière de longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde d'excitation. Grâce à l'utilisation de filtres spécifiques et de photomultiplicateurs, on peut recueillir simultanément plusieurs fluorescences pour une même cellule. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration du fluorochrome, ce qui reflète l'intensité d'expression du marqueur correspondant.

Le signal lumineux est ensuite converti en signal électrique traité par informatique. Ces paramètres sont représentés sous forme d'histogrammes.

### 2) Le marquage cytométrique

Pour cette étude cytométrique, nous avons utilisé deux combinaisons de trois anticorps monoclonaux couplés à différents fluorochromes : fluorescéine isothiocyanate (FITC), phycoérythrine (PE), phycoérythrine-cyanine5 (PE-Cy5), phycoérythrine-cyanine7 (PE-Cy7) :

- combinaison 1 : CD45-PE-Cy7, CD14-FITC, CD16-PE-Cy5,
- combinaison 2 : CD45-PE-Cy7, CD14-FITC, CD11b-PE.

Les marquages sont réalisés sur 200 µL de cellules isolées, récupérées juste avant l'étape de lyse : les cellules sont mises en suspension dans 400 µL de RPMI Gibco® contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules sont ensuite incubées avec 10 µL d'anticorps de chaque combinaison pendant 15 minutes à l'obscurité à température ambiante, puis lavées et reprises dans 500 µL de PBS Gibco® pour l'analyse sur le cytomètre.

Les analyses sont réalisées sur un cytomètre 5 couleurs, FC500 (Beckman-Coulter) relié au logiciel informatique CXP analysis.

### PARTIE III : RÉSULTATS

Nos travaux de recherche se sont déroulés en trois étapes successives, impliquant trois séries de manipulations. Ces expériences ont toutes été réalisées selon le protocole développé précédemment, en modifiant les conditions d'isolement et / ou les gènes à amplifier en PCR multiplexe.

Ainsi, **une première série de manipulations** a visé à sélectionner à la fois les cellules accessoires et les monocytes exprimant le récepteur Tie2 (TEM), grâce à deux combinaisons de trois anticorps. Les amorces choisies pour la PCR multiplexe ont permis d'amplifier les gènes suivants :  $\beta$ -actine, MMP-9, CD11b, CXCR4, et VEGFR-1.

Devant les difficultés rencontrées, nous avons ensuite tenté de restreindre notre recherche aux TEM à l'aide d'une combinaison de deux anticorps, l'un marquant la population monocyttaire de façon plus ou moins restrictive (CD14 ou CD16), l'autre étant dirigé contre le récepteur Tie2. C'était le but de **notre deuxième série de manipulations**.

Dans la **troisième série de manipulations**, nous n'avons utilisé plus qu'un seul anticorps pour isoler les TEM, anticorps dirigé contre le récepteur Tie2. Pour la PCR, nous avons remplacé le couple d'amorce ciblant CXCR4 par un couple d'amorce permettant l'amplification du gène du récepteur Tie2.

Enfin, nous avons comparé la spécificité de ces isolements cellulaires et de ces PCR avec celle d'un kit commercial utilisant la même technique pour mettre en évidence les cellules tumorales circulantes (CTC).

## I. Mise au point

### 1) L'isolement des cellules accessoires et des TEM

À la première utilisation des réactifs, nous avons fait un étalement sur lame de l'isolat cellulaire. Celui-ci a ensuite été coloré au MGG (may grunewald giemsa). Nous avons pu voir des cellules mononuclées liées aux billes magnétiques. Cela nous a permis de vérifier que les liaisons billes magnétiques-anticorps et anticorps-cellules fonctionnaient.

### 2) La PCR Multiplexe

Chaque couple d'amorces a d'abord été testé seul sur plusieurs ADNc obtenus à partir de différentes lignées cellulaires susceptibles d'exprimer les marqueurs que nous étudions.

Nous avons utilisé les ADNc de trois lignées cellulaires :

- Widr : lignée tumorale obtenue après mise en culture de cellules d'un adénocarcinome colique humain bien différencié de grade 1,
- Sw480 : lignée tumorale obtenue après mise en culture de cellules d'un adénocarcinome colique humain de grade 3-4,
- hTERT-HDLEC (human telomerase reverse transcriptase - human dermal microvascular endothelial cells) : ce sont des cellules endothéliales lymphatiques extraites à partir des microvaisseaux du derme d'origine humaine, ayant été transfectées par un rétrovirus contenant la région codante du gène hTERT.

Nous avons également testé nos différents couples d'amorces sur l'ADNc de leucocytes extraits par centrifugation sur gradient de Ficoll du sang d'un patient atteint d'un cancer.

L'expression de nos marqueurs au sein de ces différents types cellulaires est résumée dans le tableau suivant :

	Widr	Sw480	hTERT-HDLEC	Leucocytes
$\beta$ -actine	+	+	+	+
MMP-9	-	+	-	+
CD11b	-	-	-	+
CXCR4	+	+	-	+
Tie2	-	-	+	-
VEGFR-1	-	-	+	-

Tableau n° 7 : L'expression des marqueurs choisis selon les différentes lignées cellulaires disponibles au laboratoire

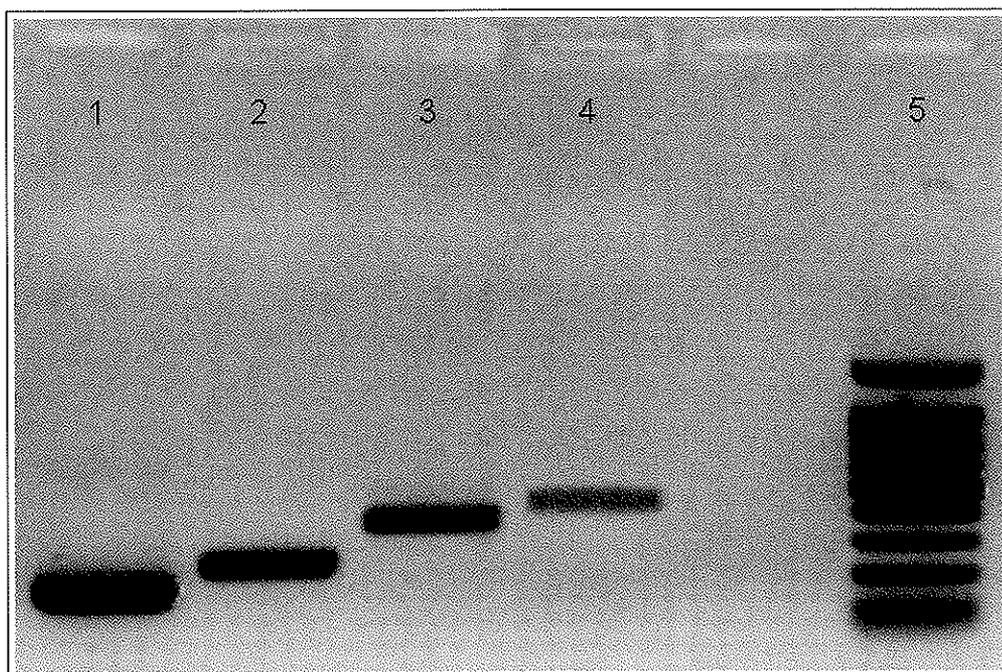


Photo n° 1 : Résultats des PCR  $\beta$ -actine, MMP-9, CD11b, CXCR4 sur l'ADNc des leucocytes

1 :  $\beta$ -actine : 143 pb,

2 : MMP-9 : 231 pb,

3 : CD11b : 358 pb,

4 : CXCR4 : 429 pb,

5 : marqueur de taille 100 pb.

La taille ainsi que la digestion de chaque produit de PCR par des enzymes de restriction adaptées nous a permis de vérifier que nous amplifions les séquences d'ADNc spécifiques.

Nous avons enfin fait un essai de PCR multiplexe sur les ADNc des cellules hTERT-HDLEC et des leucocytes.

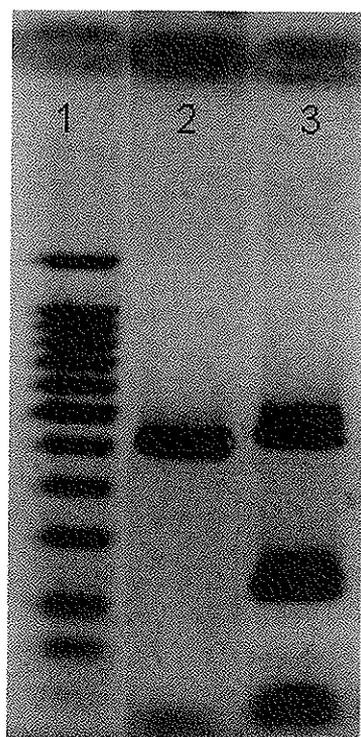


Photo n° 2 : PCR Tie2 et PCR multiplexe  $\beta$ -actine, MMP-9, CD11b, Tie2, VEGFR-1 sur l'ADNc des cellules hTERT-HDLEC.

- 1 : marqueur de taille 100 pb
- 2 : bande à la hauteur de Tie2 : 468 pb
- 3 : deux bandes, l'une à la hauteur de Tie2 : 468 pb, l'autre à la hauteur de VEGFR-1 : 553 pb.

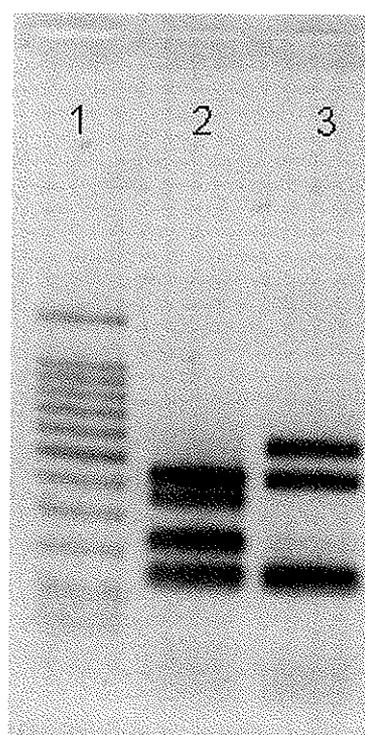


Photo n° 3 : PCR multiplexe  $\beta$ -actine, MMP-9, CD11b, CXCR4, VEGFR-1.

- 1 : marqueur de taille 100 pb
- 2 : sur l'ADNc des leucocytes (4 bandes :  $\beta$ -actine, MMP-9, CD11b, CXCR4).
- 3 : sur l'ADNc des cellules hTERT-HDLEC (3 bandes :  $\beta$ -actine, CXCR4, VEGFR-1).

## II. La première série de manipulations

Cette première série de manipulations a visé à mettre en évidence la présence de cellules accessoires et de TEM circulants au sein d'un groupe de dix malades atteints de tumeurs variées à des stades évolutifs différents, et chez onze témoins indemnes de pathologie néoplasique. Deux tubes EDTA de 5 mL sont prélevés pour chaque patient et pour chaque témoin.

Rappelons que les cellules que nous recherchons ne possèdent pas de marqueurs spécifiques, mais plutôt une combinaison de marqueurs retrouvés sur un grand nombre de cellules sanguines. Nous avons utilisé deux combinaisons d'anticorps, ce qui nous a permis de comparer les isollements obtenus.

### 1) Le choix des anticorps

Pour la première combinaison, nous avons associé un anticorps anti-CD11b avec un anti-intégrine  $\alpha 4\beta 1$  et un anti-c-Kit. Dans la deuxième, nous avons combiné à nouveau notre anticorps anti-CD11b avec un anti-Tie2 et un anti-VEGFR-1.

Le choix de ces combinaisons s'est avéré être une étape délicate : parmi les sept anticorps que nous avons à disposition, chacun présente des avantages et des inconvénients.

- *L'anticorps anti-CD11b* : tous les auteurs s'accordent sur la présence du CD11b à la surface des cellules accessoires et des TEM [15, 18, 21, 22, 23, 25, 27]. Il nous a donc semblé être un marqueur très important devant être présent dans les deux combinaisons d'anticorps. Le principal inconvénient est son manque de spécificité : CD11b est exprimé sur la plupart des cellules granulo-monocytaires.
- *L'anticorps anti-VEGFR-1* : la présence du récepteur VEGFR-1 à la surface des cellules accessoires est aussi très décrite dans les publications [25, 26, 38, 40, 47], puisqu'il est responsable de leur activité proangiogénique de par sa liaison au VEGF. Mais VEGFR-1 est aussi présent sur les progéniteurs des cellules endothéliales circulantes et quelques cellules endothéliales circulantes.
- *L'anticorps anti-c-Kit* : le récepteur c-Kit est présent sur les cellules accessoires et sur les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques qui sont peu représentés dans la circulation sanguine. Le principal inconvénient de cet anticorps est que le récepteur c-Kit n'est pas exprimé par les TEM.

- *L'anticorps anti-intégrine  $\alpha 4\beta 1$*  : l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  joue un rôle majeur dans l'adhésion des cellules accessoires et des monocytes à l'endothélium [18, 25], mais elle est aussi exprimée par la plupart des leucocytes [18].
- *L'anticorps anti-Tie2* : Tie2 est le marqueur le plus spécifique des TEM [15, 21, 22]. Ce récepteur n'est pas exprimé par les leucocytes sanguins. Néanmoins, Tie2 est aussi présent sur les cellules endothéliales circulantes.

## 2) Le choix des amorces

Comme nous l'indiquons dans la partie précédente, la PCR multiplexe est réalisée avec cinq couples d'amorces permettant les amplifications suivantes de quatre gènes d'intérêt et d'un gène de ménage (la  $\beta$ -actine). Dans cette première manipulation, nous avons utilisé tout d'abord une combinaison  $\beta$ -actine, MMP-9, CD11b, CXCR4, et VEGFR-1. Nous avons choisi ces marqueurs en fonction de leur expression au sein des cellules accessoires et des TEM :

- $\beta$ -actine (143 pb) : le gène de ménage, qui sert de contrôle interne ;
- MMP-9 (231 pb) : cette métalloprotéinase, qui dégrade la matrice extracellulaire et induit une augmentation la concentration locale en VEGF et sKitL devrait être surexprimée dans les cellules isolées chez les malades par rapport à la population témoin [23, 25] ;
- CD11b (358 pb) : cette intégrine devrait, elle aussi, être surexprimée chez les malades qui possèdent un plus grand nombre de cellules accessoires et de TEM circulants que les témoins [15, 21, 22]. Son amplification par PCR nous permet, en plus, de vérifier que l'isolement des cellules par l'anticorps anti-CD11b a bien fonctionné ;
- CXCR4 (429 pb) : la présence de ce récepteur à la surface des cellules accessoires est très importante puisque c'est grâce à lui qu'elle sont piégées par SDF-1 dans les zones à vasculariser [24, 26];
- et VEGFR-1 (553 pb) : ce récepteur est responsable de l'activité proangiogénique des cellules accessoires, ce qui les distingue des autres cellules myéloïdes [25, 26, 38, 40, 47]. Il n'est cependant pas décrit à la surface des TEM.

### 3) Les résultats de la PCR multiplexe

#### a. *Chez les témoins*

Chez les témoins, nous avons comparé l'expression des cinq transcrits sur les ADNc obtenus après isolement des cellules accessoires et des TEM avec les deux combinaisons différentes d'anticorps.

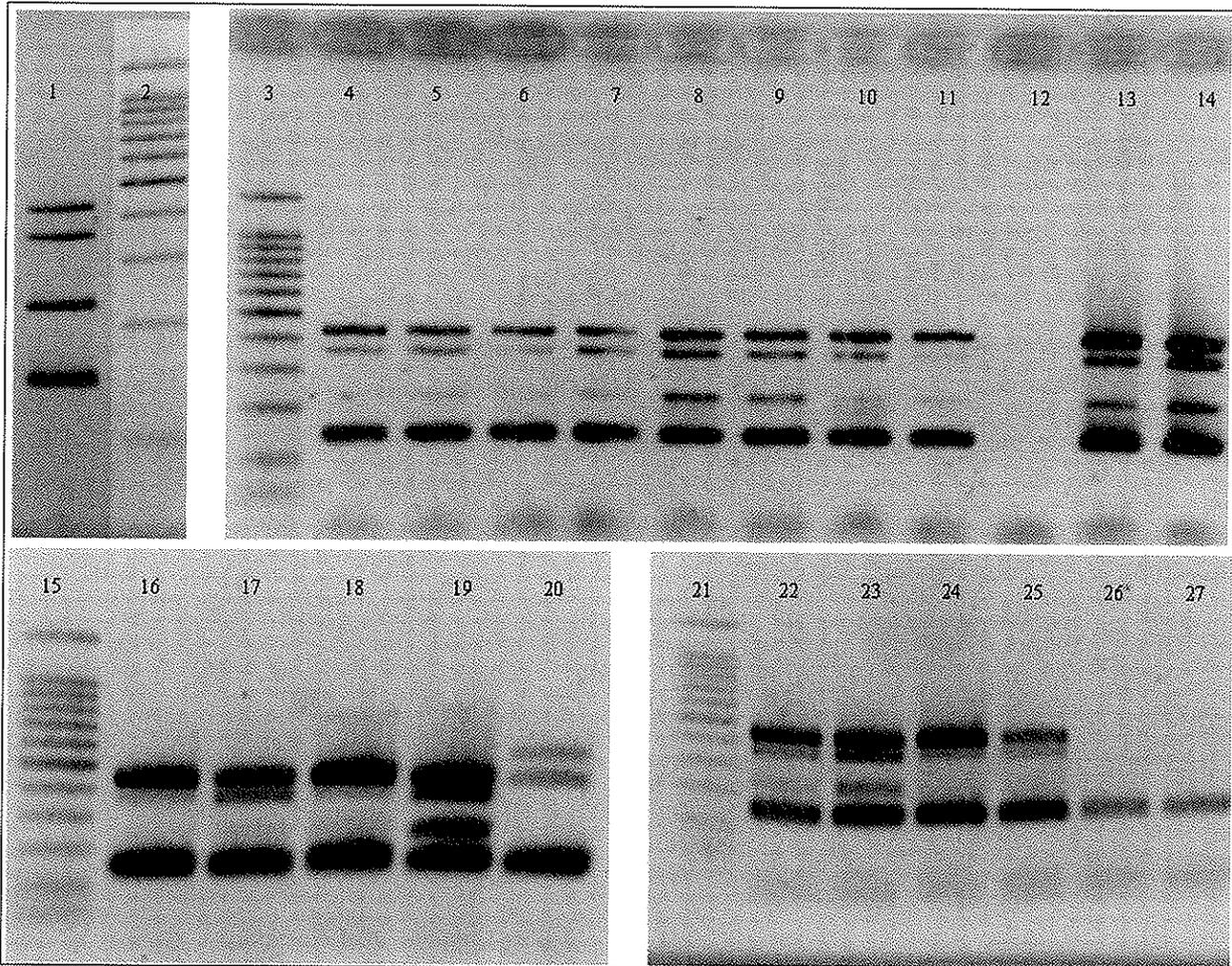


Photo n° 4 : Expression de MMP-9, de CD11b, de CXCR4 et de VEGFR-1 avec comme gène de référence la  $\beta$ -actine sur les ADNc obtenus après isolement des cellules accessoires et des TEM chez les témoins

Puits n° 2, 3, 15, 21 : marqueur de taille 100 pb

Puits n° 1, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 18, 22, 24, 26 : après isolement avec les anticorps anti-CD11b,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, c-Kit.

Puits n° 5, 7, 9, 11, 14, 17, 19, 23, 25, 27 : après isolement avec les anticorps anti-CD11b, Tie2, VEGFR-1.

Puits n°12 : contrôle négatif de la RT.

Puits n°17 : cellules hTERT-HDLEC exprimant seulement VEGFR-1 et CXCR4. Un contrôle négatif est réalisé à chaque PCR, il n'apparaît pas sur ces photos.

Avec l'une ou l'autre des deux combinaisons d'anticorps utilisée, l'analyse des différents gels d'électrophorèse a permis de constater :

- que les cellules isolées de onze témoins sur douze expriment trois des quatre marqueurs d'intérêt : MMP-9, CD11b et CXCR4,
- que le transcrit du récepteur VEGFR-1 n'est jamais amplifié,
- que les cellules isolées chez un seul témoin n'expriment pas MMP-9, CD11b et CXCR4 quelle que soit la combinaison d'anticorps utilisée : ce résultat a été vérifié par l'analyse d'un deuxième prélèvement.

#### *b. Chez les patients*

Selon les études bibliographiques, le sang des malades que nous avons testés devrait être plus riche en cellules accessoires et en TEM que celui des témoins.

Rappelons que les cellules accessoires et les TEM :

- possèdent à leur surface le récepteur CD11b ; nous devrions retrouver une augmentation de l'intensité de la bande CD11b, quelle que soit la combinaison d'anticorps utilisée,
- sécrètent une grande quantité de MMP-9,
- possèdent le récepteur CXCR4, qui leur permet d'être capturé dans les zones à néovasculariser par SDF-1,
- possèdent le récepteur VEGFR-1.

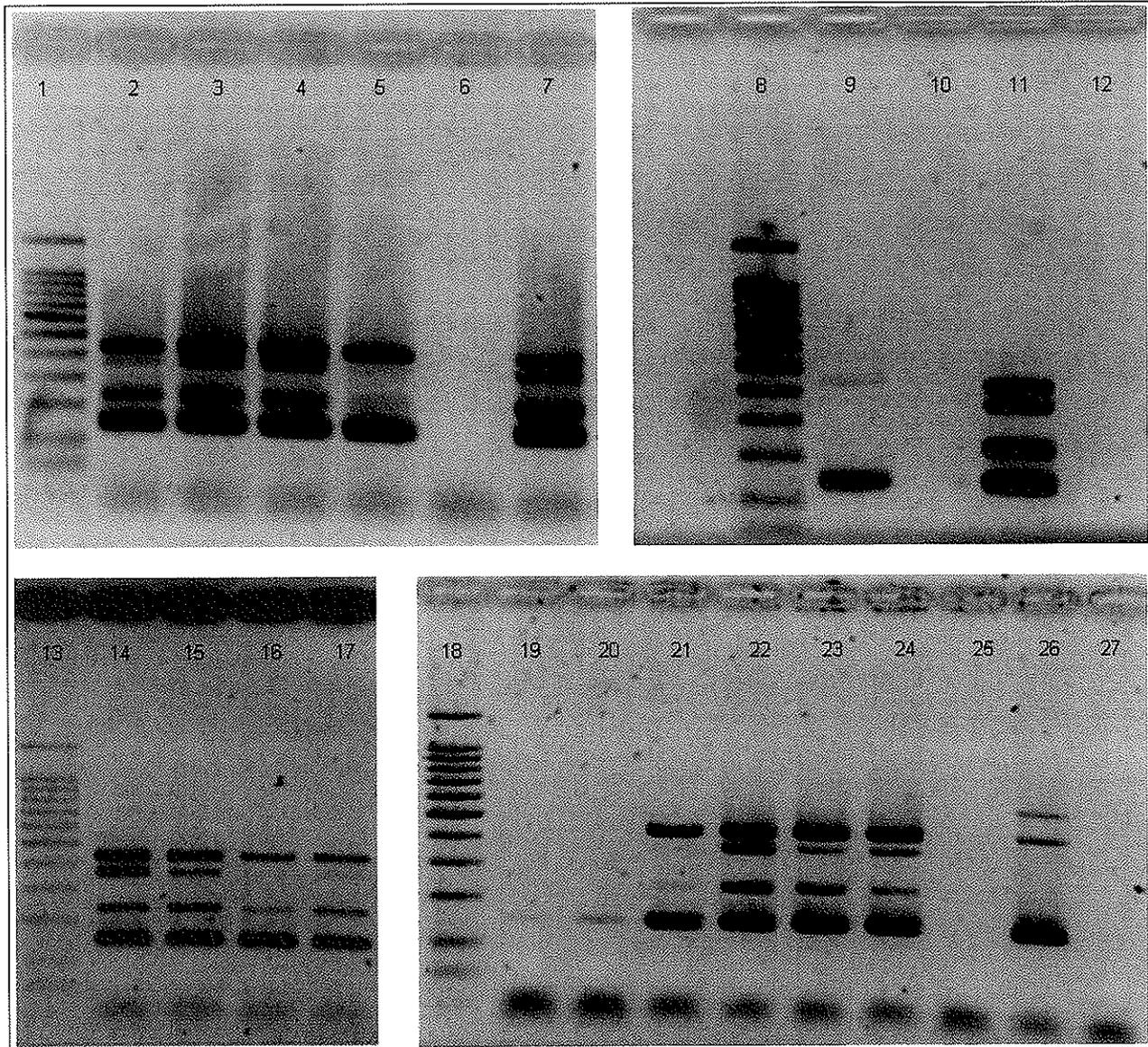
Lors de l'analyse des gels d'électrophorèse des patients, comme le montre la photo n° 5 page suivante, nous nous attendions donc à trouver :

- une augmentation de l'intensité des bandes CD11b, MMP-9 et peut-être de CXCR4 (cette dernière était toutefois déjà très intense chez les témoins),
- l'apparition d'une bande correspondant au VEGFR-1.

Or, nous avons remarqué qu'avec l'une ou l'autre combinaison d'anticorps testée chez les malades :

- la plupart des patients expriment fortement quatre des cinq marqueurs testés,
- le transcrit du récepteur VEGFR-1 n'est jamais amplifié,
- un seul patient n'exprime ni MMP-9, ni CD11b, ni CXCR4.

Pour un même malade ou un même témoin, l'intensité des bandes varie selon la combinaison d'anticorps, mais la combinaison la plus "efficace" n'est pas la même d'un patient à un autre ou d'un témoin à un autre. Il semblerait qu'aucune des deux combinaisons d'anticorps utilisée n'isole préférentiellement les TEM ou les cellules accessoires.



Photos n° 5 : Expression de MMP-9, de CD11b, de CXCR4 et de VEGFR-1 avec comme gène de référence la  $\beta$ -actine sur les ADNc obtenus après isolement des cellules accessoires et des TEM chez les malades

Puits n° 1, 8, 13, 18 : marqueur de taille 100 pb.

Puits n° 2 : après isolement avec l'anticorps anti-CD11b seul.

Puits n° 3 : après isolement avec les anticorps anti-CD11b et  $\alpha 4\beta 1$ .

Puits n° 4, 9, 14, 16, 19, 21, 23 : après isolement avec les anticorps anti-CD11b,  $\alpha 4\beta 1$ , c-Kit.

Puits n° 15, 17, 20, 22, 24 : après isolement avec les anticorps anti-CD11b, Tie2, VEGFR-1.

Puits n° 7 et 11 : contrôle positif : leucocytes.

Puits n° 26 : cellules hTERT-HDLEC.

Puits n° 6, 10 et 25: contrôle négatif RT.

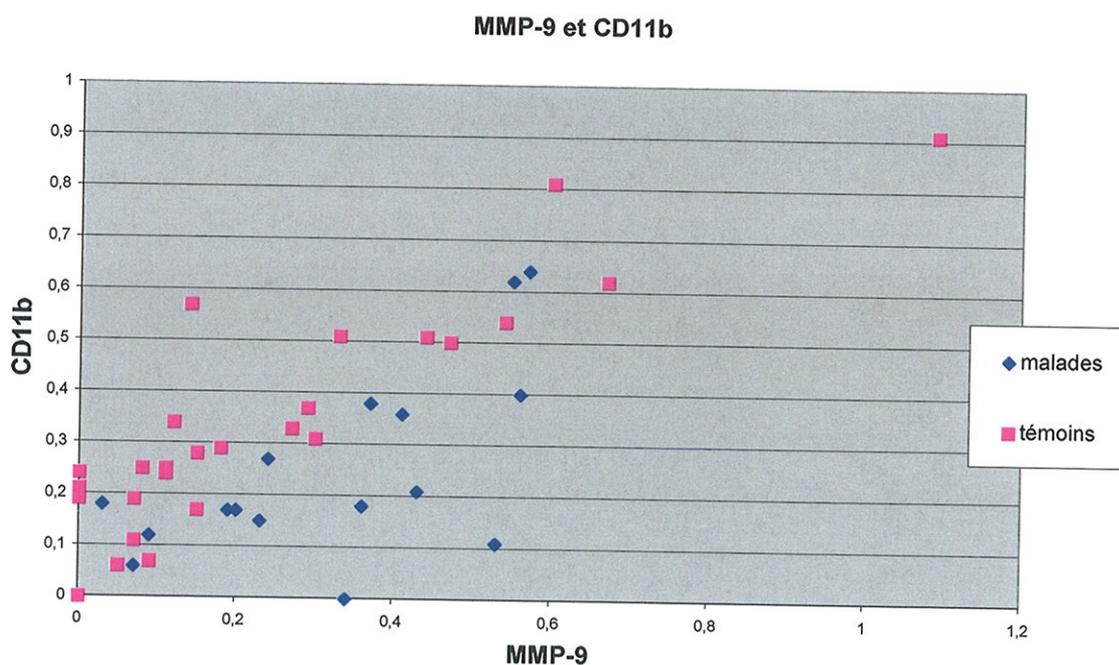
Puits n° 12 et 27 : contrôle négatif PCR.

#### 4) Un essai de semi-quantification

Le logiciel de lecture des gels d'électrophorèse possède le programme Bio1D qui permet une semi-quantification des bandes. Ce programme fait le calcul du volume de chaque bande électrophorétique. Il suffit ensuite de faire le rapport du volume des bandes de chaque gène d'intérêt sur celui de la  $\beta$ -actine, notre gène de ménage qui nous sert de référence pour un individu donné.

Les ratios de semi-quantification nous ont permis de comparer chez les malades et les témoins :

- les rapports MMP-9/ $\beta$ -actine et CD11b/ $\beta$ -actine,
- les rapports MMP-9/ $\beta$ -actine et CXCR4/ $\beta$ -actine,
- les rapports CD11b/ $\beta$ -actine et CXCR4/ $\beta$ -actine.





Sur le graphique n° 1, le nuage de points des malades semble se positionner de façon différente de celui des témoins. En particulier, on observe une plus grande concentration des témoins sur des valeurs faibles du rapport MMP-9/ $\beta$ -actine ( $<0,2$ ). Ceci est en accord avec l'hypothèse selon laquelle le groupe de malades devrait exprimer davantage MMP-9.

De plus, une relation croissante, pouvant peut-être être modélisée par une régression linéaire, semble se dessiner entre MMP-9 et CD11b.

En revanche, les graphiques suivants nous montrent que les variables CD11b et CXCR4 ne semblent pas être suffisamment discriminantes sur l'échantillon.

### 5) Quelques statistiques

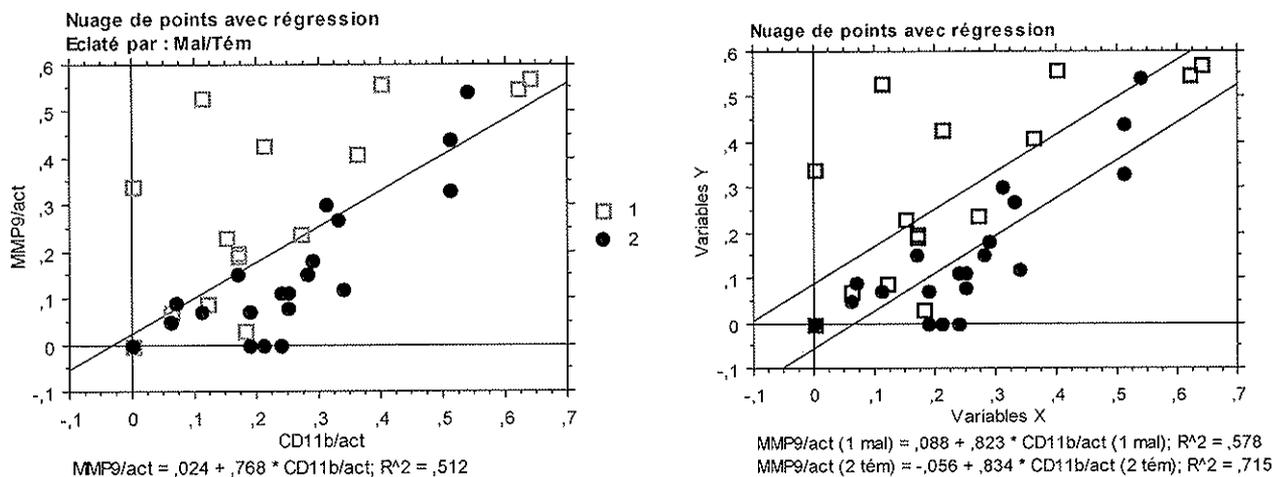
Nous pouvons, à l'aide d'un test statistique d'égalité de moyennes (test de Student), tenter de vérifier si la moyenne du rapport MMP-9/ $\beta$ -actine est significativement différente dans les deux groupes (malades et témoins). Le test n'est toutefois pas concluant sur l'échantillon testé.

Valeurs moyennes du rapport MMP-9/ $\beta$ -actine :

- groupe des témoins = 0,234
- groupe des malades = 0,259

Test d'égalité des moyennes (statistique de Student) :  $p = 0,73$  (valeur test très élevée ne permettant pas de rejeter l'hypothèse d'égalité des moyennes)

Au vu du graphique n° 1, il paraît également judicieux d'étudier la relation entre la quantité de MMP-9 et celle de CD11b. Le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho = 0,67$ ) et la valeur-test associée ( $p < 0,0001$ ), confirment l'existence d'une forte corrélation entre les deux quantités. Il apparaît donc légitime de modéliser la relation entre MMP-9 et CD11b à l'aide d'une régression. Nous utilisons pour cela le logiciel Statview :



Graphique n° 4 : Modélisation de la relation entre les quantités MMP-9/ $\beta$ -actine et CD11b/ $\beta$ -actine, pour l'ensemble des patients, puis selon le groupe d'appartenance (malades ou témoins)

La modélisation proposée par Statview est plus pertinente pour le groupe des témoins ( $R^2=0,72$ ) que pour celui des malades ( $R^2=0,58$ ). Les coefficients estimés des deux modèles confirment que le rapport MMP-9/CD11b est plus élevé chez les malades que chez les témoins, ce qu'ont déjà indiqué les statistiques descriptives :

Moyenne rapport MMP-9/CD11b Malades :  $1,38 \pm 1,12$

Médiane rapport MMP-9/CD11b Malades : 1,14

Moyenne rapport MMP-9/CD11b Témoins :  $0,58 \pm 0,36$

Médiane rapport MMP-9/CD11b Témoin : 0,62

Sur notre échantillon, une telle relation linéaire ne peut être mise en évidence entre CD11b et CXCR4, ni entre MMP-9 et CXCR4.

#### 6) La corrélation de nos résultats avec la clinique au sein du groupe de malades

Dans le groupe de patients, nous nous attendions à retrouver une corrélation entre l'intensité des bandes CD11b, MMP-9 et CXCR4 et le degré d'envahissement métastatique de la tumeur. Pour chaque patient, nous avons confronté les résultats des manipulations avec ceux du TEP réalisé le jour du prélèvement sanguin.

Ainsi, parmi les dix patients :

- cinq sont atteints d'une dissémination métastatique viscérale plus ou moins importante,
- trois ne sont atteints que de métastases ganglionnaires,

- une personne s'est présentée pour suspicion de récurrence tumorale, il s'agissait en réalité d'un foyer infectieux,
- une personne ne présente qu'une lésion primitive sans atteinte ganglionnaire ni viscérale.

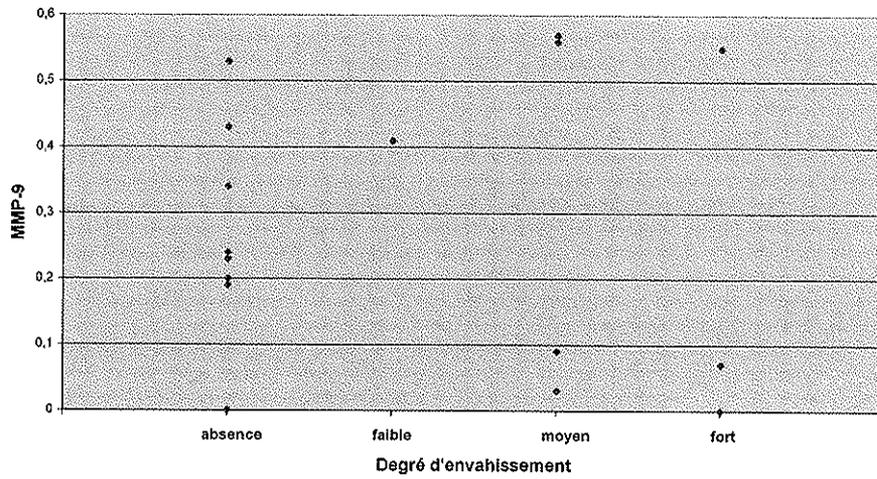
Nous avons essayé de quantifier le degré d'envahissement métastatique viscéral de nos patients (en fonction du nombre et de la taille des métastases) et de les classer selon quatre catégories :

- absent (cinq cas),
- faible (un cas),
- moyen (deux cas),
- et fort (deux cas).

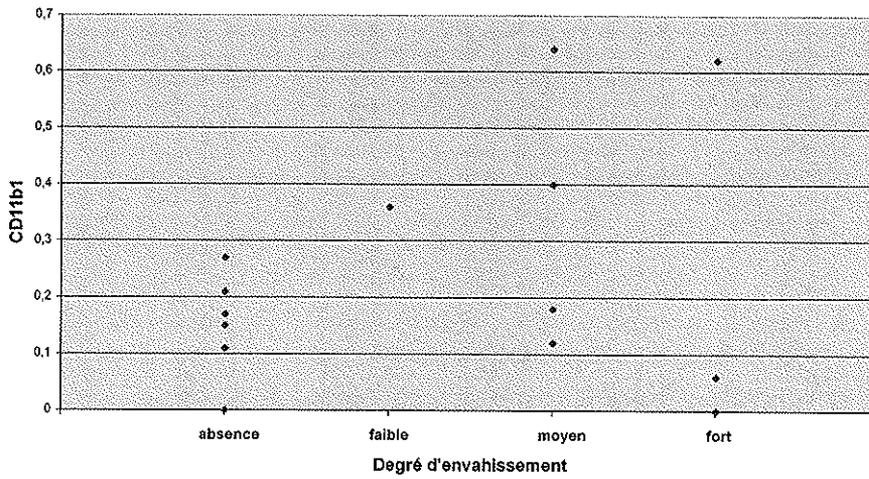
Sur les graphiques de la page suivante, nous avons représenté ce degré d'envahissement en fonction des rapports MMP-9/ $\beta$ -actine, CD11b/ $\beta$ -actine et CXCR4/ $\beta$ -actine.

Ces graphes ne nous permettent pas de montrer l'existence d'un lien entre la gravité de l'atteinte métastatique et les marqueurs CD11b, MMP-9, CXCR4. En effet, des patients souffrant de tumeurs polymétastasées peuvent avoir de faibles quantités de chaque marqueur.

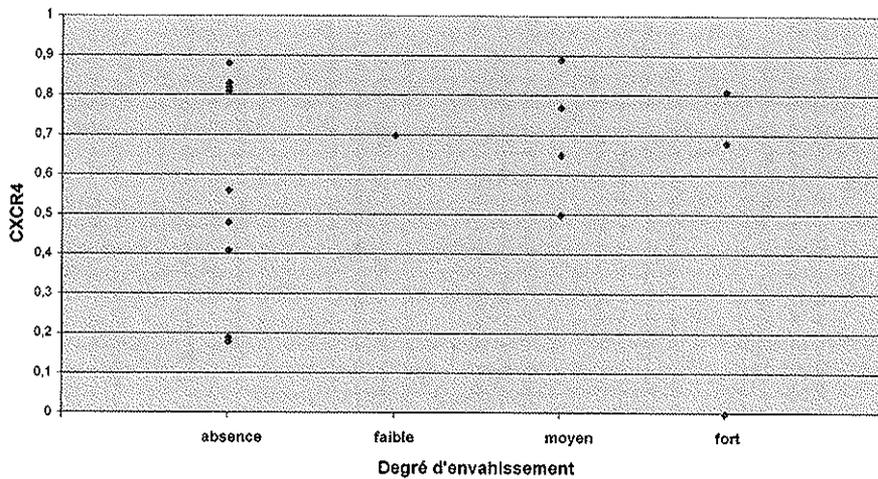
Degré d'envahissement de la tumeur et MMP-9



Degré d'envahissement de la tumeur et CD11b



Degré d'envahissement de la tumeur et CXCR4



Graphiques n° 5, 6 et 7 : Rapports MMP-9/ $\beta$ -actine, CD11b/ $\beta$ -actine et CXCR4/ $\beta$ -actine en fonction du degré d'envahissement de la tumeur

### III. La deuxième série de manipulations

N'obtenant pas de différence significative d'expression de MMP-9, CD11b, CXCR4 et VEGFR-1 entre la population de malades et celle de témoins, nous avons suspecté la qualité de nos isollements cellulaires. Les cellules accessoires et les TEM ne possédant pas de marqueurs spécifiques, nous avons donc utilisé des anticorps marquant d'autres cellules normalement présentes dans le sang et en plus grand nombre que celles que nous recherchons.

Dans une deuxième série de manipulations, nous avons donc préféré restreindre notre recherche aux TEM, qui ont l'avantage de constituer une sous-population monocyttaire plus homogène que celle des cellules accessoires. En effet, l'isolement des cellules accessoires au sein de la population myéloïde circulante est sans doute le plus problématique, car il pose deux difficultés :

- d'une part, les cellules accessoires possèdent beaucoup de marqueurs communs avec les cellules granuleuses (dont CD11b et l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ ), qui sont très nombreuses dans la circulation sanguine,
- d'autre part, elles ne constituent pas une population homogène.

Ainsi, il nous a semblé plus facile d'isoler seulement les TEM à l'intérieur de la population monocyttaire, que d'isoler les TEM et les cellules accessoires à partir de l'ensemble des leucocytes.

En effet, on dénombre parmi les leucocytes circulants :

- 40 à 80 % de cellules polynuclées,
- 19 à 48 % de lymphocytes,
- et « seulement » 3 à 9 % de monocytes.

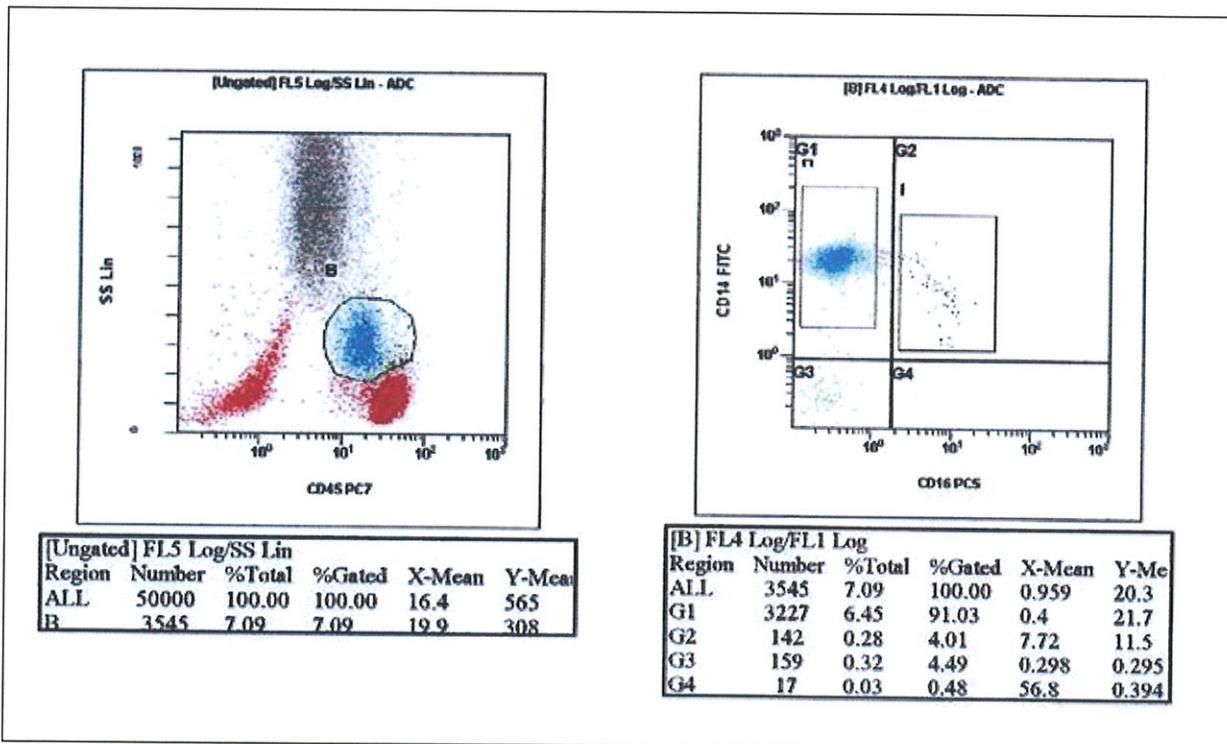
Nous rappelons que les TEM expriment les marqueurs :

- CD14, un marqueur de la lignée monocyttaire,
- CD16, retrouvé sur les monocytes et les cellules dendritiques,
- CD11b, présent à la fois sur les monocytes et les granuleux,
- et Tie2, retrouvé sur les cellules endothéliales.

Nous avons ainsi testé en cytométrie de flux (CMF) de nouvelles conditions d'isolement. La technique utilise soit un, soit deux anticorps, chez des témoins seulement :

- CD16 seul,
- CD16 et Tie2,
- CD14 seul,
- CD14 et Tie2,
- ou Tie2 seul.

Nous avons dans un premier temps réalisé un marquage CD45/CD14/CD16 sur sang total sans isolement préalable, prélevé sur tube EDTA, afin de localiser la population monocytaire sur les graphes et d'étudier l'expression des marqueurs CD14 et CD16 au sein d'une population monocytaire normale.



Graphiques n° 8 et 9 : Marquage CD45/CD14/CD16 sur sang total

Nous avons réalisé un fenêtrage sur la population monocytaire (population B encadrée, graphe 8). Le graphe 9 met en évidence que cette population monocytaire dans sa majorité exprime fortement le marqueur CD14 et n'exprime pas le CD16. Un petit contingent de cellules exprime à la fois CD16 et CD14 (l'expression de CD14 est, dans ce cas, plus faible que pour le reste de la population monocytaire) : ce qui correspondrait aux TEM.

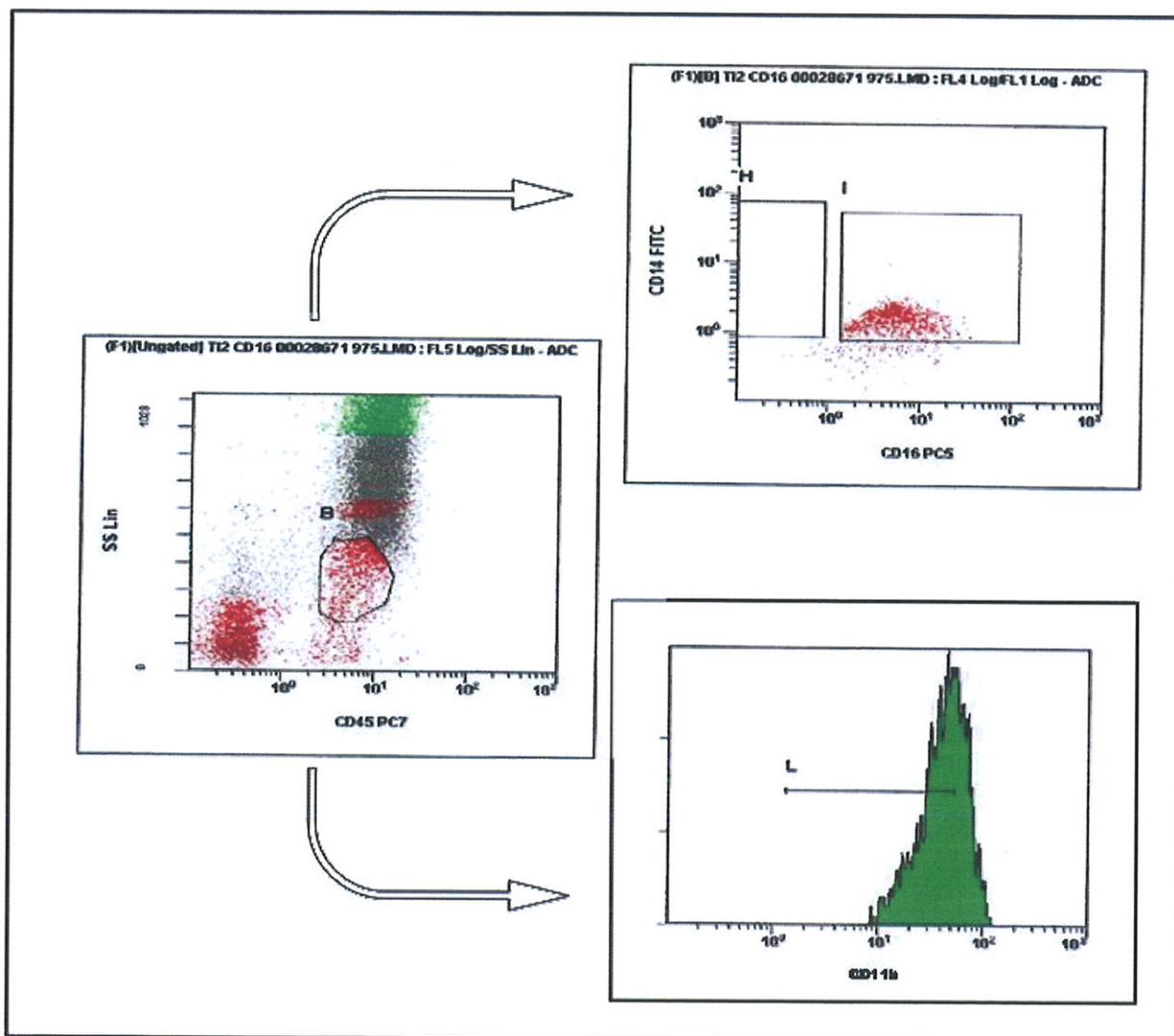
## 1) Les résultats de la cytométrie

### a. *L'isolement avec un anticorps anti-CD16 seul*

Le CD16 est un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines G, il existe sous deux formes :

- CD16a présent sur les cellules NK (natural killer),
- et CD16b présent sur tous les granulocytes.

Pour réaliser l'isolement des TEM ( $CD14^{faible}/CD16^+$ ), nous avons choisi un anticorps se liant à la fois aux récepteurs CD16a et CD16b.



Graphiques n° 10, 11 et 12 : Isolement réalisé avec l'anticorps anti-CD16 seul

Les graphes de cytométrie ci-dessus nous montrent que cet anticorps :

- sélectionne la totalité de la population granuleuse,
- sélectionne faiblement la population monocytaire.

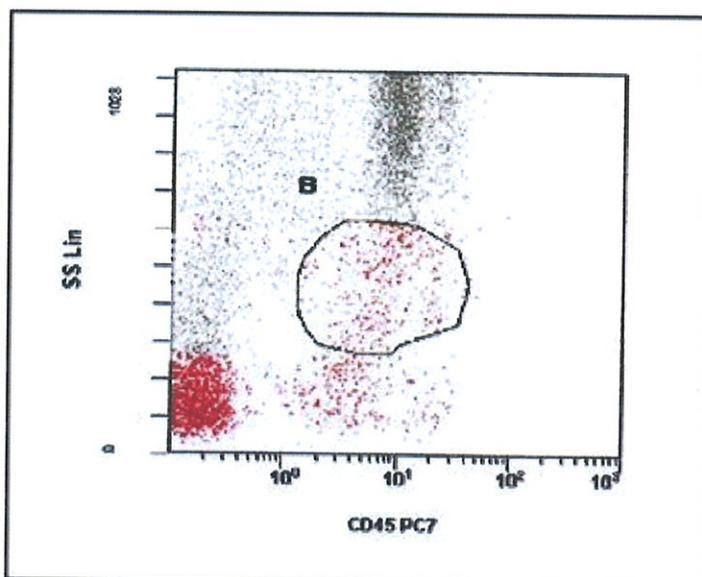
La population monocytaire (population B encadrée sur le graphe de gauche) exprime :

- fortement le CD11b et le CD16,
- faiblement le CD14 comme nous le voyons sur les deux graphes de droite.

La population monocytaire est toutefois beaucoup moins représentée que lorsqu'on réalise les mêmes marquages sur sang total.

*b. L'isolement avec un anticorps anti-CD16 couplé à un anticorps anti-Tie2*

Comme l'indique le graphique suivant, la spécificité n'est pas accrue lorsque l'on cherche à isoler les TEM avec l'association de deux anticorps : l'un dirigé contre le récepteur CD16 et l'autre contre le récepteur Tie2. En effet, on isole toujours beaucoup trop de granulocytes et trop peu de monocytes.



Graphique n° 13 : Isolement réalisé avec l'anticorps anti CD16 couplé à un anticorps anti-Tie2

En conclusion, l'isolement des TEM par un anticorps anti-CD16 seul ou associé à d'autres anticorps manque de spécificité, à cause de la sélection de toute la population granuleuse. Nous n'avons donc plus utilisé d'anticorps anti-CD16 dans la suite de notre travail.

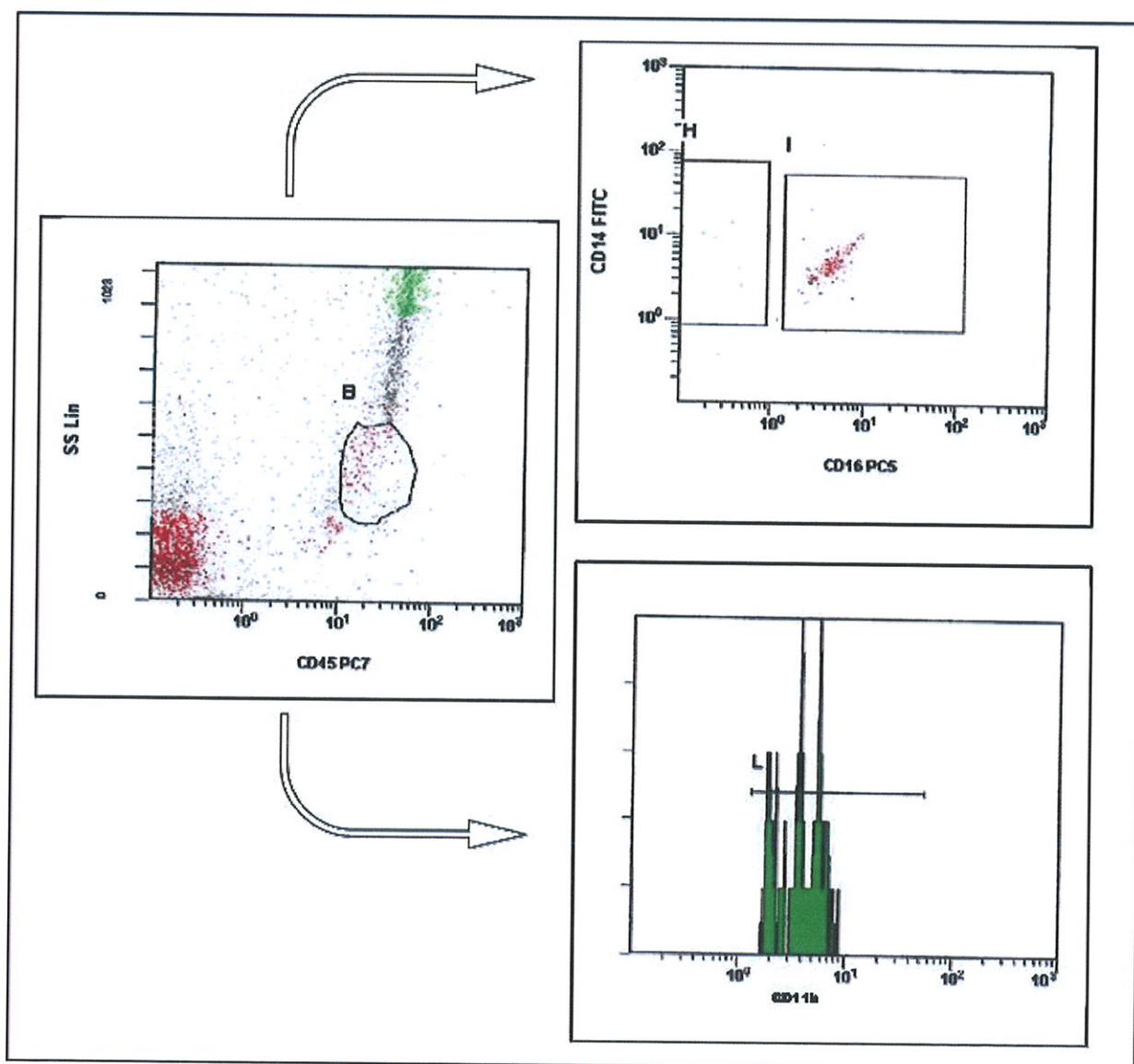
c. *L'isolement avec un anticorps anti-CD14 seul*

Le CD14 est un récepteur de surface pour le lipopolysaccharide (LPS) et pour la protéine se liant au LPS. C'est un bon marqueur de la lignée monocytaire, néanmoins il est également exprimé par quelques cellules dendritiques et quelques granulocytes.

Les graphes de cytométrie nous montrent que :

- on isole grâce à la technique beaucoup moins de cellules granuleuses qu'en utilisant un anticorps anti-CD16,
- malheureusement, on isole également très peu de monocytes.

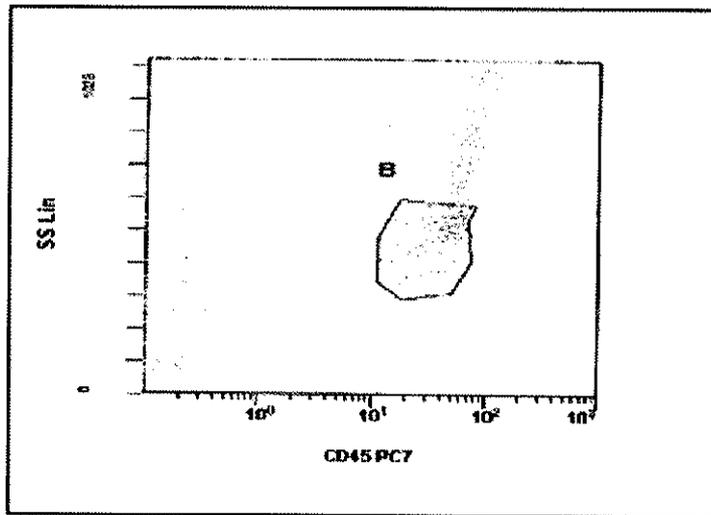
La population monocytaire ainsi isolée est CD14<sup>faible</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD11b<sup>faible</sup>.



Graphiques n° 14, 15 et 16 : Isolement réalisé avec un seul anticorps dirigé contre CD 14

*d. L'isolement avec un anticorps anti-CD14 couplé à un anticorps anti-Tie2*

Avec cette combinaison, la population enrichie est toujours assez pauvre en monocytes :



Graphique n° 17 : Isolement réalisé avec deux anticorps l'un dirigé contre CD14, l'autre dirigé contre Tie2

*e. L'isolement avec un anticorps anti-Tie2 seul*

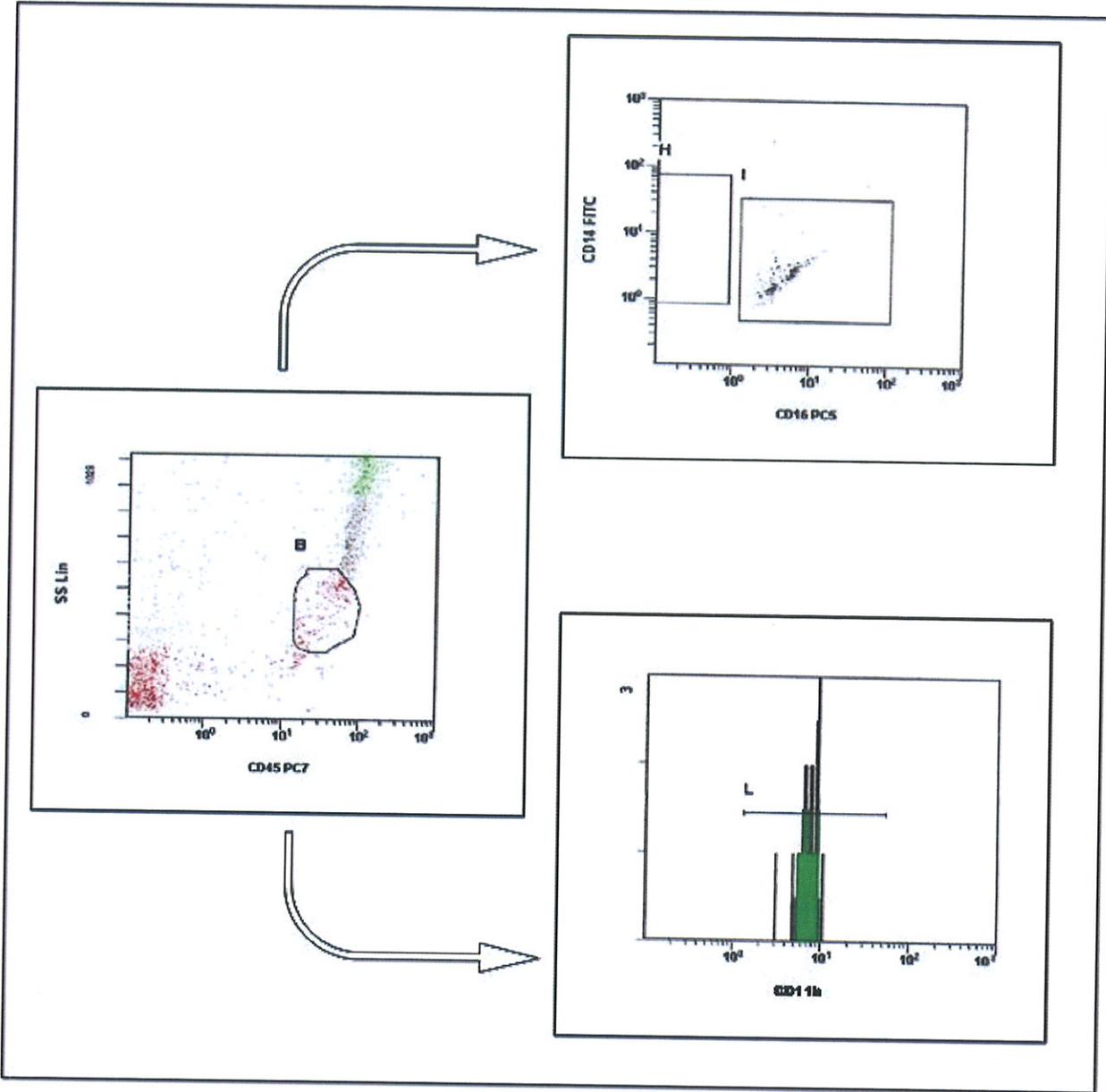
Rappelons que Tie2, le récepteur des angiopoïétines, n'a été décrit que sur les cellules souches hématopoïétiques, les cellules endothéliales, les précurseurs des péricytes et les TEM.

Les graphes suivants nous montrent que :

- bien que nous n'utilisons plus que l'anticorps dirigé contre Tie2 seul, nous isolons également quelques granulocytes,
- notre isolement est un peu plus riche en monocytes que lorsqu'on utilise un anticorps anti-CD14 seul ou associé à l'anticorps anti-Tie2.

Nous avons décidé de poursuivre notre travail en isolant les TEM avec un seul anticorps couplé aux billes magnétiques, celui dirigé contre le récepteur Tie2 seul.

Même si les graphes des isolements CD14 +Tie2 et Tie2 seul paraissent similaires, il nous a semblé plus judicieux de pratiquer l'étape d'isolement avec Tie2 seul. En effet, l'anticorps dirigé contre Tie2 est moins susceptible de se lier à d'autres cellules sanguines.



Graphiques n° 18, 19 et 20 : Isolement réalisé avec uniquement l'anticorps dirigé contre le récepteur Tie2

## IV. La troisième série de manipulations

Nous avons réalisé cette série de manipulations sur cinq témoins et quatre malades atteints de tumeur.

### 1) L'isolement des TEM

La comparaison par analyse cytométrique des différentes combinaisons nous a permis de retenir l'isolement avec l'anticorps anti-Tie2 seul. Nous pouvions espérer que cet isolement sélectionnerait le moins possible de granulocytes et serait plus spécifique encore, étant donné que seuls les précurseurs des péricytes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques sont censés l'exprimer.

### 2) Le choix des amorces

La PCR multiplexe est réalisée avec cinq couples d'amorces permettant d'amplifier les mêmes gènes que précédemment, à l'exception de CXCR4. En effet, dans notre première série de PCR, CXCR4 est très fortement exprimé, aussi bien par les malades que par les témoins. Présent sur la majorité des leucocytes circulants, CXCR4 n'est pas assez spécifique des cellules recherchées.

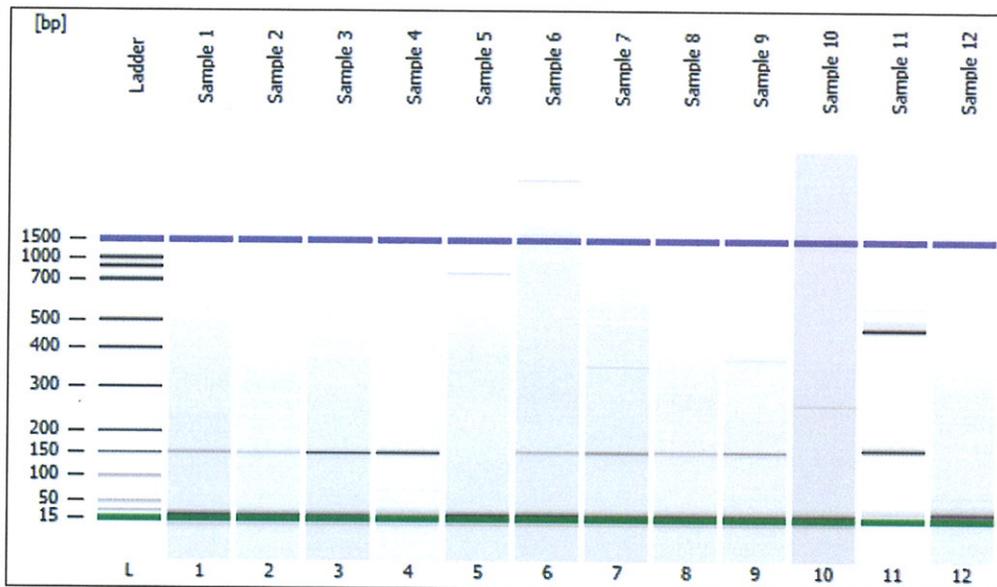
Nous avons donc remplacé le couple d'amorces permettant l'amplification de CXCR4 par un nouveau couple permettant l'amplification du gène de Tie2. Notre nouvelle PCR multiplexe amplifie ainsi :

- $\beta$ -actine (143 pb),
- MMP-9 (231 pb),
- CD11b (358 pb),
- Tie2 (468 pb),
- et VEGFR-1 (553 pb).

### 3) Les résultats de la PCR multiplexe

Nous avons réalisé la migration des produits PCR de notre dernière série de manipulations sur gel d'agarose à 2 % et par électrophorèse capillaire. L'électrophorèse capillaire est une technique plus sensible que la migration sur gel d'agarose classique permettant une semi-quantification plus précise.

Quelque soit la technique de migration utilisée, nous ne pouvons pas noter de différence d'expression de MMP-9, CD11b, Tie2 et VEGFR-1 entre patients et témoins.



Graphique n° 21: Résultats de l'électrophorèse capillaire des produits PCR des 4 malades et 5 témoins après isolement des TEM avec l'anticorps dirigé contre Tie2

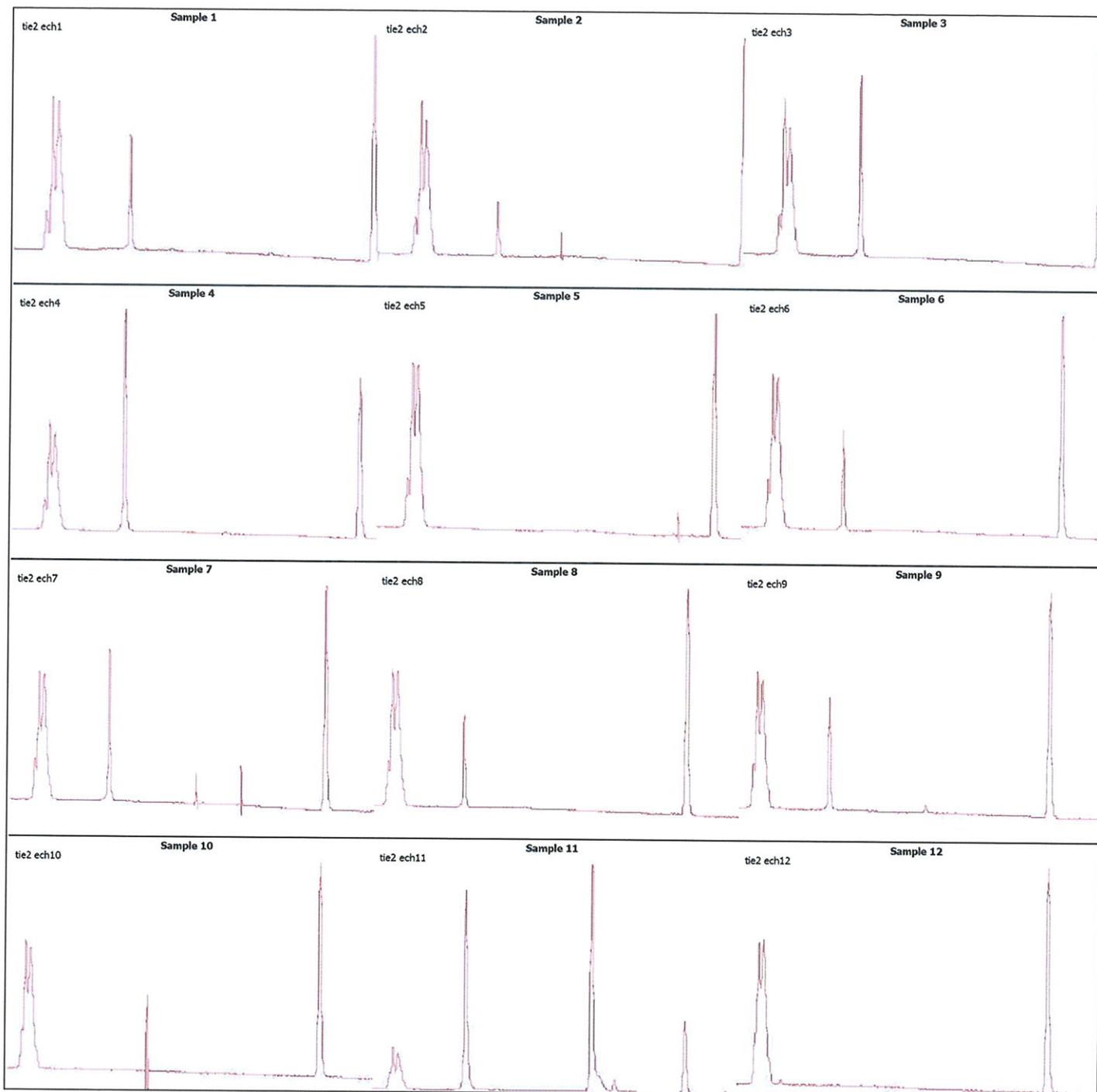
Puits n° 1 à 3 et 9 : patients,

Puits n° 4 et 6 à 8 : témoins,

Puits n° 5 et 10 : contrôles négatifs RT (la bande visible dans le puits n°10 est un artéfact lié au support de migration, un contrôle réalisé sur gel d'agarose classique ne révèle aucune bande),

Puits n°11 : cellules hTERT-HDLEC, constituant un contrôle positif pour l'expression de Tie2 et VEGFR-1,

Puits n°12 : contrôle négatif de la PCR multiplexe.



Graphique n° 22 : Electrophorégramme correspondant à l'électrophorèse précédente (cf. graphique n° 21).

Les résultats d'examens ultérieurs (TEP) ont montré qu'un seul malade souffrait de métastases viscérales. Nous pensons mettre en évidence, chez ce malade, une expression de Tie2 et de CD11b plus forte que chez les témoins et les autres patients. Ce patient aurait également dû présenter une expression de MMP-9 et de VEGFR-1. Chez tous les autres malades, nous aurions dû, comme chez les témoins, détecter au moins l'expression des transcrits Tie2 et CD11b.

## V. Comparaison avec la détection des cellules tumorales circulantes

Afin de vérifier si les résultats décevants obtenus avec notre technique ne sont pas dus à un autre facteur que son manque de spécificité, nous nous sommes livrés à une dernière expérience : un essai de mise en évidence des cellules tumorales circulantes (CTC) chez deux témoins, grâce à un kit commercial fourni par Adnagen®. Les CTC sont des cellules possédant des antigènes de l'organe d'où elles proviennent, et des marqueurs épithéliaux ce qui, a priori, permet de les différencier des autres cellules sanguines.

### 1) Quelques généralités sur les cellules tumorales circulantes (CTC)

Les métastases sont les principales causes de décès des patients atteints de tumeur. Au départ, les cellules cancéreuses de la tumeur primaire acquièrent la capacité d'envahir les tissus et de survivre dans la circulation sanguine en subissant des transformations, en particulier une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) [50].

Les cellules tumorales qui essaient par voie sanguine peuvent se présenter sous deux formes :

- soit seules : ce sont les cellules tumorales circulantes (CTC),
- soit groupées en amas : ce sont les microembols tumoraux circulants (MTC).

#### *a. Les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses*

Les cellules épithéliales, qui jouent un rôle structural et fonctionnel majeur dans les organes, sont adhérentes entre elles grâce à des jonctions cadhérines. Elles adhèrent également à la matrice extracellulaire par des intégrines. Les intégrines et cadhérines sont reliées au cytosquelette cellulaire, une structure rigide, constituée de filaments d'actine et de cytokératine. Donc, dans un épithélium intact, les cellules sont rigides et immobiles.

À l'inverse, les cellules mésenchymateuses (fibroblastes, leucocytes) ont un cytosquelette beaucoup plus souple, peu de jonctions intercellulaires et de molécules de cytokératine, et elles sont mobiles.

#### *b. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)*

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un changement phénotypique au cours duquel les cellules épithéliales tumorales évoluent vers un phénotype mésenchymateux. Ce

changement est à l'origine de la mobilité et de l'invasion d'organes cibles par les cellules tumorales aboutissant à la formation des métastases. Au cours de l'EMT :

- les jonctions intercellulaires se dégradent et les cellules tumorales deviennent mobiles,
- l'expression des marqueurs épithéiaux (cytokératine) diminue,
- alors que l'expression des marqueurs mésenchymateux (vimentine) apparaît.

Parallèlement, il se produit un développement de programmes anti-apoptotiques, évitant la destruction de ces cellules lors de leur passage dans la circulation sanguine.

La transformation des cellules invasives au cours de l'EMT n'est pas intégrale : des marqueurs épithéiaux et mésenchymateux peuvent co-exister sur ces cellules [50, 51].

Lorsque l'organe cible est atteint, les cellules tumorales reprennent un phénotype de cellules épithéiales afin de pouvoir proliférer : c'est la transition mésenchymato-épithéiale.

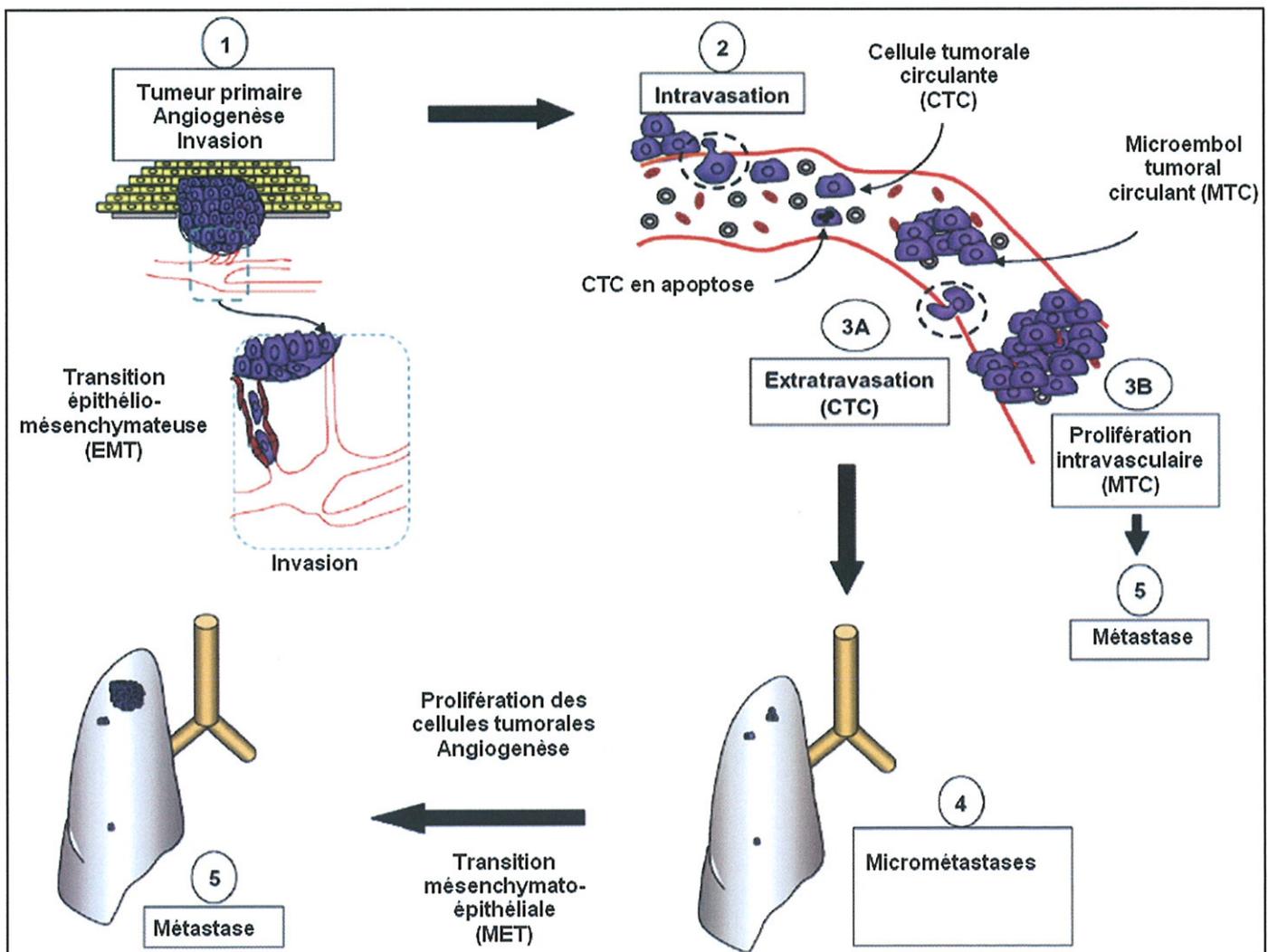


Schéma n° 11 : Les principales étapes aboutissant à la formation des métastases [50]

(1) : Les cellules tumorales qui prolifèrent ont besoin d'oxygène et activent l'angiogenèse. La diminution de l'expression de E-cadhérine réduit leur capacité d'adhésion et accroît leur potentiel invasif. Les cellules tumorales invasives subissent l'EMT : elles perdent progressivement leurs marqueurs épithéliaux, acquièrent des antigènes mésenchymateux et deviennent mobiles.

(2) : après leur passage dans le sang, les cellules tumorales meurent par apoptose ou circulent (elles ne sont pas en cycle cellulaire, donc ne prolifèrent pas).

(3A) : les CTC extravasent dans les organes à distance, où elles entrent en dormance ou forment des micro-métastases.

(5) : les cellules tumorales subissent la MET, prolifèrent et donnent naissance aux métastases.

(3B-5) : les microembols tumoraux circulants sont des amas de cellules tumorales résistantes à l'apoptose, ayant un fort potentiel métastatique et des capacités prolifératives. Les CTC restent dans les capillaires et prolifèrent jusqu'à leur rupture, donnant ainsi naissance aux métastases.

### *c. Les marqueurs des cellules tumorales circulantes*

Les cellules tumorales circulantes peuvent posséder à la fois des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux :

- les antigènes épithéliaux sont sous-exprimés dans les CTC les plus invasives, à cause de l'EMT,
- les antigènes mésenchymateux peuvent être exprimés par les CTC, aussi bien que par des cellules mésenchymateuses non tumorales (en particulier les leucocytes, qui sont beaucoup plus nombreux que les CTC dans le sang).

Donc, il n'existe pas d'antigène spécifique caractérisant les CTC.

## 2) Quelques généralités sur les méthodes de détection des cellules tumorales circulantes (CTC)

L'invasion peut survenir très précocement dans le développement d'une tumeur, ce qui justifie la mise au point de méthodes hautement sensibles et spécifiques pour identifier les CTC au cours des bilans d'extension des tumeurs.

Il existe deux types de techniques de mise en évidence des cellules tumorales circulantes (CTC) :

- des méthodes directes : comme les analyses anatomopathologiques, la FISH (hybridation in situ par fluorescence). Ces techniques sont réalisées avec ou sans enrichissement préalable en cellules tumorales,

- et des méthodes indirectes. Ces dernières utilisent des anticorps dirigés contre les cellules tumorales, et détectent des marqueurs moléculaires : RT-PCR.

*a. Les méthodes indirectes immuno-magnétiques*

La plupart des méthodes immuno-magnétiques utilisent des anticorps dirigés contre des antigènes épithéliaux, qui se lient aux cellules tumorales circulantes, mais aussi à des cellules épithéliales non tumorales. Les anticorps dirigés contre les cytokératines peuvent aussi marquer les macrophages et les précurseurs hématopoïétiques. De plus, en ne ciblant que les cellules tumorales circulantes possédant des marqueurs épithéliaux, il est possible de passer à côté de la détection des cellules tumorales les plus invasives, qui expriment des marqueurs mésenchymateux.

L'isolement des CTC avec des billes immuno-magnétiques marquées piège avec les cellules cibles un grand nombre de leucocytes, ainsi que des cellules non tumorales.

À l'inverse, lorsqu'on utilise des marqueurs spécifiques d'organe, on obtient souvent des faux négatifs, car ces antigènes ne sont pas présents sur toutes les cellules tumorales. Actuellement, aucun anticorps disponible sur le marché n'est spécifique d'une tumeur ou d'un tissu à 100 %.

*b. La RT-PCR dans le cadre de la détection des CTC*

Le plus gros avantage de cette technique est sa sensibilité. Elle peut détecter une cellule cible sur  $10^7$  cellules normales (soit environ une cellule dans 1 mL de sang). Cette très grande sensibilité peut même présenter un inconvénient : en particulier, la RT-PCR peut détecter une expression non spécifique de marqueurs épithéliaux dans les cellules mésenchymateuses [51].

Le principal défaut de la RT-PCR est qu'elle détruit les cellules, ce qui empêche de les compter ou de les analyser individuellement. L'intensité mesurée lors de la PCR dépend de la sensibilité du test et de la quantité de sang testée.

Un autre défaut réside dans le choix des gènes à étudier : il faut avoir le moins possible de faux positifs (par exemple, Muc-1 est exprimé dans les leucocytes, Her-2 chez 10 % des femmes indemnes de tumeur mammaire). Le marqueur idéal serait un transcrite exprimé par toutes les cellules tumorales d'une tumeur donnée, mais non exprimé ailleurs, en particulier dans les leucocytes ou les autres cellules épithéliales non tumorales. Les méthodes utilisant la RT-PCR ciblent des marqueurs épithéliaux ou spécifiques d'organes, sans avoir de preuve qu'elles identifient bien les cellules tumorales et pas des cellules normales qui expriment ces

marqueurs. Par exemple, les leucocytes activés, qui sont plus nombreux chez les patients souffrant de tumeur, peuvent exprimer des marqueurs des CTC.

### 3) La méthode de détection des cellules tumorales circulantes du kit AdnaGen®

L'équipe de *Zieglschmid et al.* a mis au point une technique de détection des CTC dans plusieurs types de tumeurs solides (sein, colon) combinant [51] :

- une étape d'enrichissement en CTC grâce à des billes magnétiques couplées à plusieurs anticorps, dirigés à la fois contre des antigènes de surface tissulaires et épithéliaux, ce qui augmente sa sensibilité sans modifier sa spécificité,
- suivie de l'extraction des ARNm des cellules piégées,
- puis d'une transcription reverse,
- et d'une PCR multiplexe permettant de cibler deux ou trois gènes associés aux tumeurs et un gène de contrôle ( $\beta$ -actine). En effet, les cellules tumorales constituent une population hétérogène qui n'exprime ni les mêmes marqueurs de surface, ni les mêmes mutations, ni les mêmes gènes.

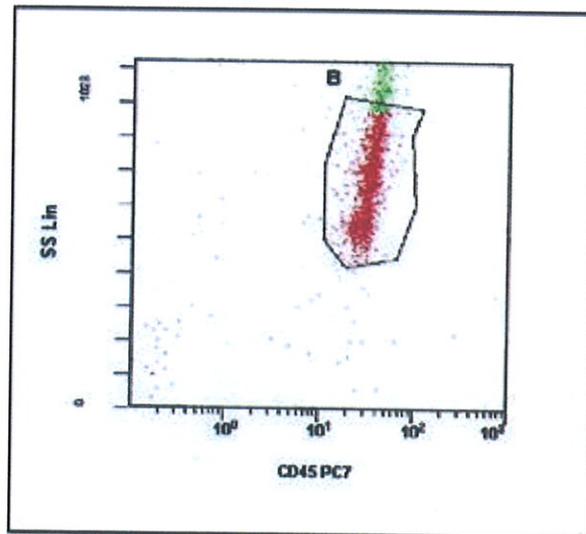
Les effets sur la sensibilité de la détection des CTC d'un isolement réalisé avec un seul ou plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs des CTC ont été comparés par RT-PCR. En particulier, la sensibilité augmente avec le nombre d'anticorps utilisés : le fait de combiner plusieurs anticorps permet de les potentialiser.

#### *a. L'isolement des cellules tumorales circulantes avec les anticorps fournis par le kit AdnaGen®*

Nous avons étudié la qualité de l'isolement des CTC dérivées des tumeurs du sein avec les anticorps fournis par le kit Adna Breast Cancer Select (AdnaGen®). Ces anticorps sont dirigés contre des antigènes des cellules épithéliales et du tissu mammaire, on ne connaît pas leur nature exacte.

Du sang est prélevé sur tube EDTA chez deux témoins indemnes de pathologie tumorale et analysé dans les quatre heures. Les CTC sont isolées en suivant les indications du protocole fourni par le kit.

Les cellules isolées sont ensuite étudiées en cytométrie de flux : nous avons réalisé un simple marquage CD45-PC7, car il nous importe seulement de savoir si des leucocytes sont isolés avec les CTC.



Graphe n° 23 : Isolement des CTC avec les anticorps fournis par le kit Adnagen®

Cet histogramme nous montre que l'isolement des CTC avec la combinaison d'anticorps fournie par kit n'est pas aussi spécifique que nous l'espérons : ces anticorps entraînent aussi le recueil d'un grand nombre de polynucléaires. Il s'agit plutôt d'un enrichissement en cellules tumorales que d'un tri.

Cette expérience permet de valider l'étape d'isolement de la technique de détection des cellules accessoires et des TEM que nous avons mise au point. En effet, les histogrammes obtenus par cytométrie de flux permettent de constater que les anticorps utilisés pour l'isolement des CTC ne sont pas plus spécifiques que la plupart des combinaisons d'anticorps que nous avons testées afin de mettre en évidence les cellules accessoires et les TEM.

*b. La RT-PCR du kit Adnagen®*

Afin d'obtenir les ADNc des isolats cellulaires des deux témoins, nous avons réalisé :

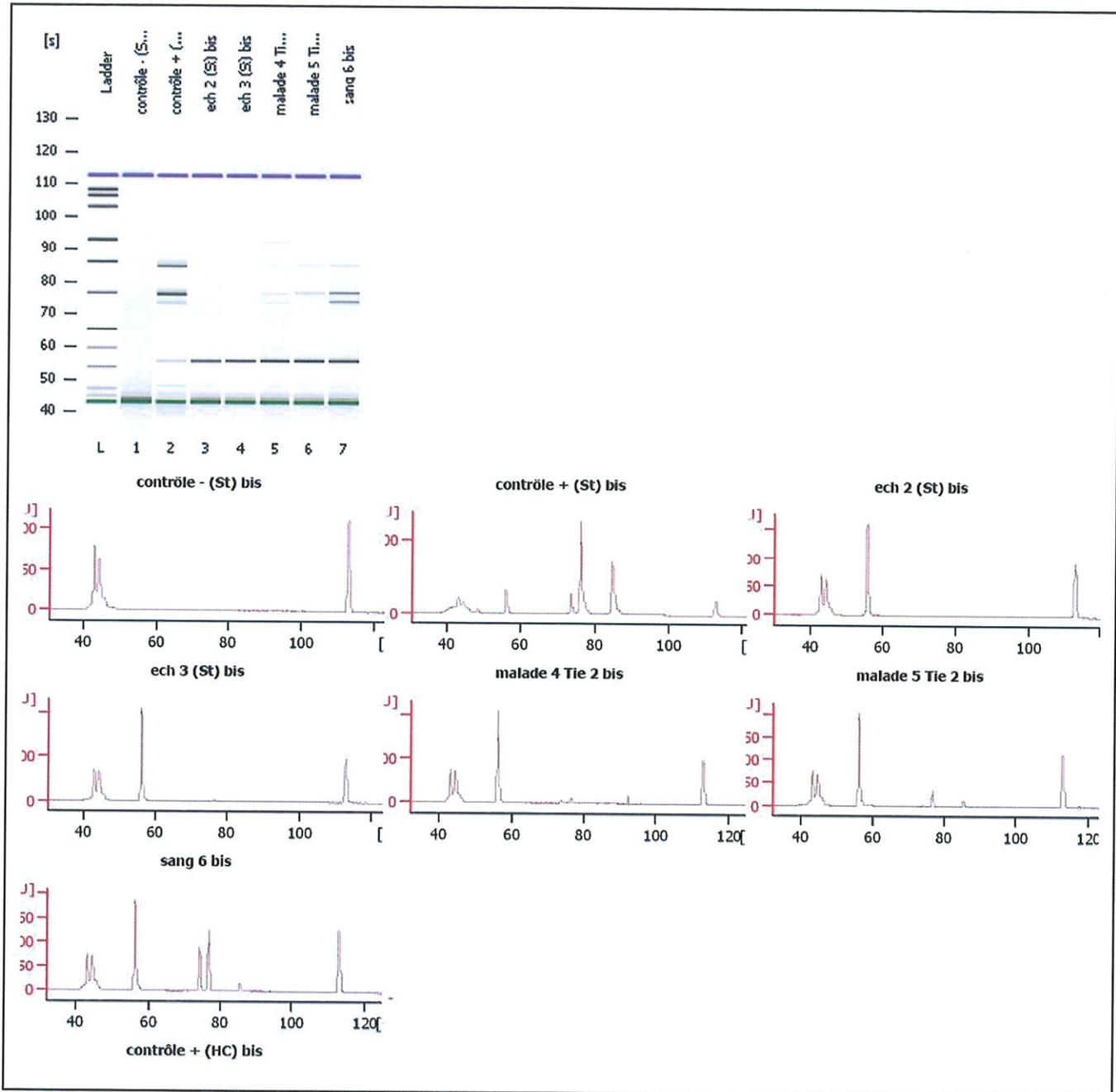
- une extraction des ARNm : selon le protocole du kit Dynabeads mRNA direct Micro Kit®,
- immédiatement suivie par une transcription reverse selon les instructions du kit Sensiscript Reverse Transcriptase (Qiagen®).

La PCR multiplexe du kit Adna Test Breast Cancer Detect permet d'amplifier trois transcrits associés aux tumeurs du sein (GA 733-2 : 383 pb, Muc-1 : 293 pb, Her-2 : 270 pb) et le gène de la  $\beta$ -actine (contrôle interne : 114 pb). Elle est réalisée en utilisant le kit HotStarTaq Master Mix (Qiagen®), et testée sur :

- les ADNc des deux témoins,

- les ADNc de deux patients obtenus après isolement avec la combinaison anti-CD11b/anti-Tie2/anti-VEGFR-1, lors de la première série de manipulations. Il s'agissait d'une patiente souffrant d'une tumeur mammaire métastasée au poumon et d'un patient atteint d'une tumeur colique métastasée au foie,
- et l'ADNc des leucocytes obtenus grâce à une centrifugation sur gradient de Ficoll qui a servi à la mise au point des PCR multiplexes.

Les produits PCR ont ensuite été analysés par électrophorèse capillaire Bioanalyser 2100 (Agilent®).



Graphique n° 24 : Résultats de l'électrophorèse capillaire des produits PCR

Puits n° 1 : contrôle négatif PCR,

Puits n° 2 : contrôle positif fourni par le kit

Puits n° 3 et 4 : témoins

Puits n° 5 et 6 : les deux patients testés

Puits n° 7 : leucocytes.

Les résultats de la PCR ne nous montrent :

- aucune expression anormale de l'un des trois transcrits associé aux tumeurs du sein chez nos deux témoins sains,
- aucune expression de ces mêmes transcrits avec l'ADNc de la patiente atteinte de cancer du sein : soit la combinaison d'anticorps utilisée pour isoler les cellules tumorales et les TEM n'a pas piégé de façon non spécifique quelques cellules tumorales, soit cette patiente n'avait pas de CTC,
- aucune expression chez le patient souffrant d'une tumeur colique.

En revanche, on observe l'expression de deux des trois transcrits associés aux tumeurs du sein (Muc-1 et Her-2) sur l'ADNc obtenu à partir de leucocytes circulants, sans isolement préalable. Ce résultat correspond :

- soit à un faux positif : ces deux transcrits peuvent être exprimés par les leucocytes [50], d'autant plus que les cellules n'ont pas été triées préalablement,
- soit à la mise en évidence de cellules tumorales circulantes.

En conséquence, il est nécessaire d'effectuer un tri des CTC préalablement à la RT-PCR. Il s'agit en fait d'un enrichissement en CTC qui manque de spécificité, mais suffit à éliminer les cellules sanguines exprimant les mêmes transcrits que ceux recherchés par la RT-PCR du kit. Celle-ci est donc spécifique des cellules tumorales circulantes.

## **PARTIE IV : DISCUSSION**

Nous avons essayé de mettre en évidence la présence de TEM et de cellules accessoires dans le sang de témoins et de patients, par une technique non invasive combinant enrichissement immunomagnétique et RT-PCR multiplexe. Aucune des trois séries de manipulations ne nous ayant donné entièrement satisfaction, nous nous sommes intéressés aux possibles défauts de cette technique. A l'origine, le manque de marqueurs spécifiques des cellules que nous recherchions paraissait être une difficulté cruciale.

La technique que nous avons essayé de mettre au point est déjà utilisée pour la détection de cellules tumorales circulantes (CTC). Celles-ci sont théoriquement plus faciles à isoler, puisqu'elles possèdent des marqueurs de l'organe d'où elles proviennent, et des marqueurs épithéliaux. Pour pouvoir affirmer que le principal problème de la technique d'isolement des cellules accessoires et des TEM est bien son manque de spécificité, il nous a semblé intéressant de la comparer avec un essai de mise en évidence des CTC, grâce à un kit commercial fourni par AdnaGen®.

Nous terminerons cette partie en proposant des pistes d'amélioration pour la détection des TEM et des cellules accessoires, et en dressant quelques perspectives intéressantes pour le diagnostic et le suivi des patients atteints de maladies cancéreuses.

## I. Bilan des différentes manipulations

### 1) Un problème de spécificité lors de l'isolement

Une des difficultés de la mise au point d'une technique permettant la détection des cellules accessoires et des TEM est liée à leur origine hématopoïétique. En effet, elles circulent déjà dans le sang en l'absence de situation pathologique.

Il faut donc mettre en évidence :

- soit une augmentation de leur nombre,
- soit une augmentation de l'expression de certains de leur gènes impliqués dans l'angiogenèse tumorale chez des malades par rapport à des sujets sains.

L'isolement ne peut pas être spécifique : les marqueurs exprimés par les cellules accessoires et les TEM le sont aussi par d'autres cellules hématopoïétiques. C'est en fait une combinaison de plusieurs récepteurs de surface qui les définit. Comme nous l'avons vu, le choix des anticorps permettant de les isoler a été difficile. Ceci a été réalisé en fonction des publications existantes sur le sujet, peut-être existe-t-il d'autres marqueurs plus spécifiques mais pas encore décrits pour ces cellules. Il est possible qu'un autre choix de combinaisons permette une meilleure sélection.

#### *a. Lors de l'utilisation de la double combinaison d'anticorps*

Avec l'utilisation de deux combinaisons d'anticorps différentes, nous avons pu mettre en évidence la présence de cellules exprimant CD11b, CXCR4 et MMP-9, à la fois chez les témoins et chez les malades. De plus, il nous a semblé que ces cellules exprimaient bien MMP-9 de façon plus intense dans le groupe des malades, même si nous n'avons pu valider statistiquement ce constat sur l'échantillon étudié. C'était l'une des hypothèses communes à *Kaplan et al.* [25] et à *Yang L. et al.* [23] (les cellules accessoires isolées chez les patients atteints de tumeurs produisent plus de MMP-9 et de pro-MMP-9).

La mise en évidence d'une relation croissante entre la quantité de MMP-9 et celle de CD11b, indique, de façon théorique, que l'expression de CD11b devrait elle aussi être plus marquée chez les malades. Cette hypothèse n'est toutefois pas vérifiée sur l'échantillon étudié.

Enfin, dans le groupe de malades, nous n'avons pas pu établir de lien entre l'intensité de l'expression de nos quatre gènes d'intérêt et la gravité de l'envahissement tumoral.

L'isolement des cellules accessoires et des TEM avec la présence de l'anticorps anti-CD11b dans chaque combinaison nous a alors fait craindre un recueil trop important de cellules

granulo-monocytaires. Nous avons donc décidé de ne plus l'utiliser pour la suite de notre travail.

D'autre part, l'absence d'expression du récepteur VEGFR-1 dans les cellules isolées aussi bien chez les malades que chez les témoins, nous a posé le problème de la spécificité de nos enrichissements cellulaires.

*b. Lors des analyses par cytométrie de flux*

L'analyse par cytométrie de flux des cellules isolées avec différentes combinaisons a confirmé leur manque de spécificité, et nous a permis de sélectionner l'anticorps le plus spécifique.

*c. Lors de l'isolement réalisé avec l'anticorps dirigé contre Tie2 seul*

A l'occasion de cette série de manipulations, nous avons constaté que le fait d'augmenter le nombre d'anticorps utilisés est ambivalent.

- L'étude réalisée par l'équipe de *Zieglschmid et al.* tend à montrer que la combinaison de plusieurs marqueurs, même non spécifiques, a un effet synergique sur la sensibilité d'une technique [51]. En effet, dans la série de manipulations, réalisée en isolant les TEM avec un seul anticorps dirigé contre Tie2 (qui semble être le plus spécifique des TEM), nous avons obtenu des résultats peu discriminants.
- Cependant, le fait d'utiliser plus d'anticorps peut également se traduire par une perte de spécificité, puisqu'on sélectionne alors toutes les cellules qui possèdent au moins l'un des antigènes qui interviennent dans la combinaison.

*d. Comparaison de nos isolements avec ceux obtenus grâce au kit Adnagen®*

Les cellules tumorales circulantes et les cellules accessoires constituent toutes deux des populations hétérogènes, ne possédant pas de marqueurs spécifiques.

La comparaison de la technique de détection des cellules tumorales circulantes de *Zieglschmid et al.*, avec la technique que nous avons essayé de mettre au point pour rechercher les cellules accessoires et les TEM, nous montre que la première est spécifique, l'autre non.

Dans le cas des CTC, qui ne sont pas des cellules d'origine hématopoïétique, il est plus efficace d'utiliser des marqueurs peu exprimés par les cellules sanguines.

L'équipe de *Zieglschmid et al.*, en associant plusieurs marqueurs non spécifiques, est parvenue à détecter jusqu'à deux cellules tumorales dans 5 mL de sang [51]. Cette très forte sensibilité a été obtenue grâce au protocole suivant :

- un nombre donné de cellules issues de lignées tumorales (2, 5, 10, 100) est mélangé à 5 mL de sang d'un témoin,
- la sensibilité de la détection des CTC est ensuite testée avec une combinaison de trois anticorps, puis avec chaque anticorps séparément. Le taux de détection de l'association des trois anticorps est supérieur à la somme des taux de détection de chaque anticorps seul.

La PCR Adnagen® semble plus spécifique que celles de nos différents essais de mise au point : elle amplifie des marqueurs tissulaires ou épithéliaux peu retrouvés dans le sang après enrichissement en CTC.

## 2) Un problème de spécificité de la PCR

En ce qui concerne les différentes PCR qui ont été mises au point, un des problèmes, là aussi, est l'absence de gènes spécifiquement exprimés par les cellules accessoires ou les TEM. Or, au cours des manipulations, nous n'avons pas pu déceler de surexpression significative de l'un des transcrits chez les malades par rapport aux témoins. Une trop grande sensibilité de la PCR a peut-être insuffisamment fait ressortir les différences entre les deux groupes.

Le résultat de la troisième série de manipulations est particulièrement décevant puisque, partant d'un isolement réalisé avec l'anticorps anti-Tie2, nous n'avons pas pu retrouver l'expression de Tie2 lors de la PCR. Les cellules exprimant Tie2 sont peut-être trop peu nombreuses dans notre isolement cellulaire.

Dans tous les cas, ce résultat met clairement en relief le manque de spécificité de notre PCR multiplexe.

## 3) Les limites de la cytométrie de flux

La cytométrie de flux permet de mettre en évidence de façon certaine les cellules accessoires et les TEM. L'avantage de cette technique est de pouvoir effectuer un marquage rapide des cellules d'intérêt avec plusieurs anticorps, chacun couplé à un fluorochrome différent. Il est ainsi possible de réaliser un fenêtrage au niveau de la population d'intérêt et d'y étudier l'intensité d'expression de tous les antigènes contre lesquels sont dirigés les anticorps. C'est pourquoi la plupart des équipes l'utilisent [15, 17, 23, 24, 25, 26, 38, 40].

Toutefois, cette technique présente un inconvénient majeur : elle n'autorise pas l'extraction de l'ARNm des cellules cibles, et ne permet donc pas d'étudier l'intensité d'expression des transcrits.

#### 4) Un échantillon de patients trop réduit

##### *a. Lors de l'isolement avec la double combinaison d'anticorps*

Quelques différences d'expression ont bien été constatées entre malades et témoins, notamment dans l'expression du gène CD11b. Cependant, les écarts sont trop peu marqués pour conclure à une différence statistiquement significative entre les deux groupes.

La taille insuffisante de notre échantillon de patients semble ici à incriminer. Elle est à mettre en relation avec la difficulté de recruter des malades, et l'obligation de faire une utilisation raisonnable des anticorps, en raison de leur coût très élevé.

##### *b. Lors de l'isolement avec l'anticorps dirigé contre Tie2*

Au moment de cette série de manipulations, nous n'avons pu réunir qu'un échantillon de malades de taille encore plus réduite : seulement quatre. Chez ces quatre malades, les antécédents laissaient supposer que la maladie était évolutive. Toutefois, au moment de tester la technique, l'état d'envahissement précis des tumeurs chez les patients nous était inconnu ; en effet, nous ne disposions pas encore des résultats de la TEP. Or, ceux-ci ont montré que, parmi les malades :

- un patient était en rémission complète,
- deux n'étaient atteints que par des métastases ganglionnaires,
- un seul présentait des métastases évolutives viscérales.

Notre échantillon n'était donc pas idéal, la maladie n'étant pas suffisamment avancée chez les malades sélectionnés.

## II. Perspectives

### 1) Quelques pistes d'amélioration

Les résultats obtenus doivent être analysés en fonction de la faible taille des échantillons. La mise en évidence des cellules recherchées, et surtout l'étude précise de la corrélation avec la clinique, passent par le suivi d'un plus grand nombre de malades.

Par ailleurs, la comparaison systématique de deux groupes de patients, témoins et malades, montre ici ses limites. En l'absence de détermination d'un seuil de positivité permettant de faire la distinction entre ces deux groupes, il serait intéressant d'étudier les variations de l'expression des différents marqueurs chez un même malade au diagnostic, après traitement, puis de façon régulière.

Il faudrait enfin effectuer la comparaison du taux des cellules accessoires avec l'évolution du taux des CTC, et des marqueurs tumoraux classiquement utilisés pour prédire un envahissement métastatique (par exemple : ACE et CA 19-9 dans le cas des tumeurs coliques, CA 15-3 pour les cancers du sein).

### 2) Impact thérapeutique

Les cellules accessoires et les TEM sont présents sur le lieu des futures métastases avant l'arrivée des cellules tumorales [7, 25]. Leur mise en évidence traduirait :

- le potentiel invasif d'une tumeur plus précocement que la détection des CTC et que tous les marqueurs utilisés actuellement ; leur détection offrirait une indication pronostique très intéressante pour le clinicien,
- la possibilité de mettre en place un traitement efficace avant que les cellules de la tumeur primaire n'essaient par voie sanguine.

La mise en évidence des cellules accessoires et TEM ouvre donc de nouvelles voies. Les études concernant les TEM et les cellules accessoires sont loin d'être closes, les perspectives thérapeutiques étant particulièrement prometteuses. Des molécules bloquant le recrutement des cellules accessoires et des TEM par la tumeur auraient pour effet d'inhiber l'angiogenèse tumorale. Elles pourraient être associées aux traitements classiques (molécules anti-angiogéniques déjà existantes et chimiothérapies). D'où l'importance de mieux caractériser et isoler ces cellules, afin de développer des molécules qui pourraient être d'une aide précieuse dans le combat contre la maladie cancéreuse.

## CONCLUSION

Les cellules accessoires et les TEM sont des marqueurs très précoces des métastases, plus précoces encore que les cellules tumorales circulantes. Ces cellules pourraient être d'un intérêt déterminant pour la détection, le suivi et la prise en charge des cancers.

Toutefois, malgré les publications disponibles sur le sujet, la description des cellules accessoires comme celle des TEM ne fait pas consensus et leur connaissance reste encore incomplète. L'éventuelle découverte de transcrits spécifiques de ces cellules serait un grand pas en avant. Pour l'heure, les techniques de détection et d'analyse, basées sur l'utilisation de combinaisons d'anticorps, manquent encore de spécificité. Nous avons pu le vérifier à l'occasion de nos manipulations.

La méthode choisie était similaire à une technique mise en œuvre pour la détection des cellules tumorales circulantes. Les difficultés rencontrées lors de l'isolement, puis lors de l'amplification des différents gènes recherchés, montrent que cette méthode n'est pas transposable aisément à la détection des cellules accessoires et des TEM. Le choix délicat des anticorps et des transcrits, la faible spécificité de nos isolements comme celle des transcrits que nous avons sélectionnés, n'ont conduit qu'à une faible corrélation de nos résultats avec la clinique observée chez les malades. Le travail réalisé ici pourrait toutefois être poursuivi et amélioré : l'une des pistes à explorer passe par le suivi à long terme d'un plus grand échantillon de patients.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Carmeliet P.** Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003 Jun;9(6):653-60.
2. **Pepper M.** Angiogenèse et morphogénèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique. *Médecine/Sciences*. 2000;16:1378-86.
3. **Folkman J.** What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*. 1990 Jan 3;82(1):4-6.
4. **Vandembunder B.** Angiogenèse et remodelage vasculaire au début du développement tumoral. *Médecine/Sciences*. 2000;16:281-3.
5. **Ruiz de Almodovar C, Luttun A, Carmeliet P.** An SDF-1 trap for myeloid cells stimulates angiogenesis. *Cell*. 2006 Jan 13;124(1):18-21.
6. **Bergers G, Benjamin LE.** Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews*. 2003 Jun;3(6):401-10.
7. **Dutour A.** Application d'une stratégie de thérapie génique antiangiogénique non virale sur un modèle d'ostéosarcome orthoptique chez le rat immunocompétent. Thèse de doctorat d'université. Limoges : Université de Limoges, 2003, 263p.
8. **Mattot V, Pourtier A, Soncin F, Vandembunder B.** La morphogénèse de l'arbre vasculaire. *De la compréhension des mécanismes moléculaires aux perspectives thérapeutiques*. *Médecine/Sciences*. 1998;14:437-47.
9. **Vandembunder B.** Actualités sur l'angiogenèse. *Bulletin du cancer*. 1999;86(1):29-36.
10. **Red-Horse K, Ferrara N.** Imaging tumor angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2006 Oct;116(10):2585-7.
11. **Ferrara N, Kerbel RS.** Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):967-74.
12. **De Palma M, Naldini L.** Role of haematopoietic cells and endothelial progenitors in tumour angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2006 Aug;1766(1):159-66.
13. **Lewis CE, Pollard JW.** Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer research*. 2006 Jan 15;66(2):605-12.

14. **Schmid MC, Varner JA.** Myeloid cell trafficking and tumor angiogenesis. *Cancer letters*. 2007 May 18;250(1):1-8.
15. **Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, et al.** Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5276-85.
16. **Lewis CE, De Palma M, Naldini L.** Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer research*. 2007 Sep 15;67(18):8429-32.
17. **Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE.** Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):7405-11.
18. **Jin H, Su J, Garmy-Susini B, Kleeman J, Varner J.** Integrin alpha4beta1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors. *Cancer research*. 2006 Feb 15;66(4):2146-52.
19. **Coussens LM, Werb Z.** Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7.
20. **Condeelis J, Pollard JW.** Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):263-6.
21. **De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, et al.** Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer cell*. 2005 Sep;8(3):211-26.
22. **De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L.** Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nature medicine*. 2003 Jun;9(6):789-95.
23. **Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, et al.** Expansion of myeloid immune suppressor Gr<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer cell*. 2004 Oct;6(4):409-21.
24. **Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, et al.** Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4<sup>+</sup> hemangiocytes. *Nature medicine*. 2006 May;12(5):557-67.
25. **Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al.** VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005 Dec 8;438(7069):820-7.

26. **Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, et al.** VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006 Jan 13;124(1):175-89.
27. **Takakura N.** Role of hematopoietic lineage cells as accessory components in blood vessel formation. *Cancer science*. 2006 Jul;97(7):568-74.
28. **Leclers D.** Conception de récepteurs circulants anti-lymphangiogénique par clonage de la séquence codante du gène humain VEGFR-3. Application en cancérologie. Thèse de doctorat d'université. Limoges : Université de Limoges, 2005, 273 p.
29. **Okazaki T, Ebihara S, Asada M, Kanda A, Sasaki H, Yamaya M.** Granulocyte colony-stimulating factor promotes tumor angiogenesis via increasing circulating endothelial progenitor cells and Gr1+CD11b+ cells in cancer animal models. *International immunology*. 2006 Jan;18(1):1-9.
30. **Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS.** The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nature reviews*. 2006 Nov;6(11):835-45.
31. **Dignat-George F, Sampol J, Lip G, Blann AD.** Circulating endothelial cells: realities and promises in vascular disorders. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*. 2003 Sep-2004 Dec;33(5-6):495-9.
32. **Goon PK, Boos CJ, Stonelake PS, Lip GY.** Circulating endothelial cells in malignant disease. *Future oncology (London, England)*. 2005 Dec;1(6):813-20.
33. **Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, Erdbruegger U, Banzet N, Haubitz M, et al.** Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost*. 2006 Mar;4(3):671-7.
34. **Bertolini F, Mancuso P, Shaked Y, Kerbel RS.** Molecular and cellular biomarkers for angiogenesis in clinical oncology. *Drug discovery today*. 2007 Oct;12(19-20):806-12.
35. **Kopp HG, Ramos CA, Rafii S.** Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Current opinion in hematology*. 2006 May;13(3):175-81.
36. **Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, et al.** Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes & development*. 2007 Jun 15;21(12):1546-58.
37. **Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.** The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003 Jun;9(6):669-76.

38. **Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al.** Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature medicine*. 2001 Nov;7(11):1194-201.
39. **de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT.** The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science (New York, NY)*. 1992 Feb 21;255(5047):989-91.
40. **Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, et al.** Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature medicine*. 2002 Aug;8(8):841-9.
41. **Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al.** Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology*. 2000 Oct;2(10):737-44.
42. **Nassare P, Constantin B, Drabkin H, Roche J.** Sémaphorines et cancer : état des lieux. *Médecine/Sciences*. 2005;21:641-7.
43. **Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, Takahashi N, Sano H, Suda T, et al.** Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2757-63.
44. **Alitalo K, Tammela T, Petrova TV.** Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):946-53.
45. **Burger JA, Kipps TJ.** CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):1761-7.
46. **Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al.** Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2005 Aug;23(7):879-94.
47. **Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, et al.** MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer cell*. 2002 Oct;2(4):289-300.
48. **Rafii DC, Psaila B, Butler J, Jin DK, Lyden D.** Regulation of vasculogenesis by platelet-mediated recruitment of bone marrow-derived cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008 Feb;28(2):217-22.
49. **Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al.** Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002 May 31;109(5):625-37.

50. **Paterlini-Brechot P, Benali NL.** Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer letters*. 2007 Aug 18;253(2):180-204.
51. **Zieglschmid V, Hollmann C, Gutierrez B, Albert W, Strothoff D, Gross E, et al.** Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells. *Anticancer research*. 2005 May-Jun;25(3A):1803-10.
52. **Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G, et al.** Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol*. 1997 Jul;15(7):2701-8.

# SERMENT D'HIPPOCRATE

---

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.



---

## **RÉSUMÉ**

Les cellules accessoires et les monocytes / macrophages exprimant le récepteur Tie2 (TEM) constituent une population hétérogène de cellules d'origine myéloïde présentes physiologiquement dans le sang. Cellules régulatrices clés de l'angiogenèse tumorale, elles sont attirées vers les zones hypoxiques par différentes substances sécrétées par les cellules périvasculaires. Elles sécrètent de nombreux facteurs proangiogéniques activant la multiplication des cellules endothéliales et le recrutement d'autres cellules accessoires.

Les cellules accessoires et les TEM sont présents sur les lieux des futures métastases d'une tumeur, avant même l'arrivée des cellules tumorales. Une meilleure connaissance de ces cellules permettrait de développer de nouveaux traitements antiangiogéniques, qui agiraient avant l'apparition des métastases. Mais il n'a pas encore été décrit de marqueur spécifique de ces cellules, ce qui rend difficile leur mise en évidence. Afin de mieux caractériser les cellules accessoires et les TEM, nous avons essayé d'adapter une technique combinant un enrichissement immunomagnétique et une RT-PCR multiplexe, méthode qui a montré son efficacité pour la mise en évidence des cellules tumorales circulantes. Nous avons ensuite comparé l'intensité d'expression de certains marqueurs des cellules accessoires et des TEM dans un groupe de malades et un groupe de témoins.

---

**DISCIPLINE** : Médecine

---

**MOTS-CLÉS** : Angiogenèse tumorale, cellules accessoires, monocytes exprimant le récepteur Tie2 (TEM), métastase, enrichissement immunomagnétique.

---

**LABORATOIRE DE BIOCHIMIE MÉDICALE**  
**FACULTÉ DE MÉDECINE**

2, rue du docteur Marcland  
87025 Limoges Cedex

---

## **RÉSUMÉ**

Les cellules accessoires et les monocytes / macrophages exprimant le récepteur Tie2 (TEM) constituent une population hétérogène de cellules d'origine myéloïde présentes physiologiquement dans le sang. Cellules régulatrices clés de l'angiogenèse tumorale, elles sont attirées vers les zones hypoxiques par différentes substances sécrétées par les cellules périovasculaires. Elles sécrètent de nombreux facteurs proangiogéniques activant la multiplication des cellules endothéliales et le recrutement d'autres cellules accessoires.

Les cellules accessoires et les TEM sont présents sur les lieux des futures métastases d'une tumeur, avant même l'arrivée des cellules tumorales. Une meilleure connaissance de ces cellules permettrait de développer de nouveaux traitements antiangiogéniques, qui agiraient avant l'apparition des métastases. Mais il n'a pas encore été décrit de marqueur spécifique de ces cellules, ce qui rend difficile leur mise en évidence. Afin de mieux caractériser les cellules accessoires et les TEM, nous avons essayé d'adapter une technique combinant un enrichissement immunomagnétique et une RT-PCR multiplexe, méthode qui a montré son efficacité pour la mise en évidence des cellules tumorales circulantes. Nous avons ensuite comparé l'intensité d'expression de certains marqueurs des cellules accessoires et des TEM dans un groupe de malades et un groupe de témoins.

---

**DISCIPLINE :** Médecine

---

**MOTS-CLÉS :** Angiogenèse tumorale, cellules accessoires, monocytes exprimant le récepteur Tie2 (TEM), métastase, enrichissement immunomagnétique.

---

**LABORATOIRE DE BIOCHIMIE MÉDICALE**

**FACULTÉ DE MÉDECINE**

2, rue du docteur Marcland  
87025 Limoges Cedex