

Université de Montréal

Empéripolèse des cellules de lymphome humain Ramos par les fibroblastes

par

Nadia Oualha

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en sciences biomédicales

option générale

Décembre, 2013

© Nadia Oualha, 2013

Résumé

Empéripolèse des cellules de lymphome humain RAMOS par les fibroblastes

Mots-clés : Empéripolèse, cellules de lymphome, microenvironnement tumoral, stroma tumoral, fibroblastes associés au cancer (CAFs), vimentine, intégrine $\alpha_4\beta_1$, VCAM-1, migration transcellulaire.

Les fibroblastes (Fbs) constituent le type cellulaire dominant du stroma tumoral. Une vision "cafocentrique" du microenvironnement tumoral (MET) soutient que les interactions dynamiques et réciproques entre les cellules tumorales et les "*cancer-associated fibroblasts*" (CAFs) favoriseraient le potentiel métastatique des cellules tumorales. Notre principale hypothèse soutient qu'une interaction physique directe entre les cellules tumorales et les CAFs au sein du stroma tumoral est non seulement possible grâce au couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 mais qu'elle pourrait éventuellement constituer une cible thérapeutique de choix. Grâce à la cytofluorométrie et aux anticorps bloquants, nous avons montré que des cellules de lymphome humain Ramos sont capables d'interagir avec les Fbs, que cette interaction est modulable et qu'elle implique le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. Une augmentation dose-dépendante de cette interaction ainsi que du niveau d'expression de VCAM-1 après une stimulation préalable des Fbs par le TNF- α ont été observés. Ce résultat a été confirmé par la surexpression de VCAM-1 par transfection. Des analyses par microscopie confocale ont révélé que les Ramos sont internalisés dans le cytoplasme des Fbs, phénomène connu sous le nom d'empéripolèse et qui correspond en partie à de la migration transcellulaire. Une colocalisation de la sous-unité α_4 de $\alpha_4\beta_1$ et de VCAM-1 à la jonction d'adhésion des Ramos aux Fbs ainsi que l'implication de la vimentine au niveau des cônes de migration ont été observées. La vidéomicroscopie a confirmé ce processus cellulaire actif. Finalement, un modèle mimétique de billes fluorescentes de polystyrène tapissées de $\alpha_4\beta_1$ a confirmé les précédents résultats. Cette étude révèle que les Ramos peuvent interagir puis transmigrer à travers les Fbs grâce au couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 de façon modulable. Tel que stipulé dans l'hypothèse du "Seed and Soil", nos résultats supportent l'hypothèse d'un adressage cellulaire et tissulaire dans la dissémination métastatique des cellules tumorales qui s'implanteraient préférentiellement là où l'expression de VCAM-1 a été induite. Le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 pourrait servir de cible thérapeutique de choix dans le développement de nouveaux antagonistes anticancéreux.

Abstract

Emperipolesis of human lymphoma cells Ramos by fibroblasts

Keywords : Emperipolesis, cancer-associated fibroblasts (CAFs), lymphoma cells, $\alpha_4\beta_1$, VCAM-1, tumor microenvironment, transcellular migration, tumor stroma, vimentin.

Fibroblasts (Fbs) often represent the majority of stromal cells within tumors. A “cafocentric” view of the tumor microenvironment (MET) hypothesizes that the dynamic and reciprocal interactions between tumor cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) may enhance the metastatic potency of tumor cells. Very few studies investigated a physical interaction between Fbs and tumor cells within the tumor stroma. Using flow cytometry and blocking antibodies, we demonstrated that a human lymphoma cell line Ramos could interact with Fbs through the couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. We observed a dose-dependent increased interaction after tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulation which correlated with increased VCAM-1 expression. A similar observation was made after VCAM-1 overexpression by transfection. Further investigations by confocal microscopy revealed the engulfment of Ramos into the cytoplasm of Fbs, a process called emperipolesis which mostly corresponds to transcellular migration and involves the clustering of the α_4 sub-unit and VCAM-1 and the involvement of vimentin intermediate filaments at the transmigration cups. We visualized this cell-in-cell penetration by real time-lapse video-microscopy, which confirmed an active cellular process. Finally, we used $\alpha_4\beta_1$ polystyrene coated-beads as a mimetic model to further confirm the precedent results. Our results showed that Ramos lymphoma cells can interact with and further transmigrate through Fbs by an active cellular process, the emperipolesis which involves the couple of receptors $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. This crosstalk between Fbs and tumor cells through emperipolesis may modulate tumor cells escape from the primary tumor and support the "seed and soil" hypothesis as well as a possible involvement in tumor drug resistance. This fibroblastic permeability can be modulated by inflammation and the CAFs may react as endothelial cells and should be considered as a future target in the MET. Tumor cells may selectively search for new metastatic niches where VCAM-1 expression was already induced. Our results strengthen the growing idea that Fbs and tumor cell integrins may serve as suitable targets in the development of antagonist-based cancer therapy.

Table des matières

1	INTRODUCTION.....	1
1.1	Fondations de la recherche sur le cancer	1
1.1.1	Le MET, nécessaire et essentiel à la tumorigénèse.....	3
1.2	Rôle crucial du MET dans la cascade métastatique	4
1.3	Les CAFs "cancer-associated fibroblasts"	6
1.3.1	Les fibroblastes, protagonistes dans l'homéostasie matricielle et la fibrose	7
1.3.2	Les tumeurs, "des plaies qui ne cicatrisent jamais"	7
1.3.3	Activation des fibroblastes en CAFs	8
1.4	Vision "cafocentrique" du stroma tumoral	8
1.4.1	Sécrétion de facteurs de croissance	9
1.4.2	Sécrétion de métalloprotéinases (MMPs)	10
1.4.3	Sécrétion de composants de la MEC, de cytokines et chémokines	11
1.4.4	Les CAFs, régulateurs du couple protumoral CXCR4/SDF-1	11
1.5	L'extravasation : molécules d'adhésion cellulaire (MACs) et diapédèse	13
1.5.1	L'extravasation leucocytaire, modèle d'extravasation tumorale?	13
1.5.1.1	L'adhésion à l'endothélium	14
1.5.1.2	Le roulement leucocytaire	14
1.5.1.3	Adhésion ferme et diapédèse	15
1.5.1.3.1	Diapédèse transcellulaire	15
1.5.1.3.2	Diapédèse paracellulaire	16
1.5.2	La superfamille des intégrines.....	17
1.5.2.1	Rôles physiologiques des intégrines.....	17
1.5.2.2	Structure générale et activation des intégrines.....	17
1.6	Le couple $\alpha_4\beta_1$/VCAM-1 et le cancer.....	20
1.7	$\alpha_4\beta_1$/ VCAM-1, cible thérapeutique prometteuse	22
1.8	L'empéripolèse, des structures "cellule-dans-cellule"	23

1.9	Importance variable du MET dans les cancers sanguins.....	25
2	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	28
3	MATÉRIELS ET MÉTHODES	30
3.1	Cultures cellulaires	30
3.2	Anticorps et réactifs	30
3.3	Isolation des lymphocytes B.....	31
3.4	Cytométrie en flux.....	31
3.4.1	Observation et quantification de l'interaction Fb-cellule tumorale	31
3.4.2	Détection de l'expression des intégrines et des molécules d'adhésion	33
3.5	Transfection	33
3.6	Microscopie Confocale	34
3.6.1	Visualisation et analyse 3D de l'empéripolèse.....	34
3.6.2	Visualisation des molécules d'adhésion, de la β -caténine et de la vimentine	34
3.6.3	Visualisation de l'empéripolèse en temps réel	35
3.7	Billes de polystyrène tapissées de $\alpha_4\beta_1$	36
3.8	Analyse statistique	37
4	RÉSULTATS ET ANALYSE.....	38
5	DISCUSSION	70
5.1	CAFs, partenaire d'interaction directe des cellules tumorales	70
5.2	Les CAFs : possible barrière stromale perméable?	76
5.3	L'empéripolèse, une forme de perméabilité fibroblastique?	79
5.4	Est-ce que l'empéripolèse pourrait être observée <i>in vivo</i> ?	84

5.5	Empéripolèse et migration transcellulaire, mécanisme commun ou distinct?	88
5.6	$\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1, protagoniste d'une possible résistance thérapeutique?	93
6	CONCLUSION	97
7	BIBLIOGRAPHIE	99
8	ANNEXE 1: ÉTUDE PRÉCÉDENTE DU LABORATOIRE	I
9	ANNEXE 2: VIDÉO DE L'EMPÉRIPOLESE D'UN RAMOS SUR UNE MONOCOUCHE DE FIBROBLASTES	II

Liste des abréviations

2D	2 dimensions
3D	3 dimensions
ADN	acide désoxyribonucléique
ALCAM-1	<i>activated leukocyte cell adhesion molecule-1</i>
bFGF	<i>basis fibroblast growth factor</i>
BP	billes de polystyrène
CAFs	<i>cancer-associated fibroblasts</i>
CAM-DR	<i>Cell adhesion molecules - drug resistance</i>
Cd62E	<i>E-Selectin</i>
Cd62L	<i>L-Selectin</i>
CLL	<i>chronic lymphocytic leukemia</i>
CTD	cellule tumorale disséminée
COS	carcinomes oraux squameux
COX	<i>cyclooxygenase</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DDAO	<i>CellTrace™Far Red DDAO-SE</i>
EC	<i>endothelial cell</i>
EGF	<i>epidermal Growth factor</i>
Fb	fibroblaste
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FL	<i>follicular lymphoma</i>
FSP1	<i>fibroblast-specific protein 1</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
ICAM-1	<i>intercellular cell adhesion molecule-1</i>
IL-1	<i>interleukine-1</i>
IL-6	<i>interleukine-6</i>
IL-8	<i>interleukine-8</i>
IL-12	<i>interleukine-12</i>

IFN- γ	<i>interferon gamma</i>
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
MAC	molécule d'adhésion cellulaire
MAdCAM-1	<i>mucosal adressin cell adhesion molecule-1</i>
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MEC	matrice extracellulaire
MET	microenvironnement tumoral
MII	maladie inflammatoire de l'intestin
MM	<i>multiple myeloma</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
myofb	myofibroblaste
NF- κ B	<i>Nuclear Factor - κB</i>
NK	<i>natural killer</i>
OG	<i>Oregon Green</i>
PAF	<i>platelet-activating factor</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PECAM-1	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PET	<i>positron emission tomography</i>
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PML	<i>progressive multifocal leukoencephalopathy</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RGD	arginine-glycine-acide aspartique
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SDF-1	<i>stromal derived factor -1</i>
SLex	<i>sialyl lewis -X</i>
SLeA	<i>sialyl lewis -A</i>
SM	sclérose multiple
α -SMA	<i>Smooth muscle actin-α</i>
SPECT	<i>Single photon emission tomography</i>
TAM	<i>tumor-associated macrophage</i>

TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4 ($\alpha_4\beta_1$)</i>
VLA-5	<i>very late antigen-5 ($\alpha_5\beta_1$)</i>

Liste des figures

Figure 1: Nombre de publications relatives au MET durant la période 1990-2008.

Figure 2: Illustration des principales étapes du processus métastatique.

Figure 3: Illustration de la vision "cafocentrique" du stroma tumoral. Les CAFs sont au centre d'une intermodulation avec les cellules tumorales et les autres cellules stromales.

Figure 4: Représentation schématique de la structure des intégrines, des 3 états d'activation et des modes d'activation "*outside inn*" et "*inside out*".

Figure 5: Illustration de la méthodologie de quantification de l'interaction cellule tumorale - Fb par cytofluorométrie.

Figure 6: Corrélation positive entre le niveau d'expression de la sous-unité α_4 et la capacité adhésive de 12 lignées cellulaires hautement invasives. Le niveau d'expression de la sous-unité α_4 de $\alpha_4\beta_1$ est exprimé en fonction du pourcentage (%) de capacité adhésive des 12 lignées tumorales identifiées par la population DDAO⁺/OG⁺ (n=3).

Figure 7: Comparaison de la capacité adhésive des lymphocytes B isolés du sang de rat (noir) et des lymphomes humains Ramos (blanc) avec les Fbs. Modulation de l'interaction par stimulation préalable des Fbs au TNF- α (30 ng/mL) et des Ramos ou des lymphocytes B au PMA (10^{-8} M) seul ou en combinaison. *SEM \leq 0.05 vs contrôle ; ⁺SEM \leq 0.05 vs TNF- α ; n=4.

Figure 8: A) Quantification de l'interaction Ramos-Fb suite à une stimulation préalable des Fbs avec des concentrations croissantes de TNF- α (*p \leq 0.05 vs contrôle). B) Évaluation du niveau d'expression de VCAM-1 par cytofluorométrie suite à une stimulation préalable des Fbs avec des concentrations croissantes de TNF- α (0.3 à 30 ng/mL); n=6.

Figure 9: Modulation de l'interaction Ramos-Fb par la surexpression de VCAM-1 à la surface des Fbs par transfection d'un vecteur vide (pCMV6-XL5) et d'un vecteur contenant l'ADNc complet humain de VCAM-1 (pCMV6-VCAM-1). * p \leq 0.05 vs contrôle + MnCl₂ (2 mM); n=4.

Figure 10: Confirmation de l'implication du couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 dans l'interaction Fb-Ramos par l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre les sous-unités α_4 et β_1 , seules ou en combinaison et contre VCAM-1, seule ou en combinaison avec les sous-unités α_4 et β_1 . Les anticorps sont utilisés dans des conditions saturantes ($6 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cellules). * $p \leq 0.05$ vs contrôle + MnCl_2 (2 mM); $n=6$.

Figure 11: Visualisation 2D et 3D de la migration transcellulaire versus paracellulaire des Ramos (DDAO) à travers le corps cellulaire des Fbs (OG). Les jonctions intercellulaires d'une monocouche de Fbs sont révélées en marquant la β -caténine couplée à un anticorps secondaire fluorescent, la rhodamine (rouge). La présence d'un cône de migration dans le corps cellulaire des Fbs (flèche blanche) délimité par le marquage à la β -caténine correspond à l'empreinte laissée par la migration transcellulaire du Ramos (flèche blanche). À l'inverse, la migration paracellulaire du Ramos à la jonction intercellulaire des Fbs est indiquée par la flèche jaune.

Figure 12: Illustration 3D du phénomène d'empéripolèse des 2 Ramos par un Fb. Reconstitution 3D d'un plan (Δz) montrant l'englobement des 2 Ramos (marqués au DDAO-bleu) dans le corps cellulaire du Fb (marqué à l'OG-vert). Représentations supplémentaires correspondant à une rotation autour des axes x, y et z afin de mieux visualiser et confirmer l'empéripolèse.

Figure 13: Implication des filaments intermédiaires (vimentine) dans le processus d'empéripolèse. Les Fbs sont marqués à l'OG (vert), les Ramos au DDAO (bleu) et la vimentine est détectée grâce à un anticorps secondaire couplé à la rhodamine (rouge). La vimentine est localisée autour du cône de transmigration du Ramos, dans le corps cellulaire du Fb, comme indiqué par la flèche blanche.

Figure 14: Colocalisation 3D de la sous-unité α_4 à la surface des Ramos et de VCAM-1 à la surface des Fbs. Représentation des plans xy, xz et yz où les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (rose), la sous-unité α_4 est marquée avec un anticorps secondaire Alexa488 (vert) et VCAM-1 par un anticorps secondaire Alexa555 (rouge). Les flèches rouges indiquent la colocalisation du vert (α_4) et du rouge (VCAM-1), soit le jaune à la jonction Ramos-Fb.

Figure 15: Visualisation de l'empéripolèse en temps réel d'un Ramos (DDAO-bleu) par un Fb (OG-vert) par vidéomicroscopie (indiqué par la flèche rouge). Analyse 3D (x,y, Δz) de chaque point présélectionné au hasard (x_1, y_1, x_2, y_2 , etc.) à une fréquence de 5 min et ce, pendant 28 cycles, totalisant ainsi 140 min. $n=3$. La vidéo est présentée en pièce jointe à l'annexe 2.

Figure 16: A) Représentation 3D des données brutes (intensités de fluorescence) et B) reconstitution 3D des intensités de fluorescence en plans de surface grâce au logiciel IMARIS[®] d'un grossissement de la région encadrée en jaune dans la figure 14 et qui

correspond à l'empéripolèse du Ramos dans la vidéomicroscopie présentée en annexe 2. L'encadré rouge montre l'insertion du Ramos dans la monocouche de Fbs.

Figure 17: Confirmation de l'implication de $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 dans l'interaction Ramos-Fb par l'emploi d'un modèle mimétique de billes de polystyrène tapissées de $\alpha_4\beta_1$ (BP- $\alpha_4\beta_1$). Quantification et modulation de la capacité des BP- $\alpha_4\beta_1$ à interagir avec les Fbs après stimulation préalable des Fbs par le TNF- α (30 ng/mL) et l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre les sous-unités α_4 et β_1 . * $p < 0.001$ vs contrôle positif et $\chi < 0.001$ vs TNF- α + MnCl₂ (2 mM); n=3.

Figure 18: Visualisation 3D de l'empéripolèse de BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs (OG-vert). Reconstitution 3D d'un plan (Δz) montrant l'englobement de 3 BP- $\alpha_4\beta_1$ (bleu) dans le corps cellulaire du Fb. Représentations supplémentaires correspondant à une rotation autour des axes x, y et z afin de mieux visualiser et confirmer l'empéripolèse par une vue latérale, une vue du haut et une vue du dessous.

Figure 19: Modulation et quantification de l'empéripolèse par le décompte du nombre d'inclusions de BP- $\alpha_4\beta_1$ dans une monocouche de Fbs selon le ratio nb d'inclusions/0.045mm². Les BP- $\alpha_4\beta_1$ sont incubées en présence de MnCl₂ (2 mM), CaCl₂ (5 mM) ou inactivées par la chaleur. Les Fbs sont préalablement stimulés par le TNF- α (30 ng/mL). * $p < 0.001$ vs contrôle et $\chi < 0.001$ vs TNF- α + MnCl₂; n=3.

Figure 20: Récapitulation des faits saillants de cette étude. L'adhésion suivie de l'empéripolèse des Ramos par les Fbs est un processus cellulaire actif et modulable qui repose sur le couple de récepteurs $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. Les filaments intermédiaires sont concentrés autour des pores de transmigration et cette empéripolèse endosserait plusieurs fonctions physiopathologiques.

Mes enfants Ghalia et Salah, prunelles de mes yeux, vous êtes mon oxygène, quel indescriptible privilège d'être votre mère. Pour vous et en vous j'ai trouvé force et motivation à terminer ce que j'avais entamé avant votre naissance. Mon amour Yazid, tu as toujours été et tu es un moteur fiable et puissant, ton appui et ton amour inconditionnels font de moi une femme exceptionnellement comblée et qui, à ton contact, gagne chaque jour en qualité. Papa, homme de génie, ton intelligence et ta sagesse me guident tous les jours de ma vie, tu es une de mes plus solides fondations. Maman, le meilleur pour la fin! Tu as toujours su trouver les mots, les actions à entreprendre, ton pragmatisme et ta finesse d'esprit sont inégalables, tu es une Grande Dame. Que Dieu vous préserve, longtemps et en santé. Vous êtes ma force. Je vous aime!

Remerciements

"L'histoire de l'Humanité est un livre ouvert qui n'arbore aucune fin mais un éternel recommencement; la connaissance du passé est l'introduction du futur, à moi d'ajouter cette minuscule parcelle de savoir à notre patrimoine scientifique dans l'espoir qu'un jour, il fasse partie intégrante d'un nouveau commencement". N.O

Gaétan, je te remercie de m'avoir offert l'opportunité de travailler sous ta direction, ces quelques années passées ensembles ont été extraordinaires, sur le plan scientifique, intellectuel et même personnel. Malgré des débuts hésitants, souvent maladroits et sans résultats concrets et prometteurs, tu n'as jamais cessé de me faire confiance et je t'en serai toujours reconnaissante. Je n'avais jamais pensé être dans les dernières pages de ton livre professionnel, j'espère te faire honneur et être à la hauteur de tes attentes. Travailler à tes côtés a été la plus enrichissante des expériences, tu as su me transmettre cet amour si équilibré que tu voues à la recherche; j'ai été ta dernière et la plus privilégiée des étudiantes. Trois ans plus tard, tu continues à me soutenir, grâce à tes corrections et à tes critiques constructives, la qualité de ce mémoire n'en est que meilleure. J'aurais tellement aimé poursuivre cette aventure avec toi mais il faut croire que la vie me réserve autre chose. Tu feras toujours partie de mon cheminement, que ce soit dans un restaurant, un vignoble, un voyage, un laboratoire, un bureau, tant de choses que j'ai apprises de toi et avec toi.

Patrick Couture, merci de m'avoir maintes et maintes fois encouragée et soutenue lorsque les résultats se faisaient attendre et que je ne croyais plus en mes capacités. Je te remercie pour ce don que tu as de toujours dédramatiser les situations. Hélène Chabot, je te remercie de m'avoir soutenue, dans tous les sens du terme, j'ai renforcé ma rigueur et ma méthodologie à ton contact. Merci pour ton dévouement, toutes ces pauses cafés et pour toutes ces anecdotes avec tes chats. Je garde d'excellents souvenirs.

Dominic Filion, Eric Massicote et Martine Dupuis, je vous remercie de votre support inconditionnel en microscopie confocale et en cytofluorométrie, des heures et des heures

d'apprentissage, parfois des succès, parfois des échecs et aussi, heureusement pas trop souvent, des bêtises! Dominic, 3 ans plus tard, tu continues à me soutenir dans la mise au point de mes images 3D et dans le vidéo. Du fond du cœur, merci!

Dr Reudelhuber et Dr Côté, c'est grâce à votre appui que j'ai pu terminer ce mémoire. Merci d'avoir déployé vos ressources pour optimiser mes conditions de rédaction, merci de m'avoir encouragée dans les corridors, merci d'avoir fait de mon cas une priorité.

À tout le personnel de l'IRCM, un gros merci. D'une façon ou d'une autre, chaque membre a participé de près ou de loin à mon cheminement, du premier jour, le 5 juillet 2007 à aujourd'hui, le 6 décembre 2013, alors que je rédige mes remerciements. Un merci particulier à Sylvie Picard, pour tes histoires rocambolesques, les pauses café colorées et tes idées toujours géniales. Un gros merci à Nicole Campeau et Claudia Jones, votre aide à la bibliothèque était toujours précieuse et les pauses café toujours rigolotes. Tabasum Abdul-Rasul, merci de ton soutien inconditionnel, tu m'as énormément aidée à trouver les personnes ressources à l'IRCM pour m'aider à finaliser ce mémoire, notamment Ginette Vigneux et Jocelyne Côté pour la mise en page et la table des matières.

Pour finir, on dit toujours le meilleur pour la fin, je tiens à remercier mes parents. C'est grâce à vous que je suis devenue la femme que je suis aujourd'hui. Je vous serais éternellement reconnaissante de l'éducation et de l'instruction que vous m'avez offertes, une empreinte merveilleuse et indélébile qui me suit et qui fait ma singularité. Merci pour tous vos sacrifices et Dieu sait qu'ils sont nombreux. Vous avez élevé le niveau de votre famille, nous sommes tous instruits et éduqués, votre contrat est rempli comme vous le dites et c'est tout à votre honneur! J'espère prendre mon envol très bientôt et vous gâter. Vous le méritez tant!

Avant-propos

À mon arrivée au laboratoire du Dr Thibault, dans l'unité de biologie cellulaire de l'hypertension de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), l'équipe portait son attention sur les interactions directes entre les fibroblastes (Fbs) et les cellules inflammatoires mononucléées et polymorphonucléaires du sang dans un contexte de modulation de l'inflammation cardiaque. Les résultats de cette étude furent publiés (l'article est présenté en annexe 1) [1]. Alors que nous participions à un congrès au manoir Richelieu, Dr Thibault m'a regardée et m'a dit "et si on essayait avec des cellules cancéreuses?". Idée innovatrice qui a vite laissé place à un projet prometteur. Envisager une interaction physique directe entre les Fbs et les cellules cancéreuses au sein du microenvironnement tumoral (MET) est non seulement une hypothèse inexplorée mais en plus, elle renforce la vision émergente que les interactions dynamiques et réciproques entre les cellules cancéreuses et celles du MET orchestrent les étapes critiques de la progression tumorale à la formation de métastases. Dans cette perspective, plusieurs éléments cellulaires et moléculaires du MET émergent comme de nouvelles cibles des stratégies thérapeutiques en développement. Ma mission est de faire honneur à ce projet ainsi qu'à son directeur en rapportant, avec le plus de justesse possible, ses tenants et ses aboutissants, les implications cliniques et thérapeutiques conséquentes pour aboutir à une vision un peu plus concrète de contrer cette maladie.

1 Introduction

Selon le site internet de l'Agence de Santé du Canada, il est estimé que 2 canadiens sur 5 développeront un cancer au cours de leur vie et que 25% d'entre eux en mourront. En 2013, 187 600 canadiens ont reçu un diagnostic de cancer et 75 500 décès ont été imputés au cancer. Cinquante-deux pourcent des nouveaux cas diagnostiqués concerneront les cancers du poumon, du sein, de la prostate et le cancer colorectal. Quatre-vingt-huit pourcent des canadiens qui développent un cancer sont âgés de plus de 50 ans et les hommes constituent une plus grande proportion que les femmes. Finalement, 63% des personnes ayant reçu un diagnostic de cancer ont une espérance de survie relative de 5 ans. Le lymphome présente le taux d'expansion le plus élevé de toutes les formes de cancer dont sont atteints les jeunes adultes et représente le cinquième cancer le plus fréquent au Canada. Chaque année, 8 800 nouveaux cas de lymphome sont répertoriés au Canada, sexe confondu, et plus de 3 000 cas en décèdent.

La métastase cancéreuse est la principale cause de morbidité et de mortalité pour les patients atteints de cancer. Dans la plupart des cas, les tumeurs primaires sont susceptibles d'être éradiquées par une combinaison de radiothérapie et de chirurgie; par contre, leurs métastases, lorsque disséminées, sont plus difficiles à traiter et causent finalement la mort du patient. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires permettant la dissémination des cellules tumorales primaires permettrait l'élaboration de stratégies thérapeutiques préventives susceptibles d'être plus efficaces que toutes les thérapies actuellement existantes.

1.1 Fondations de la recherche sur le cancer

Avant de rentrer dans le vif du sujet, je tiens à rendre un bref hommage à un génie du passé qui a brillamment énoncé les fondations actuelles de la recherche sur le cancer. Stephen

Paget, chirurgien anglais du XIXe siècle, fils du célèbre chirurgien Sir James Paget, a complété sa formation à l'école de médecine St-Bartholomew et a, par la suite, pratiqué à Londres où il a manifesté un grand intérêt pour la recherche sur le cancer. En 1889, il a publié son manifeste fondateur du "*Seed and Soil*" (la graine et la terre) pour expliquer la formation non aléatoire de métastases au sein de certains organes [2]. Après avoir effectué plus de 900 autopsies sur des patients décédés de cancer, il a observé que le pourcentage d'occurrence de métastases au sein de certains organes comme les poumons et le foie était beaucoup plus élevé qu'au sein d'autres organes comme le cerveau et l'estomac. Cette constatation lui a permis d'affirmer que la dissémination métastatique ne semble pas être un processus aléatoire. Certaines cellules tumorales invasives qu'il a nommées "*Seed*" auraient une affinité spécifique à un milieu qu'il a nommé "*Soil*", soit un milieu sélectif offrant un avantage de survie et de croissance à ses "graines". Il a conclu son manifeste en des termes d'apparence simple mais aux implications cellulaires et moléculaires colossales : les métastases ne se développent que s'il y a compatibilité entre les "*seeds*" et le "*soil*". Paget ignorait que sa théorie révolutionnaire allait, un centenaire plus tard, servir non seulement de base solide mais en plus, d'arguments forts et judicieux à la nouvelle théorie sur l'importance du MET et ce, à tous les stades du développement cancéreux. Sa théorie est passée à l'oubli et ce n'est qu'à partir des années 1990 qu'elle a été revisitée [2, 3] et depuis, le nombre de publications relatives à l'implication du MET dans la tumorigénèse ne cesse de croître comme le montre la figure 1.

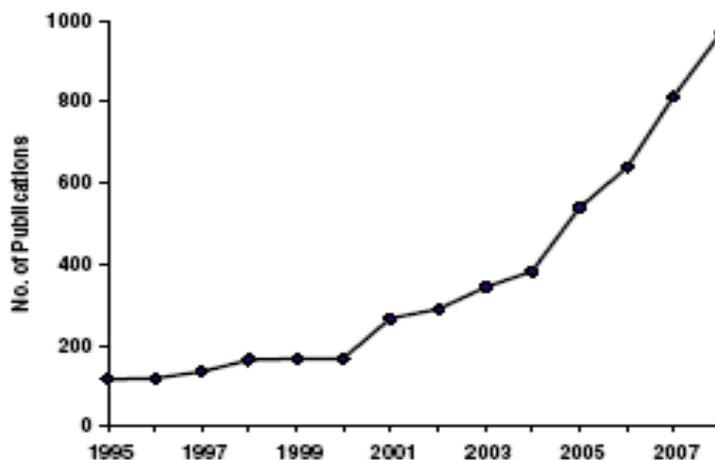


Figure 1: Nombre de publications relatives au MET durant la période 1990-2008 [3].

1.1.1 Le MET, nécessaire et essentiel à la tumorigénèse

Il y a 30 ans, la communauté scientifique avait une vision centralisée du cancer. Toutes les études fondamentales et cliniques ainsi que les développements thérapeutiques conséquents visaient exclusivement les cellules cancéreuses, notamment les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Seulement, un fait empirique récurrent s'imposait avec puissance: plusieurs cancers *in situ* ne progressent jamais vers un type invasif en raison de facteurs intrinsèques de l'hôte qui préviennent ce développement, phénomène qui a été baptisé "cancer sans maladie" [4]. Il devenait alors indéniable qu'une cellule transformée *per se* n'est pas suffisante pour causer un cancer létal et que la carcinogénèse requiert le recrutement d'un microenvironnement permissif à la croissance tumorale et à la dissémination métastatique. C'est alors que le MET a commencé à faire l'objet d'une attention grandissante et que l'idée originale de Stephen Paget a été reconnue à sa juste valeur. Cette transition de paradigme a permis le développement d'une nouvelle vision qui englobe la cellule tumorale dans un réseau cellulaire caractérisé par une coévolution graduelle avec les composants du MET. Ce dernier est constitué 1) du stroma tumoral qui est principalement composé de cellules endothéliales dérivées des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que de leurs précurseurs les péricytes, de capillaires, d'immunocytes, de cellules inflammatoires, de macrophages et de façon plus imposante, de Fbs et 2) de matrice extracellulaire (MEC). Cette coévolution s'avère possible grâce à des interactions dynamiques et réciproques entre les cellules tumorales et celles du MET ainsi qu'à des sécrétions paracrines qui conditionnent un stroma réactif et favorable à la survie et à la progression tumorale.

Aujourd'hui, la communauté scientifique reconnaît que les cellules tumorales et les cellules stromales exercent des effets réciproques sur le comportement cellulaire de chacune. Cette intermodulation entraîne une activation cellulaire et favorise la formation d'un stroma qui 1) conditionne la croissance des cellules tumorales, 2) détermine leur potentiel métastatique et éventuellement, 3) la localisation tissulaire des métastases. Dans cette optique, toutes les stratégies thérapeutiques qui ciblent le MET bénéficient d'une attention grandissante en hématologie par exemple, et l'enthousiasme dans ce domaine est justifié par

l'émergence de nouvelles thérapies telles que la thalidomide, la lenalidomide, le plerixafor et le natalizumab [5-7].

1.2 Rôle crucial du MET dans la cascade métastatique

La formation de métastases est une longue série d'étapes séquentielles et interreliées. Chaque étape est dite limitante car la moindre insuffisance ou défaillance cause l'arrêt de toute la cascade métastatique. L'aboutissement du processus dépend à la fois des propriétés intrinsèques des cellules tumorales ainsi que des réponses cellulaires et moléculaires de l'hôte. La figure 2 illustre une vision macroscopique du processus métastatique et met en évidence le rôle crucial qu'endosse le MET tant dans l'établissement des tumeurs primaires que dans la formation de métastases.

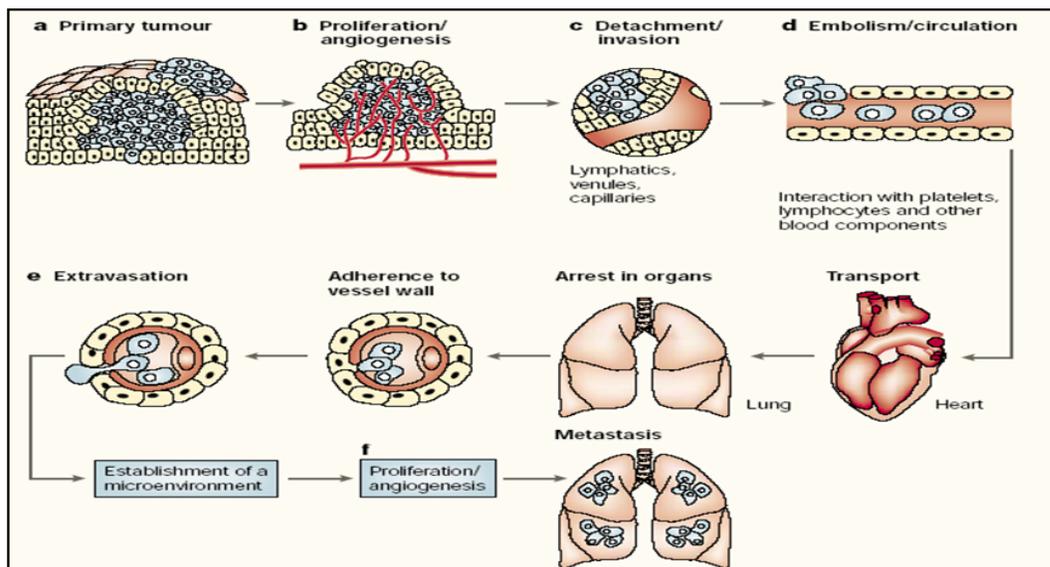


Figure 2: Illustration des principales étapes du processus métastatique [2].

Des mutations spontanées dites dominantes au niveau des oncogènes et/ou des mutations dites récessives des gènes suppresseurs de tumeurs découplent les circuits régulateurs contrôlant le devenir cellulaire, conférant ainsi aux cellules néoplasiques la capacité de survivre et de proliférer de façon illimitée et non contrôlée (étape a de la figure 2).

Ces cellules transformées prolifèrent progressivement et lorsque la microtumeur atteint la taille critique de 1 à 2 mm de diamètre, que l'oxygène et les nutriments se font rares, la synthèse et la sécrétion de facteurs proangiogéniques par le MET permet l'établissement d'un réseau néo-capillaire à partir des vaisseaux sanguins environnants (étape b de la figure 2). Cette vascularisation initiée par le MET permet à la microtumeur de bénéficier de tous les signaux oncogéniques et cellulaires ainsi que des nutriments et de l'oxygène essentiels à sa survie et à sa croissance.

Les quelques cellules ayant acquis une capacité motile et invasive se détachent alors de la tumeur primaire grâce à une nouvelle dynamique d'interactions, soit un bris des contacts cellule-cellule suivi de l'établissement de nouvelles interactions leur permettant d'adhérer à la MEC (étape c de la figure 2). Cette nouvelle dynamique d'interactions implique l'expression, au sein des cellules tumorales, de nouvelles molécules d'adhésion cellulaire (MACs) leur conférant un avantage de survie. Dans des conditions physiologiques normales, une cellule ne peut survivre dans un environnement inapproprié car elle est dépourvue des signaux d'autonomie cellulaire dits de survie et finit par succomber au phénomène d'*anoïkis*, soit la mort des cellules sans ancrage. Ce mécanisme de contrôle tissulaire prévient l'implantation de cellules dans des environnements inappropriés. Afin d'éviter l'*anoïkis*, durant l'initiation et la progression tumorale, les cellules malignes interagissent avec la MEC et établissent une relation bidirectionnelle avec le stroma tumoral environnant ce qui constitue la première et la plus cruciale des étapes de croissance invasive et de propagation métastatique. La capacité des cellules tumorales à subir une reprogrammation de leurs récepteurs de surface est de loin un des phénomènes les plus prodigieux du cancer à mes yeux, car cette commutation cellulaire leur confère un nouveau partenariat avec les composants du MET ce qui constitue un avantage de survie, de motilité et d'invasion.

Les cellules tumorales ne font pas qu'adhérer à la MEC, elles la dégradent, grâce aux métalloprotéinases (MMPs), afin de se frayer un chemin à travers la membrane basale subendothéliale des veines postcapillaires locales et des vaisseaux lymphatiques pour finalement transmigrer vers la circulation, processus qui s'appelle intravasation (étape d de la

figure 2). Une fois dans la circulation, les cellules tumorales circulantes sont confrontées à plusieurs obstacles, notamment d'ordre mécanique et d'immunosurveillance. La majorité d'entre elles sont rapidement détruites. Il n'y a que 0.1% des cellules tumorales qui survivent en circulation grâce à de nouvelles interactions avec les plaquettes, les lymphocytes ainsi que d'autres composants sanguins. Ces interactions sont souvent qualifiées "d'interaction écran" et seulement 0.01% arrivent ultimement à former des métastases. Les quelques cellules ayant survécu adhèrent à l'endothélium des lits capillaires périphériques d'organes distants, transmigrent à travers l'endothélium, étape communément appelée extravasation (étape e de la figure 2). Les cellules tumorales envahissent alors le tissu cible, adhèrent et migrent à travers la MEC afin de former une nouvelle colonie à un nouveau site métastatique spécifique (étape f de la figure 2) [8-10].

1.3 Les CAFs "cancer-associated fibroblasts"

Dans la dernière étape de dissémination métastatique, après transmigration endothéliale, les cellules tumorales invasives se retrouvent dans le stroma et il est largement rapporté que ces cellules ont la capacité de modifier leur microenvironnement immédiat pour le rendre favorable à l'invasion [10]. En effet, l'utilisation de modèles murins de tumorigénèse a révélé que les cellules stromales, notamment les cellules inflammatoires, les cellules vasculaires et les Fbs supportent activement la croissance tumorale [11]. Une fois les cellules tumorales dans le stroma, on parle alors de stroma réactif, de stroma activé ou « *tumor stroma* » qui est caractérisé par une augmentation du nombre de Fbs, de la densité capillaire, du collagène de type I ainsi qu'un dépôt accru de fibrine [12]. Ce stroma activé supporte l'invasion tissulaire en fournissant les signaux oncogéniques facilitant la progression et l'invasion tumorale [13, 14]. Les Fbs qui le composent sont appelés « *cancer-associated fibroblasts* » CAFs [15, 16] similaires à des myofibroblastes (myofbs).

1.3.1 Les fibroblastes, protagonistes dans l'homéostasie matricielle et la fibrose

Dans des conditions homéostatiques, les Fbs assurent le dépôt de MEC, la régulation de la différenciation épithéliale, de l'inflammation et la réparation de plaie [17, 18]. Ils synthétisent plusieurs composants de la MEC fibrillaire tels que les collagènes de type I, III et V ainsi que la fibronectine [17, 19, 20]. Ils contribuent également à la formation des membranes basales via la sécrétion de collagène de type IV et la laminine [19]. Ils sont aussi une source importante de protéases chargées de dégrader la MEC, soient les MMPs, ce qui confère aux Fbs un rôle prépondérant dans la fibrose tissulaire ainsi que dans l'homéostasie matricielle [19, 21].

La réparation de plaie et la fibrose tissulaire sont deux conditions qui exigent un remodelage tissulaire; les Fbs alors quiescents subissent une activation et se différencient en myofbs, initialement décrits par Giulio Gabbiani en 1971. Ces myofbs sont principalement caractérisés par la présence de fibres de stress contractiles (expression de α -SMA) et de vimentine [22]. À la fin du processus de réparation de la plaie, ils sont éliminés par granulation tissulaire consécutive à la némose, un type particulier de mort cellulaire programmé [23, 24].

1.3.2 Les tumeurs, "des plaies qui ne cicatrisent jamais"

Les CAFs partagent plusieurs similarités avec les myofbs, notamment l'expression de α -SMA, de la fibronectine ED-A (un variant d'épissage alternatif de la fibronectine) ainsi que la formation de contacts cellule-cellule via les jonctions de type GAP [17]. Par contre, à l'instar des myofbs, les CAFs ne sont pas éliminés par apoptose et leur activation n'est pas réversible. C'est pour cette raison que la tumeur est souvent comparée à "une plaie qui ne cicatrise jamais"; les CAFs qui la composent sont dans état constamment activé [25]. Ils constituent le type cellulaire dominant du stroma tumoral. Ils peuvent représenter jusqu'à la moitié de la masse stromale et leur nombre augmente massivement par rapport à tous les

autres types cellulaires du stroma tumoral. Cet enrichissement en CAFs a été observé dans plusieurs types de cancer, notamment le sein, la prostate et le pancréas [12, 14, 26, 27].

1.3.3 Activation des fibroblastes en CAFs

Il existe deux modèles largement répandus d'activation des Fbs en CAFs au sein du stroma tumoral. Le premier, et le plus répandu, repose sur l'expression de hauts niveaux de facteurs de croissance par les cellules tumorales, notamment le TGF- β (*transforming growth factor- β*) [28], le PDGF- α/β (*platelet-derived growth factor- α/β*) [29, 30] et le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) [31]. À ce jour, le TGF- β demeure le principal activateur tumoral des CAFs.

Le second soutient que l'activation des CAFs serait également sous le contrôle indirect du potentiel d'oxydation. En effet, le TGF- β augmente le niveau d'expression d'espèces réactives oxydées (ROS) au sein du stroma, régulant ainsi à la baisse les jonctions intercellulaires de type GAP entre les Fbs quiescents ce qui favorise 1) la transition du phénotype myofb à CAF et 2) l'activité protumorale au sein de tumeurs de la peau par exemple [32, 33]. La même étude a montré qu'un traitement antioxydant a prévenu l'activation des CAFs et réduit le pouvoir invasif des cellules tumorales [32]. La transition progressive de Fbs résidents mammaires en CAFs s'accompagnerait de l'acquisition de deux boucles d'activation autocrine de TGF- β et de SDF-1 (*stromal-derived factor-1*), lesquelles initieraient et maintiendraient la différenciation des myofbs en CAFs et le phénotype protumoral concurrent [34]. L'implication des CAFs à tous les stades de la tumorigénèse attire de plus en plus d'attention, à un tel point que certaines études rendent compte d'une vision "cafocentrique" du stroma tumoral.

1.4 Vision "cafocentrique" du stroma tumoral

Il est clairement établi que les CAFs sont associés aux cellules tumorales à tous les stades de la progression cancéreuse, leurs contributions indirectes tant structurales que

fonctionnelles font l'objet d'études intensives. Une vision "cafocentrique" émergente place les CAFs au centre d'un stroma hautement réactif via les multiples sécrétions paracrines et autocrines de facteurs de croissance et de cytokines [35]. La figure 3 illustre parfaitement cette vision cafocentrique.

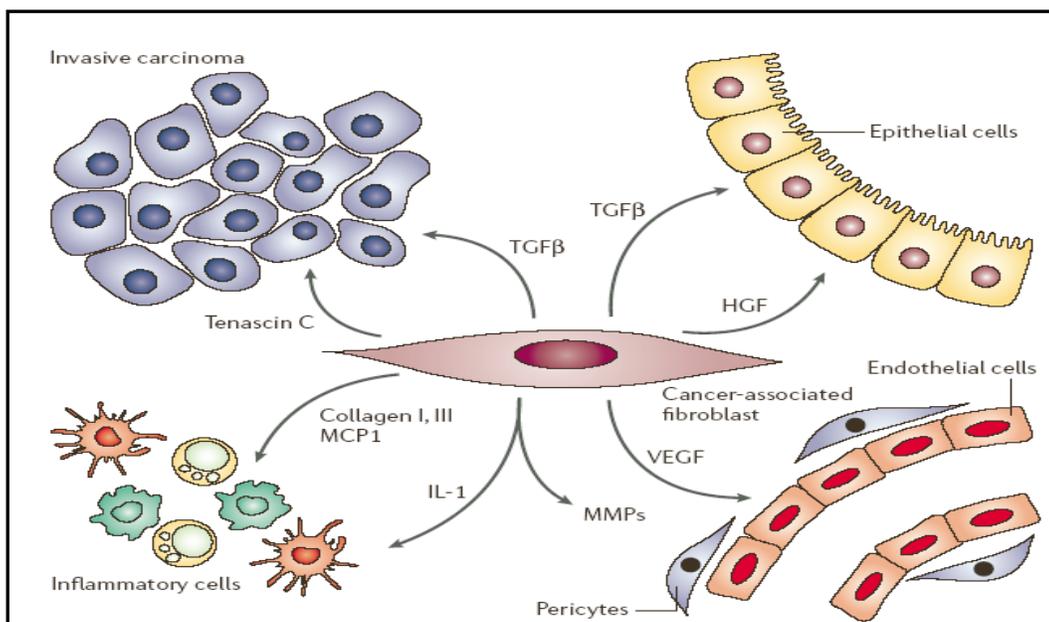


Figure 3: Illustration de la vision "cafocentrique" du stroma tumoral. Les CAFs sont au centre d'une intermodulation avec les cellules tumorales et les autres cellules stromales [12].

1.4.1 Sécrétion de facteurs de croissance

Le courant de pensée actuel soutient que les cellules tumorales invasives, par la sécrétion de TGF-β, activent les Fbs qui, à leur tour, sécrètent des facteurs mitogènes, notamment le TGF-β, le HGF (*hepatocyte growth factor*) et l'EGF (*epidermal growth factor*) reconnus pour stimuler la prolifération des cellules tumorales. Un des cas les mieux caractérisés est celui du récepteur tyrosine kinase c-Met qui, lorsque suractivé par le HGF qui est largement exprimé par CAFs, subit une hyperphosphorylation dans son domaine tyrosine kinase qui se traduit par une augmentation de la capacité motile et invasive des cellules tumorales [10, 36, 37]. Les CAFs sécrètent également du VEGF (*vascular endothelial growth*

factor) qui, 1) est responsable du recrutement de péricytes et de l'initiation de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins essentiels à la survie ainsi qu'à la croissance des cellules tumorales, phénomène correspondant à l'angiogénèse [38, 39] et 2) joue un rôle central dans l'émergence d'un stroma activé [40].

1.4.2 Sécrétion de métalloprotéinases (MMPs)

Les CAFs sécrètent aussi des MMPs, dont l'expression et l'activité sont régulées à la hausse, fait constaté au sein de presque tous les cancers humains, et corrélient avec 1) l'invasivité tumorale locale dans les modèles animaux et 2) un pronostic défavorable en clinique [28, 41-46]. En effet, ces MMPs contribuent à l'instabilité matricielle via la dégradation de la MEC ce qui permet l'expansion, l'évasion et l'invasion des cellules tumorales. Concrètement, la dégradation de MEC permet aux cellules tumorales de traverser la membrane basale et les frontières tissulaires afin de se rendre à un nouveau microenvironnement péri-tumoral [47]. Un exemple typique est la sécrétion des collagénases MMP2 et MMP9 par les CAFs, lesquelles sécrètent, à leur tour, le collagène de type IV permettant aux cellules tumorales d'être plus invasives [48]. Dans la même lignée, une autre étude a montré que des souris dont les gènes MMP9 ou MMP2 ont été inactivés sont moins susceptibles de former des métastases pulmonaires après injection de cellules de carcinomes que leurs homologues sauvages [49]. Ces MMPs procèdent également au clivage des molécules d'adhésion cellulaire ce qui favorise la motilité des cellules tumorales augmentant ainsi leur pouvoir invasif [50, 51]. Ce que je trouve le plus fascinant et qui appuie fortement l'idée d'intermodulation ou partenariat entre les cellules tumorales et le stroma activé, est que la plupart des MMPs sont sécrétées sous forme de pro-enzymes inactives par les cellules stromales, notamment les CAFs, et sont par la suite activées par les protéases tumorales.

1.4.3 Sécrétion de composants de la MEC, de cytokines et chémokines

Il a également été montré que les CAFs produisent les collagènes de type VI, XV, XVII ainsi que la tenascine, des composants matriciels essentiels à la survie tumorale et au potentiel métastatique [52]. Il a été rapporté qu'un dépôt accru des collagènes de type I et III altère la MEC au sein du MET ce qui potentialise l'émission de signaux oncogéniques additionnels et favoriserait l'accélération de la progression tumorale [12]. Outre les facteurs de croissance, les CAFs sécrètent des modulateurs inflammatoires ainsi que des chémokines. En effet, la sécrétion de MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*), d'IL-6 (*interleukine-6*) [53], d'IL-1 et de composants de MEC, notamment les collagènes de type I et III comme le montre la figure 3, contribuent à la création d'un MET inflammatoire reconnu pour favoriser la croissance, la progression et la dissémination tumorale.

1.4.4 Les CAFs, régulateurs du couple protumoral CXCR4/SDF-1

Un couple très en vogue dans la recherche sur le cancer, est le couple CXCR4/SDF-1. Le récepteur CXCR4 est de loin le récepteur à chémokines le plus communément surexprimé à la surface des cellules cancéreuses humaines [54]. À part les leucocytes qui expriment constitutivement ce récepteur, tous les autres tissus normaux n'expriment que très faiblement voire pas du tout CXCR4. Par contre, le SDF-1 est exprimé de façon constitutive dans plusieurs tissus incluant les sites communs de métastases (poumons, foie). Les CAFs sécrètent le SDF-1, reconnu pour potentialiser le pouvoir invasif des cellules tumorales, montrant également une synergie avec l'IL-8 dans la promotion d'une réponse angiogénique complète via le recrutement de cellules endothéliales [55]. Une étude a confirmé ce résultat en montrant que le SDF-1 sécrété par les CAFs de tumeurs mammaires est impliqué dans la mobilisation de cellules endothéliales précurseurs de la moelle osseuse afin de favoriser une angiogénèse *de novo* ainsi qu'une croissance tumorale via un effet paracrine sur CXCR4 exprimé à la surface des cellules tumorales [56]. Ce qui attise notre intérêt est que le couple CXCR4-SDF-1 active certains récepteurs à la surface des cellules tumorales invasives, notamment l'intégrine $\alpha_4\beta_1$

[57, 58] en favorisant la translocation des sous-unités α et β de l'intégrine ce qui se solde par une régulation ainsi qu'une activation transmembranaire. Les ligands de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ entre autre activée par le couple CXCR4-SDF-1 sont la thrombospondine, la fibronectine et VCAM-1 [59].

L'implication des Fbs dans la progression tumorale est clairement établie [12, 15, 37, 43, 60, 61]. Par contre, les effets rapportés dans la littérature sont indirects, majoritairement via la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines, de chémokines et de protéines matricielles. Soulignons que très peu d'études se sont concentrées sur une possible interaction physique directe entre les CAFs et les cellules tumorales au sein du stroma réactif [14, 62-65].

Pour clore cette partie, j'aimerais évoquer une étude fort intéressante publiée dans *Oncogene* en 2004 et qui rapporte une comparaison des profils d'expression génique de CAFs dérivés de métastases de colon dans le foie et de Fbs quiescents de la peau [66]. L'étude révèle qu'au sein des CAFs, plusieurs facteurs de croissance sont régulés à la hausse (TGF- β , VEGF, PDGFA, FGF1, CTGF, etc.), ce qui est attendu. Par contre, ce qui a attiré mon attention, c'est la régulation à la hausse des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, plus communément exprimées à la surface endothéliale et largement rapportées comme étant des joueurs clés dans la diapédèse, soit la dernière étape de l'extravasation. Ces résultats suggèrent un phénomène d'adressage tissulaire et cellulaire car l'expression à la hausse de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, ligand de VCAM-1, est observée au sein de nombreuses tumeurs et lignées cellulaires hautement invasives dérivées de métastases. Les CAFs exprimeraient de tels récepteurs pour une raison.

Une interaction physique CAFs-cellules tumorales serait non seulement possible grâce au couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 mais en plus, elle renforcerait l'hypothèse émergente d'adressage cellulaire et tissulaire émise par Stephen Paget. Avant de poursuivre, je vais faire une brève revue de littérature du processus d'extravasation, des molécules d'adhésion impliquées dans ce processus et des différents types de diapédèse afin de mieux comprendre l'importance des molécules d'adhésion dans le phénomène d'adressage et plus particulièrement, de l'importance du couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1.

1.5 L'extravasation : molécules d'adhésion cellulaire (MACs) et diapédèse

La majorité des cellules au sein des différents tissus présentent des interactions relativement stables et limitées avec la MEC et les cellules avoisinantes afin de définir les frontières tissulaires et l'architecture globale des différents organes. Au contraire, dans le but de bien remplir leur fonction d'immunosurveillance, les leucocytes circulent continuellement à travers tous les compartiments du corps [67]. Cette fonction requiert la capacité de traverser efficacement et rapidement les barrières tissulaires telles que les barrières endothéliale et épithéliale. Dans cette optique, les leucocytes sont considérés comme des cellules hautement "invasives" qui, en fait, sont bien mieux armés pour traverser les frontières tissulaires que le sont les cellules tumorales métastatiques pour qui ce terme est généralement réservé [68]. Les principaux types cellulaires capables d'extravasation sont les cellules tumorales invasives ainsi que les leucocytes, notamment les lymphocytes T, les cellules natural killer (NK), les granulocytes polymorphonucléaires et les monocytes [69].

1.5.1 L'extravasation leucocytaire, modèle d'extravasation tumorale?

De concert avec l'endothélium vasculaire qui joue un rôle actif dans l'extravasation via la sécrétion de signaux de localisation cellulaire, les cellules inflammatoires quittent les vaisseaux sanguins afin de se rendre au site d'inflammation ou d'infection tissulaire grâce à la transmigration endothéliale, processus assez bien caractérisé jusqu'au niveau moléculaire [69]. À l'inverse, celle des cellules tumorales invasives l'est très peu et c'est pourtant une étape cruciale dans la dissémination métastatique. Même si les étapes seraient pratiquement les mêmes, à savoir le roulement, l'adhésion ferme et la diapédèse, les molécules d'adhésion qui sont impliquées diffèrent. Une autre différence de taille est que l'adhésion leucocytaire ne change l'intégrité endothéliale que temporairement alors que celle des cellules tumorales engendre des dommages irréversibles à l'architecture endothéliale [69]. On perçoit clairement le paradigme du physiologique qui s'oppose au pathologique. De plus, dans plusieurs cas, il a

été observé que les cellules tumorales interagissent directement avec les leucocytes et les instrumentalisent comme des agents de liaison à l'endothélium facilitant leur extravasation [69]. Ceci implique que la formation de certaines métastases est indirectement sensible et initiée par des signaux de localisation spécifiques aux cellules du système immunitaire. Finalement, grâce au fait que les leucocytes et les cellules tumorales expriment des éventails de MACs relativement semblables, la transmigration leucocytaire a servi et sert toujours de modèle de base dans les multiples études visant à mieux comprendre et caractériser le phénomène de colonisation et de dissémination métastatique. Un bref survol des mécanismes connus de migration transendothéliale s'impose afin d'introduire la grande famille des MACs et plus particulièrement, du couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1, que nous pensons être impliqué dans une possible interaction directe entre les cellules tumorales et les CAFs au sein du MET.

1.5.1.1 L'adhésion à l'endothélium

Lors d'une inflammation, des facteurs chimiotactiques ou des cytokines, notamment les cytokines de type interleukines (IL-1, -6, -8, -12) ainsi que le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) sont sécrétés localement afin d'activer l'endothélium vasculaire et favoriser l'adhésion leucocytaire [70-74]. Ces cytokines régulent à la hausse les MACs à la surface endothéliale, notamment la famille des sélectines (E, P et L-sélectine) qui facilitent l'ancrage des leucocytes. D'autres glycoprotéines, notamment la glycoprotéine de type I (PSGL-1) et les glycoprotéines de type Sialyl Lewis-X ou -A (SLe^x, SLe^A) sont également impliquées dans l'adhésion transitoire et le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium vasculaire [75-78].

1.5.1.2 Le roulement leucocytaire

Ce roulement endosse un double rôle. Le premier est principalement un effet de séquestration positive, le roulement permet d'éviter le détachement des leucocytes exposés à la tension de stress du flux sanguin [79, 80]. Il a même été suggéré que la vitesse des leucocytes diminue à mesure que le niveau d'activation de leurs intégrines β_2 augmente et qu'une fois le niveau d'avidité optimale atteint, les leucocytes sont capables de s'arrêter grâce à une adhésion ferme et d'entamer leur diapédèse [81]. Le deuxième est activateur, par une régulation à la

hausse ainsi qu'une activation des MACs endothéliales de la famille des immunoglobulines, notamment ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) et VCAM-1 (*vascular adhesion molecule-1*) en réponse à l'IL-1 β , IL-4, TNF- α et l'IFN- γ (*interferon- γ*) ainsi que par la présentation du PAF (*platelet-activating factor*) et de l'IL-8 sur l'endothélium. Toute cette mobilisation active les leucocytes et favorise une interaction plus stable et ferme à l'endothélium [82-84]. En effet, lorsque les interleukines lient leurs récepteurs respectifs à la surface des leucocytes en roulement, elles amorcent une activation des voies de signalisation des chémokines ainsi que celle des intégrines via un mécanisme "inside out". Supportant ce mécanisme, une étude a rapporté que le blocage du récepteur à l'IL-8 chez les monocytes de souris a réduit de 50% leur capacité à adhérer à des cellules endothéliales activées [85].

1.5.1.3 Adhésion ferme et diapédèse

Les membres de la grande famille des intégrines impliquées dans l'adhésion ferme à l'endothélium suivie du processus de diapédèse sont 1) les intégrines de type β_2 , soient $\alpha_1\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18), $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CD11b/CD18) et CD11c/CD18 qui ont respectivement ICAM-1, JAM-1 (*junctional adhesion molecule-1*), le fragment iC3b du complément et la fibronectine comme principaux ligands, 2) les intégrines de type β_1 ($\alpha_4\beta_1$) et de type β_7 ($\alpha_4\beta_7$) qui ont VCAM-1, la fibronectine et MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) comme principaux ligands et finalement, 3) l'intégrine de type β_3 ($\alpha_V\beta_3$) qui lie PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1* ou CD31) [86]. Il existe deux principaux types de diapédèse, la diapédèse transcellulaire et paracellulaire.

1.5.1.3.1 Diapédèse transcellulaire

Les intégrines mentionnées ci-haut sont rapportées comme étant impliquées dans l'adhésion ferme suivie de la migration *transcellulaire* des leucocytes à travers les cellules endothéliales de la paroi vasculaire. Ce type de transmigration se fait à travers le corps cellulaire des cellules endothéliales. Par exemple, il a été montré que l'adhésion des sous-populations lymphocytaires exprimant $\alpha_4\beta_1$ à l'endothélium activé exprimant VCAM-1 est une

étape clé dans la migration transcellulaire des lymphocytes au site tissulaire enflammé [59]. La migration transcellulaire s'oppose à la migration paracellulaire.

1.5.1.3.2 Diapédèse paracellulaire

Une MAC spécifique à l'endothélium de la famille des cadhérines, la VE-cadhérine, est spécifiquement impliquée dans la migration *paracellulaire* des leucocytes, soit entre la jonction des cellules endothéliales de la paroi vasculaire. En effet, lorsqu'activée, la VE-cadhérine se dissocie transitoirement ce qui augmente temporairement la perméabilité de la monocouche endothéliale et permet la diapédèse paracellulaire des leucocytes *in vitro* [87-89]. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la VE-cadhérine a confirmé la dissociation des jonctions d'adhérence et l'augmentation de la diapédèse [90, 91].

Plusieurs études supportent que la liaison des couples de récepteurs mentionnés ci-dessus supportent une adhésion ferme à l'endothélium (via les sélectines et les intégrines) et une migration transendothéliale subséquente (PECAM-1, JAM-A et de LFA-1/Mac-1) tant de façon transcellulaire que paracellulaire.

Ce modèle d'activation des leucocytes et d'interaction avec les cellules endothéliales activées sert de tremplin pour élucider les interactions cellule endothéliale-cellule cancéreuse. Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ qui est surexprimée à la surface des cellules tumorales tant *in vitro* qu'*in vivo* et que nous pensons impliquée dans une interaction directe entre les cellules tumorales et les Fbs. Nous allons donc faire une brève revue de littérature générale quant à cette famille de récepteurs de surface habituellement exprimée à la surface leucocytaire. Notre but est de mettre en relief les mécanismes d'activation, l'importance de l'état d'activation et d'affinité des intégrines avant de nous concentrer plus particulièrement sur le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 dans le contexte tumoral et thérapeutique.

1.5.2 La superfamille des intégrines

1.5.2.1 Rôles physiologiques des intégrines

La MEC ne se limite pas qu'à conférer des propriétés de résistance, de flexibilité et de malléabilité aux tissus, elle exerce également un effet extraordinaire sur le comportement cellulaire en tant que structure d'échafaudage essentielle à l'organisation cellulaire au sein des tissus. Il existe deux principales formes de MEC: la membrane basale et la matrice interstitielle. Chacune varie en constitution et en composition dépendamment de l'identité, de la localisation cellulaire et tissulaire ou encore du stade de développement de l'organisme.

Ces fonctions vitales de la MEC sont principalement assurées par les intégrines, une large famille de récepteurs de surface qui assurent les adhésions cellule-cellule et cellule-MEC [92]. En effet, les intégrines permettent aux cellules d'adhérer aux protéines matricielles telles que la fibronectine, la laminine ou le collagène; elles assurent l'organisation du cytosquelette puisqu'elles lient, via leur domaine intracellulaire, plusieurs protéines cytosqueletiques telles que la talin et la vinculine qui sont impliquées dans l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire [93, 94]. Le répertoire d'intégrines présent sur une cellule donnée détermine l'étendue de ses capacités adhésives et migratoires sur différentes matrices. Les intégrines sont souvent perçues comme des senseurs biomécaniques et biochimiques bidirectionnels qui transmettent et perçoivent des cellules tous les signaux des environnements extracellulaire et intracellulaire dans le but ultime de préserver l'intégrité cellulaire et tissulaire [95, 96].

1.5.2.2 Structure générale et activation des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires composées de deux sous-unités α et β reliées de façon non-covalente. Chez les vertébrés, il existe 24 hétérodimères formés par la combinaison de 18 sous-unités α et de 8 sous-unités β [97]. Elles sont classées en 4 principaux groupes selon la sous-unité β commune: les intégrines β_1 (*very late activation antigens* VLA), les intégrines β_2 (Leu CAMs), les intégrines β_3 (cytoadhésine)

et les intégrines β_7 . Les deux sous-unités α et β comportent un large domaine extracellulaire qui confère différentes spécificités de liaison, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique relié à toute la machinerie intracellulaire. Sur plusieurs intégrines, la séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) a été identifiée comme un motif général de liaison; il existe toutefois d'autres sites de liaison spécifiques.

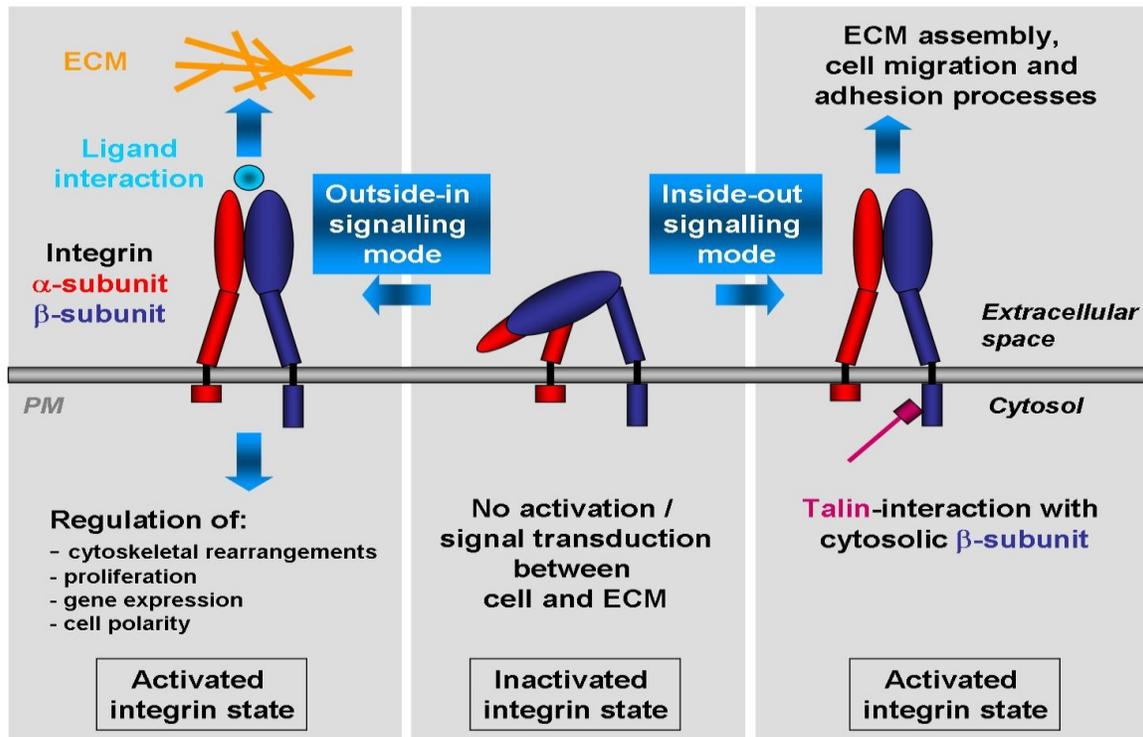


Figure 4: Représentation schématique de la structure des intégrines, des 3 états d'activation et des modes d'activation "outside in" et "inside out" [96].

Les intégrines existent sous différents états d'activation pour leurs ligands respectifs: un état activé de haute affinité, de basse affinité et un état inactivé comme illustré à la figure 4. La transition d'un état inactif à un état actif peut être modulée et régulée par des facteurs extracellulaires, tels que la liaison du ligand ou la présence de cations divalents (Ca^+ , Mn^{2+} , etc.). Une telle activation est dite "outside in". À l'inverse, l'activation peut provenir du milieu intracellulaire, une activation dite "inside out", et être acheminée vers le domaine extracellulaire, notamment par des complexes intracellulaires impliquant les GTPases R-Ras et Rap1. Cette activation initie également la translocation des sous-unités α et β qui, alors,

constituent une plateforme d'échafaudage directe à plusieurs complexes intracellulaires, notamment les FAK (kinases d'adhésion focale), les cascades initiées par les MAPKinases (kinases Erk et c-Jun) et les effets sur la superfamille des Ras GTPases (Rho, Rac, CDC42 et Rap). L'activation de ces complexes contribue considérablement à l'organisation du cytosquelette, à la motilité cellulaire, à la transduction des signaux extracellulaires ainsi qu'à l'état d'affinité des intégrines.

Le modèle le plus largement répandu de la régulation de l'activation des intégrines dans la diapédèse leucocytaire est le suivant : au sein des leucocytes circulants, les intégrines sont maintenues dans un état de basse affinité. Seulement, lorsque la voie d'activation "inside out" est enclenchée, les intégrines sont activées et adoptent une conformation de haute affinité qui facilite la liaison du ligand et les adhésions cellulaires subséquentes. La liaison du ligand, à son tour, induit la voie d'activation "outside in" qui consolide l'adhésion cellulaire via la translocation des sous-unités de l'intégrine, augmentant ainsi l'avidité de liaison. Les principaux protagonistes intracellulaires impliqués dans l'activation "inside out" sont les petites GTPases et la talin [98].

Depuis une vingtaine d'années, les intégrines suscitent un intérêt grandissant dans la recherche sur le cancer. Leurs implications dans la tumorigénèse sont nombreuses et documentées. Elles constituent des "portes de sortie" à plusieurs mécanismes de protection cellulaire, notamment l'*anoïkis* et la réponse inflammatoire. Les cellules tumorales ont cette incroyable capacité non seulement de reprogrammer mais également d'exprimer un nouvel éventail d'intégrines leur permettant ainsi l'acquisition de nouveaux partenaires d'interaction, notamment les cellules inflammatoires et les cellules stromales. De telles interactions, souvent qualifiées "d'interactions écran", leur permettraient ultimement de survivre, de croître, de se déplacer et peut-être même de vivre en symbiose avec les cellules stromales, option physiologiquement favorable lorsque les nutriments se feraient rares et que l'environnement péri-tumoral serait trop oxydatif.

Des études cliniques et précliniques ont démontré l'efficacité de l'utilisation d'antagonistes des intégrines pour bloquer la progression tumorale. Par exemple, les essais

clinique en phase II avec le cilengitide (développé par Merck KGaA), un inhibiteur des intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_5$ a démontré une efficacité thérapeutique chez les patients atteints de glioblastome malgré quelques effets indésirables. Ces résultats positifs et prometteurs ont servi de base solide à l'initiation d'essais cliniques de phase III [99, 100].

Une des intégrines qui attirent de plus en plus d'attention dans le cadre de plusieurs pathologies, notamment l'arthrose rhumatoïde, l'asthme, la sclérose multiple, l'athérosclérose, les maladies inflammatoires de l'intestin ainsi que la maladie de Crohn est l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ [6]. Dans le cadre de notre étude, notre intérêt s'oriente vers l'implication de $\alpha_4\beta_1$ dans le cancer, implication non seulement établie mais de plus en plus documentée.

1.6 Le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 et le cancer

L'expression de plusieurs intégrines, particulièrement le sous-groupe des intégrines de type β_2 , est exclusive aux leucocytes. Les cellules tumorales déploient donc différents récepteurs ou mécanismes pour adhérer à l'endothélium. Une alternative très documentée est celle de la sous-unité α_4 , dont l'expression est répertoriée sur plusieurs tumeurs humaines et lignées cellulaires tumorales, notamment les mélanomes et les sarcomes. En combinaison avec les sous-unités β_1 ou β_7 , la sous-unité α_4 agit en tant que ligand de VCAM-1, de la fibronectine et de MADCAM-1.

VCAM-1 est une molécule d'adhésion de type immunoglobuline avec 7 domaines Ig extracellulaires et qui est surtout exprimée à la surface endothéliale [101, 102]. Dans des conditions inflammatoires, son niveau d'expression est fortement augmenté par plusieurs cytokines inflammatoires, notamment l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α [73, 103]. Elle lie l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ avec une haute affinité et joue un rôle critique dans la réponse inflammatoire en recrutant les leucocytes au site d'inflammation. La partie intracellulaire de VCAM-1 interagit avec l'ezrin (connue également sous le nom de cytovillin ou villin-2), un membre de la famille protéique ERM (Ezrine/Radixine/Moesine), une famille de protéines cytoplasmiques adaptatrices dont le rôle est de lier plusieurs protéines transmembranaires au cytosquelette

d'actine. VCAM-1 est reconnue comme un activateur de Rac1, membre de la famille des Rho GTPases, qui est impliqué dans le réarrangement du réseau cytosqueletique qui est, à son tour, responsable du remodelage des jonctions serrées interendothéliales. Ce remodelage facilite conséquemment la migration transendothéliale des leucocytes.

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré que la capacité métastatique des cellules de mélanomes est renforcée suite à l'interaction $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 [104, 105]. L'une d'elles a montré que sur 59 patients atteints de mélanomes, 37 d'entre eux avaient des tumeurs primaires positives à l'expression de $\alpha_4\beta_1$. Cette même étude a révélé que l'expression de $\alpha_4\beta_1$ est non seulement un paramètre indépendant de mauvais pronostic mais en plus, qu'elle corrèle avec une réduction des chances de survie [106]. De surcroît, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'interaction entre les cellules de mélanomes exprimant $\alpha_4\beta_1$ et l'endothélium via VCAM-1 se produit effectivement et facilite leur extravasation ainsi que la formation subséquente de métastases [74, 104, 105, 107]. Dans les modèles expérimentaux de métastases où des cellules tumorales sont injectées par voie intraveineuse, le blocage fonctionnel de l'interaction $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 par des anticorps spécifiques [104, 105] ou la désintégrine éristostatine [108] a significativement réduit le nombre de métastases formées aux poumons et ce, tant avec des cellules de mélanomes humains que murins. Une étude parallèle a montré que le prétraitement de souris au TNF- α [104] ou à l'IL-1 [105] a significativement augmenté le nombre de métastases, fait associé à une induction de l'expression de VCAM-1 sur l'endothélium pulmonaire.

L'implication de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ n'est pas exclusive aux mélanomes. Une étude a montré son implication dans le cancer des ovaires, plus spécifiquement, elle serait responsable de la formation de métastases péritonéales ainsi que la prolifération tumorale [100, 109].

La majorité des études qui rapportent une interaction protumorale $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 sont réalisées avec des cellules endothéliales. Dans le stroma tumoral, où l'angiogénèse est fortement présente, il y a effectivement des cellules endothéliales ainsi que des péricytes. Ces résultats sont donc très intéressants quant à une perspective anti-angiogénèse dans le MET.

Il n'en demeure pas moins que les CAFs constituent le type cellulaire dominant du stroma tumoral et que Nakagawa *et al.* ont montré la régulation à la hausse de VCAM-1 à l'échelle génique au sein des CAFs [66]. Nous soutenons la possibilité d'une interaction directe cellule tumorale-CAFs via le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. Notre enthousiasme face à l'implication de $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 dans cette interaction est renforcé par plusieurs avenues thérapeutiques prometteuses qui ciblent ce couple de récepteurs pour les mêmes raisons que les nôtres, mais dans des contextes différents.

1.7 $\alpha_4\beta_1$ / VCAM-1, cible thérapeutique prometteuse

L'implication de $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 dans plusieurs maladies inflammatoires en fait une cible de choix depuis 15 ans et de récentes études appuient son implication dans la tumorigénèse. Plusieurs compagnies pharmaceutiques se sont mises en lice afin de générer des inhibiteurs efficaces et le plus connu de tous, qui est d'ailleurs commercialisé, est le Natalizumab (TYSABRI™, Elan Pharmaceuticals et Biogen Idec). C'est un anticorps humanisé qui lie la sous-unité α_4 et empêche donc la formation du complexe $\alpha_4\beta_1$. C'est un inhibiteur approuvé par la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) pour le traitement de la sclérose multiple (SM) et la maladie inflammatoire de l'intestin (MII) [110]. Le Natalizumab peut bloquer la liaison de α_4 à VCAM-1 et MADCAM-1, les deux molécules d'adhésion impliquées dans le trafic leucocytaire des organes lymphoïdes associés aux intestins ainsi qu'aux sites inflammatoires. Selon le site internet accessible au public de l'institut de santé des États-Unis d'Amérique (clinicaltrials.gov), Biogen Idec a mené des études cliniques additionnelles afin de tester l'utilité du Natalizumab en tant que thérapie potentielle pour les cas de myélomes multiples (MM) [204]. Les modèles animaux de MM ont révélé qu'un traitement anti- α_4 a réduit la croissance des MM dans la moelle osseuse [111-113].

Cet effet suppresseur est dû au blocage de 1) l'interaction cellules tumorales - cellules stromales de la moelle osseuse et 2) cellules tumorales - protéines de la MEC [113-117]. Le point faible de plusieurs de ces études est, à mon avis, l'emploi, peut-être par erreur de

terminologie, de "cellules stromales". Bien que juste, ce terme regroupe plusieurs types cellulaires, notamment des Fbs, des cellules endothéliales et des cellules inflammatoires. Parler d'une interaction cellule tumorale - cellule stromale n'est pas exclusive puisque cette terminologie regroupe plusieurs interactions différentes aux implications cellulaires et moléculaires tout aussi différentes. En fait, ce sont des conclusions qui demeurent nébuleuses. Notre projet propose une approche unique en ciblant un type cellulaire particulier du stroma tumoral dans l'évaluation des interactions cellules tumorales - cellules stromales.

On compte également de petites molécules inhibitrices dirigées contre la sous-unité α_4 et élaborées par une approche mimétique de structure. Les plus documentées sont des dérivés peptidiques qui correspondent à des variantes de la séquence LDV (les mimétiques phenyluriedo-LDV). On retrouve également des dérivés peptidiques cycliques avec un mimétique de la séquence RGD qui permettent l'inhibition simultanée des intégrines $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$ [118] et qui suscitent l'intérêt de Genentech et Roche, d'AstraZeneca, de Pfizer et de Novartis. Finalement, et ce n'est point le moindre, ISIS Pharmaceuticals a mis au point des oligonucléotides antisens dirigés contre α_4 (ISIS 107248) et VCAM-1 (ISIS 18155) qui, lorsqu'administrés à 8mg/kg i.v ont significativement inhibé le nombre de lymphocytes circulant ainsi que le score inflammatoire dans un modèle animal de MII induit par l'indométacine [119].

1.8 L'empéripolèse, des structures "cellule-dans-cellule"

L'empéripolèse est d'abord et avant tout un phénomène observé en histopathologie et qui correspond à l'internalisation d'une cellule dans le cytoplasme d'une autre cellule de plus grand diamètre et ce, autant dans des conditions bénignes que malignes. Elle a vu le jour en 1956 par Humble pour décrire les mouvements de cellules viables après leur internalisation et elle est souvent utilisée comme terme général faisant référence à l'entrée, le mouvement et la sortie d'une cellule d'une autre cellule [120]. L'empéripolèse est souvent associée à la maladie de Rosai-Dorfman et est considérée comme son principal outil diagnostique [121, 122]. Par

opposition à la phagocytose qui demeure le programme d'internalisation cellulaire le mieux caractérisé, soit l'englobement et la dégradation de cellules mortes, mourantes ou dysfonctionnelles en réponse aux signaux apoptotiques émis par ces dernières, les cellules internalisées par empéripolèse demeurent viables, manifestent des mouvements à long-terme, se divisent et occasionnellement, échappent à l'internalisation [123]. Dans ces structures portant le nom de "*cell-in-cell structures*" (structures cellule-dans-cellule), plutôt que d'entrer dans les compartiments endolysosomiaux, les cellules demeurent dans le cytoplasme de la cellule hôte dans des structures similaires à des vacuoles [124-129]. Il a été rapporté que les mégacaryocytes, les monocytes, les histiocytes, les Fbs et les cellules malignes sont capables d'empéripolèse en supportant des cellules hématopoïétiques viables dans leur cytoplasme [120, 130-134].

Une étude récente a prouvé que l'empéripolèse n'est pas un processus cellulaire exclusif à la maladie Rosai-Dorfman. En effet, grâce à la microscopie électronique, cette équipe a rapporté la présence de cellules de lymphome humain (lymphome non-hodgkinien) internalisés dans le cytoplasme d'histiocytes [135]. Les mécanismes responsables de la formation de ces structures cellule-dans-cellule sont encore méconnus; plusieurs études se sont simplement basées sur la viabilité des cellules internalisées pour proposer un mécanisme d'invasion de l'hôte par la cellule cible [120, 125, 136-139].

D'ores et déjà, on peut émettre l'hypothèse que l'empéripolèse est le résultat de la migration transcellulaire, soit une migration non jonctionnelle, à travers le corps cellulaire d'une cellule donnée. Intuitivement, on peut imaginer une contrainte physique de taille. Dans les empéripolèses hétérotypiques (2 types cellulaires différents), il serait logique de penser que la cellule hôte devrait arborer un plus grand diamètre que la cellule cible qui, ultimement, se retrouverait dans son cytoplasme. Cette contrainte physique réduit donc le nombre d'empéripolèses hétérotypiques qu'on pourrait rencontrer. En effet, la compilation des cas d'empéripolèse hétérotypique effectuée par Overholtzer et al. montre que les cellules cibles sont presque toujours des leucocytes [123]. Ces derniers font plus ou moins 8 μm de diamètre ce qui leur permet de circuler facilement dans les capillaires ou les vaisseaux sanguins de plus grand diamètre. Par contre, les cellules tumorales font presque le double de ce diamètre ce qui

constitue une contrainte physique autant dans le passage transcellulaire ou empéripolèse que dans la microcirculation [140]. L'empéripolèse est divisée en deux grandes catégories : 1) internalisation dans une cellule hôte non néoplasique et 2) internalisation dans une cellule hôte néoplasique. Parmi les cas d'empéripolèse dans des cellules non néoplasiques, on retrouve entre autres les Fbs qui internalisent des lymphocytes T [123].

Dans une précédente étude, nous avons observé que des Fbs cardiaques de rat étaient non seulement capables d'interagir avec les leucocytes, notamment les lymphocytes B et les neutrophiles, mais que cette interaction résultait en leur internalisation par les Fbs [1]. Cette étude nous a permis de mettre au jour 2 processus cellulaires indissociables: la migration transcellulaire et l'empéripolèse que je considère être deux cousins germains car l'un ne peut se produire sans l'autre. Nous avons également montré que les couples $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 et $\alpha_L\beta_2$ /ICAM-1 étaient impliqués dans ces processus. À ce jour, très peu d'études se sont intéressées à caractériser une interaction physique directe entre les cellules tumorales et les CAFs dans le stroma tumoral.

1.9 Importance variable du MET dans les cancers sanguins

Étant donné que cette étude concerne l'étude et la caractérisation de l'interaction des cellules de lymphome humain Ramos avec les Fbs, il est important de comprendre la typologie des cancers sanguins afin de pouvoir mieux comprendre et mettre en perspective le comportement des Ramos *in vitro*.

Les cancers sanguins se développent dans des microenvironnements tissulaires spécialisés tels que la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires. Ces microenvironnements sont caractérisés par différentes populations de cellules stromales accessoires et de cellules T qui interagissent avec les cellules malignes pour promouvoir la croissance tumorale et la résistance thérapeutique [141, 142].

Une des particularités des cellules sanguines malignes est qu'elles présentent un grand degré de variabilité quant à leur dépendance vis-à-vis des signaux oncogéniques émanant du MET. Plus précisément, durant la croissance et la progression tumorale, l'affinité et la dépendance des cellules malignes vis-à-vis du stroma tumoral peuvent changer en fonction du temps et avec l'évolution concomitante de sous-clones tumoraux à la fois dépendants et indépendants dudit stroma. La littérature rend compte de 3 principales catégories décrivant les relations entre les cellules sanguines néoplasiques et le MET.

La première considère un environnement dysfonctionnel au sein duquel les cellules néoplasiques s'engagent dans des interactions "dérégulées" avec le stroma tumoral, interactions qui fournissent les signaux oncogéniques de croissance et de résistance thérapeutique [143]. La leucémie aiguë et le syndrome myélodysplasique sont des exemples typiques où les cellules de souche leucémiques (LSC) s'échappent du contrôle étroit et régulé de croissance et de prolifération des niches hématopoïétiques pour s'implanter dans d'autres environnements de support hématopoïétique.

La seconde rend compte d'une coexistence régulée entre le microenvironnement et les cellules sanguines malignes, notamment au sein des leucémies lymphocytiques chroniques (CLL), des lymphomes folliculaires (FL), des lymphomes des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) et des myélomes multiples (MM). La particularité de cette catégorie est que les cellules malignes et le microenvironnement s'engagent dans des interactions qui sont, en tout point, similaires à celles engagées par leurs homologues, les lymphocytes B, avec leur environnement respectif [143]. Il s'en suit que la capacité proliférative des cellules malignes dépend de signaux externes de l'environnement, notamment via des antigènes, des cytokines et des contacts cellule-cellule.

La troisième catégorie a pour exemple typique les lymphomes humains de type Burkitt. Cette catégorie témoigne d'une perte d'interconnexions avec le réseau microenvironnemental résultant d'une aberration génique qui confère aux cellules malignes un avantage prolifératif largement autonome et indépendant des signaux du microenvironnement. Grâce à une translocation chromosomique menant à l'activation du gène *c-myc*, les cellules malignes de

type B acquièrent une capacité hyperproliférative autonome [143]. Dans cette catégorie, le MET est rapporté pour avoir un rôle minimal dans la planification de stratégies thérapeutiques. Justement, Ramos est une lignée de cellules invasives obtenue de lymphomes humains, elle est classée dans la catégorie des lymphomes de Burkitt et dérive d'un petit garçon caucasien de 3 ans.

2 Hypothèse et objectifs de travail

Le premier volet de notre hypothèse est que *l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ par les cellules tumorales pourrait leur permettre d'émigrer de la circulation sanguine vers n'importe quel tissu cible où l'expression de VCAM-1 a été induite ce qui constituerait une étape importante dans l'établissement de lésions métastatiques et supporterait l'hypothèse d'adressage cellulaire et tissulaire énoncée par Stephen Paget*. En effet, un MET qui exprimerait de hauts niveaux de VCAM-1 serait favorable à l'implantation de cellules hautement métastatiques reconnues pour surexprimer $\alpha_4\beta_1$. Étant donné que les CAFs constituent le type cellulaire dominant du stroma tumoral, que l'expression génique de VCAM-1 est régulée à la hausse par rapport aux Fbs quiescents, nous soutenons qu'une interaction physique directe entre les CAFs et les cellules tumorales exprimant $\alpha_4\beta_1$ est non seulement possible mais pourrait endosser un rôle prépondérant dans le processus de dissémination métastatique et plus particulièrement, d'adressage cellulaire et tissulaire.

Comme nous l'avons montré dans une précédente étude, les leucocytes interagissent avec les Fbs qui expriment VCAM-1, que cette expression est modulable par le TNF- α et que cette interaction se traduit ultimement par l'empéripolèse des leucocytes par les Fbs. Il est donc plausible que, comme les leucocytes, les cellules tumorales hautement invasives exprimant $\alpha_4\beta_1$ puissent interagir avec les Fbs et être internalisées par empéripolèse. Le deuxième volet de notre hypothèse est que les Fbs se comporteraient comme des cellules endothéliales en constituant peut-être une **barrière stromale perméable** dans le stroma tumoral que les cellules tumorales doivent nécessairement franchir pour envahir un tissu comme elles le font avec la **barrière endothéliale** à l'interface sanguine.

Considérant que : 1) plusieurs cellules tumorales invasives surexpriment $\alpha_4\beta_1$, 2) que l'interaction Fb-leucocyte se fait via le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1, 3) pour envahir un tissu, les cellules tumorales invasives, comme les leucocytes, doivent nécessairement transmigrer à travers l'endothélium, 4) les Fbs, lorsque stimulés au TNF- α , se comportent comme des cellules endothéliales et augmentent leur niveau d'expression de VCAM-1, 5) les CAFs sont

un constituant important du stroma tumoral; nous pensons que les Fbs pourraient jouer un rôle crucial dans le processus métastatique, d'une part en tant que partenaire d'interaction directe des cellules tumorales et d'autre part, en favorisant leur passage.

Notre hypothèse globale soutient que *l'interaction et la transmigration subséquente des cellules tumorales à travers les CAFs dans le stroma tumoral constituent un des processus cellulaires impliqués dans la cascade métastatique.* Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons sélectionné plusieurs lignées de cellules tumorales pour leurs propriétés métastatiques ainsi que pour leur niveau d'expression de $\alpha_4\beta_1$, soient les cellules de mélanome de souris (B16F1 et B16F10), de mélanome humain (BLM, MV3, IF6, 530, WM9, 1205Lu, 451Lu), de carcinome mammaire (MDA-MB-231), d'adénocarcinome des ovaires (SKOV-3) et de lymphome humain (Ramos). Plusieurs objectifs spécifiques étaient visés : 1) évaluer le niveau d'expression de la sous-unité α_4 de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ au sein de chaque lignée; 2) évaluer et quantifier la capacité adhésive de chaque lignée aux Fbs; 3) évaluer si cette interaction serait modulable par une stimulation préalable des Fbs au TNF- α et par plusieurs cytokines et chémokines (IL-1, IL-6, C5a, PMA, SDF-1); 4) investiguer si cette interaction résulterait en une internalisation par les Fbs; 5) déterminer si le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 serait impliqué dans cette interaction; 6) essayer d'établir un modèle mimétique confirmant les résultats obtenus grâce à des billes fluorescentes de polystyrène tapissées de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$.

3 Matériels et méthodes

3.1 Cultures cellulaires

Les cultures primaires de Fbs cardiaques de rats sont préparées tel que déjà décrit [1]. Brièvement, le cœur de rat est digéré dans du milieu de culture Dubecco's minimal essential medium (DMEM) contenant de la collagénase de type II et de la trypsine. Les cellules sont ensuite mises en culture dans du DMEM supplémenté de 0.2% d'albumine sérique de boeuf (BSA), de 10% de sérum fœtal bovin (FBS) ainsi que d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les cellules sont utilisées entre les passages 1 et 4. Les fibroblastes humains de la peau sont une gracieuseté du Dr. J. Genest Jr. (Université McGill, Montréal, Qc). Les Fbs stromaux murins de la moelle osseuse (M2-10B4) ont été achetés chez ATCC (Manassas, VA) et entretenus dans du RPMI-1640 supplémentés de 0.2% BSA, 10% FBS et des antibiotiques. Les lymphoblastes non adhérents humains RAMOS (RA-1) ont été achetés chez ATCC et entretenus dans du RPMI-1640 supplémentés de 0.2% BSA, 10% FBS, β -mercaptoéthanol et des antibiotiques. Les cellules de mélanome de souris B16F1 (don du Dr. Nabil Seidah, IRCM) et B16F10 (ATCC Manassas, VA), de mélanomes humains WM9, 1205Lu, 451Lu, IF6 et BLM, MV3, 530 (don du Dr M. Herlyn, The Wistar Institute, Philadelphia, PA), de carcinomes mammaires (MDA-MB-231, HTB26, ATCC Vanassas, VA), et d'adénocarcinome des ovaires (SKOV-3) ont été maintenues en culture dans du DMEM supplémenté de 10% de FBS ainsi que d'antibiotiques. Tous les types cellulaires ont été incubés à 37 °C en présence de 5% CO₂.

3.2 Anticorps et réactifs

Les anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre la sous-unité α_4 CD49d (clone P1H4), la sous-unité β_1 CD29 (clone BV7 et HUTS), la sous-unité β_2 CD18 (clones TS1/18 et MEM48), VCAM-1 (clones 5F10, 51-10C9 et 429MVAM.A), vimentine (clone V9), pan-cadherine (clone CH-19), $\alpha_v\beta_3$ (clone LM609), CS-1, MADCAM-1 (clone

MECA367), CD44 (Clone IM7), ICAM-1 (clone M19), JAM-B (clone CRAM-19), ALCAM-1, Cd62L (clone OX85), Cd62E (clone 10E9.6) et β_7 (clone FIB504), tubuline (clone BMIA + BMIB), phalloïdine, ont été achetés chez Cederlane (Hornby, ON), AbD Serotec (Raleigh, NC), Millipore/Chemicon (Billerica, MA), Covance (Berkely, CA) ou Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). Les marqueurs cellulaires Far Red DDAO-SE, Oregon Green, et les anticorps secondaires (Alexa488, rhodamine, Alexa555) ont été achetés chez Invitrogen / Molecular Probes (Eugene, OG). $MnCl_2$ (2 mM), EDTA (10 mM), $CaCl_2$ (5 mM), TNF- α (10 ng/mL), PMA (10^{-8} M), SDF-1 α (12.5 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL), et CS-1 (12.5 μ M) de Sigma (St. Louis, MO) et Fisher (Toronto, ON).

3.3 Isolation des lymphocytes B

Les lymphocytes B sont isolés à partir du sang périphérique total de rats anesthésiés à la kétamine et xylazine. Brièvement, le sang est collecté de l'aorte abdominale en présence de 2.7 mM d'EDTA. Par la suite, la fraction érythrocytaire est éliminée par lyse en présence de NH_4Cl . Les lymphocytes B sont alors isolés grâce à une sélection positive au CD45RA (OX-33, Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX) qui est complexé à des billes magnétiques et collectés sur un séparateur cellulaire autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). La pureté de la fraction de lymphocytes B est supérieure à 85%.

3.4 Cytométrie en flux

3.4.1 Observation et quantification de l'interaction Fb-cellule tumorale

La quantification de l'interaction cellule tumorale-Fb a été réalisée par cytofluorométrie telle que déjà décrite [1]. Brièvement, les Fbs et les cellules tumorales sont d'abord pré-incubés en suspension pendant 30 min en présence de fluorophores, respectivement 1 μ M CellTrace Far Red DDAO-SE/ 3×10^6 Fbs et 1 μ M CellTrace Oregon Green/ 3×10^6 cellules tumorales le tout dans du PBS. Les cellules sont par la suite lavées avec du PBS puis resuspendues dans du DMEM + 2% Calf Serum (CS). Cinquante mille Fbs sont alors incubés

en présence de 2×10^5 cellules tumorales selon un ratio optimal prédéterminé de 1:4 pendant 1 h dans un volume final de 100 μ l. En fin d'incubation, les cellules sont fixées par l'ajout de 100 μ l de paraformaldéhyde 4%. L'interaction Fb-cellule tumorale est analysée sur un cytofluoromètre Cyan (Dako, Carpinteria, CA). La population doublement positive pour les deux fluorophores DDAO⁺/OG⁺ dans le quadrant supérieur droit de la figure 5 correspond à l'interaction positive entre les deux types cellulaires et est quantifiée en % par rapport à la population totale de Fbs identifiée et isolée dans les quadrants supérieurs. Dans cet exemple, le quadrant R8, soit DDAO⁺/OG⁺, correspond à 62.48% des Fbs ayant interagi avec les Ramos. Cette interaction cellule-cellule a été confirmée antérieurement par microscopie confocale et électronique [1]. Les populations d'intérêt sont cernées grâce à des contrôles cellulaires contenant l'un ou l'autre des marqueurs et en utilisant des portes de fluorescence assurant une reproductibilité accrue des résultats.

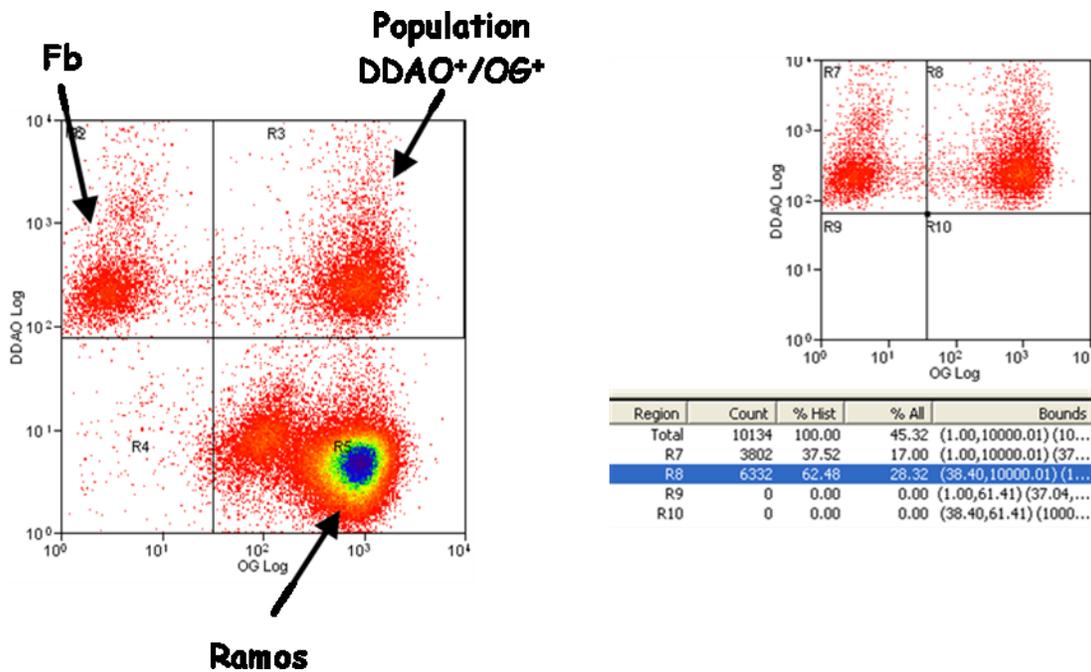


Figure 5: illustration de la méthodologie de quantification de l'interaction cellule tumorale- Fb.

Mentionnons toutefois que nous avons préalablement effectué une mise au point avec plusieurs lignées cellulaires tumorales pour arriver au ratio optimal de 1:4. Les ratios 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 et 1:6 ont été essayés et le pourcentage d'interaction le plus élevé en absence de saturation a été observé pour le ratio 1:4 surtout que les quantités cellulaires s'avéraient plus

raisonnables, soit 50 000 Fbs pour 200 000 cellules tumorales. Chaque condition expérimentale est réalisée en triplicata et chaque expérience réalisée au moins en triplicata. En ce qui a trait aux expériences de blocage des récepteurs de surface par l'ajout d'anticorps bloquants, le même protocole a été utilisé avec une étape supplémentaire d'incubation préalable des cellules en présence d'anticorps bloquants dans des conditions saturantes à $6 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cellules pendant 30 min dans du DMEM + 2% CS suivie d'une étape de lavage pour enlever l'excédent d'anticorps avant la mise en contact des deux types cellulaires.

3.4.2 Détection de l'expression des intégrines et des molécules d'adhésion

Pour évaluer l'expression des intégrines à la surface des cellules tumorales et celle des molécules d'adhésion à la surface des Fbs, nous avons utilisé des anticorps à une concentration de $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cellules. Cent cinquante mille cellules tumorales sont incubées avec l'anticorps primaire dans 200 μl DMEM + 2% CS pendant 30 min, lavées avec du DMEM + 2% CS puis incubées une deuxième fois pendant 30 min en présence de l'anticorps secondaire (Alexa488) dans un volume finale de 100 μl toujours selon une concentration $1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cellules. Les cellules sont alors fixées par l'ajout de 100 μl de paraformaldéhyde 4% puis analysées sur le cytofluoromètre Cyan (Dako, Carpinteria, CA).

3.5 Transfection

Le plasmide pCMV6-XL5 correspond au vecteur plasmidique vide (OriGene Tehnologies, Rockville, MD, USA) et le vecteur pCMV6-VCAM-1 comporte l'ADNc humain complet de VCAM-1 (NM_001078.2). Pour les expériences de transfection transitoire, nous avons utilisé la Lipofectamine²⁰⁰⁰ (Invitrogen). Les Fbs ont étéensemencés dans des plaques de 6 puits à une densité de 6×10^5 cellules/puit et mis en culture dans du DMEM supplémenté de 10% FBS en absence d'antibiotique selon les instructions du manufacturier. Après 24 h, les cellules sont transfectées avec 5 μg d'ADN/puit dans de l'Opti-MEM selon un ratio ADN/Lipofectamine 1:3. Le milieu de culture est changé 5 h après la transfection et l'expérience est réalisée 24 h post-transfection. Le protocole de quantification de l'interaction

Ramos-Fb est alors suivi ainsi que celui de blocage avec un anticorps bloquant dirigé contre VCAM-1.

3.6 Microscopie Confocale

3.6.1 Visualisation et analyse 3D de l'empéripolèse

Cent mille Fbs sont mis en culture jusqu'à confluence dans des chambres Lab-Tek 8 puits tapissés de fibronectine (Nalge Nunc International, Rochester NY) dans du DMEM + 10% FBS + antibiotiques tel que déjà décrit. Après 24 h, les Fbs sont mis à jeun dans du milieu dépourvu de FBS et 5 h plus tard, ils sont marqués avec 1 μ M cellTrace Oregon Green et les Ramos avec 1 μ M Far Red DDAO-SE pendant 30 min dans du PBS. Par la suite, la monocouche est lavée avec du PBS tiédi et 3×10^5 Ramos sont ajoutés à celle-ci dans un volume total de 150 μ l et rapidement sédimentés à faible vitesse (900 rpm) pendant 30 sec puis incubés 45 min à 37 °C et 5% CO₂. Après l'incubation, les puits sont remplis de milieu, scellés avec du ruban adhésif et centrifugés dans le but d'éliminer les cellules faiblement adhérentes. Le but est de conserver les cellules fortement adhérentes, celles en voies d'empéripolèse et celles totalement internalisées. L'adhésif est ensuite retiré, la monocouche est lavée puis fixée pendant 10 min à la paraformaldéhyde 4%. Les lames sont ensuite lavées au PBS, une goutte de SlowFade (Molecular Probe) est ajoutée à chaque puit, le SlowFade empêchant le blanchiment des fluorophores, puis une lamelle est superposée à la lame tout en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air qui altèreraient la visualisation des structures au microscope vidéo confocal inversé A1 de Nikon (logiciel LSM710 de Zeiss pour la prise ainsi que l'analyse des images).

3.6.2 Visualisation des molécules d'adhésion, de la β -caténine et de la vimentine

Quelques étapes sont ajoutées au protocole précédent. Après fixation de la monocouche les cellules sont perméabilisées au triton 2% car la détection de la β -caténine et de la vimentine nécessitent un marquage intracellulaire. Les cellules sont ensuite lavées au

PBS et incubées 1 h en présence de l'anticorps primaire selon 0.5 µg/puit dans un volume total de 100 µl de PBS supplémenté de 2% CS pour éviter des interactions non spécifiques. La monocouche est ensuite lavée au PBS 3 fois puis réincubée en présence de l'anticorps secondaire selon la même concentration. Pour les marquages de colocalisation de la sous-unité α_4 et de VCAM-1, la monocouche n'est perméabilisée qu'à la fin du marquage afin de permettre la coloration des noyaux au DAPI (rose). Le défi lors de ces marquages consistait à ajuster les anticorps secondaires afin de pouvoir visualiser simultanément plusieurs cibles d'intérêt. Ainsi, la sous-unité α_4 était complexée à un anticorps secondaire Alexa488 (vert), VCAM-1 à un Alexa555 (rouge), et les noyaux cellulaires au DAPI (rose). La superposition des marqueurs vert et rouge donne une couleur jaune indiquant la colocalisation de la sous-unité α_4 et VCAM-1.

3.6.3 Visualisation de l'empéripolèse en temps réel

Les Fbs sontensemencés sur des pétris µ-Dish^{35mm,high} (des pétris 35 mm spécialement conçus pour l'imagerie et munie d'une surface traitée ibiTreat, d'*Ibidi*, Applied Biophysics Inc. Troy, NY) à une densité de 7.5×10^4 Fbs/cm² et sont mis en culture pour 2 jours dans du DMEM supplémenté de 10% FBS en présence d'antibiotiques. Les Fbs sont ensuite privés de sérum pour 5 h puis stimulés par le TNF- α (10 ng/mL). Le jour de l'expérience, ils sont lavés au PBS puis marqués au CellTrace Oregon Green à 1 µM dans du PBS pour une durée de 30 min. Simultanément, les Ramos sont marqués au Far Red DDAO-SE dans les mêmes conditions, lavés au PBS puis resuspendus dans du DMEM complet à 37C° en présence de MnCl₂ puis ajoutés à la monocouche de Fbs sans centrifugation. Le pétri est ensuite placé dans une chambre à 5% CO₂. Les cellules sont alors visualisées en continu par microscopie confocale sur un microscope inversé A1 de Nikon (logiciel LSM710 de Zeiss). Cinq points aléatoires fixes (x_1, y_1, x_2, y_2 , etc.) sont alors sélectionnés sur la monocouche de Fbs d'une épaisseur de 30 µm. Le logiciel est programmé pour effectuer une analyse 3D de chaque point selon 25 tranches horizontales de 1 µm (Δz) à un intervalle de 5 minutes et ce, durant 28 cycles, totalisant ainsi 140 minutes.

La vidéo est présentée sur un support DVD dans une pochette en annexe II.

3.7 Billes de polystyrène tapissées de $\alpha_4\beta_1$

Afin d'évaluer la pertinence de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ dans l'adhésion des cellules Ramos aux Fbs, nous avons créé un système artificiel imitant les cellules Ramos. À cette fin, des billes fluorescentes de polystyrène sont couvertes d'intégrine $\alpha_4\beta_1$ recombinante, incubées avec des Fbs, puis l'internalisation est visualisée et quantifiée par microscopie confocale. Différents agents ont aussi été utilisés afin de moduler positivement ou négativement l'attachement des billes.

Des billes FluoSphères carboxylées bleues (50 μg , 2 μm de diamètre, absorption 365 nm et émission 415 nm, Life Technologies Inc., Burlington, ON), préalablement lavées, sont incubées dans 100 μl de tampon phosphate 0.05 M, pH 7.4, 0.9% NaCl avec 5 μg d'intégrine $\alpha_4\beta_1$ humaine recombinante (R&D systems Inc., Minneapolis, MN) pour 1 h sous agitation douce. Après lavage, les billes sont déposées sur une monocouche de Fbs, préalablement chargés de colorant Oregon Green, dans des puits Lab-Tek. Après une incubation de 1 h à 37°C, les cellules sont fixées à la paraformaldéhyde 4% puis examinées au microscope confocal. Le nombre d'inclusions par champs de 0.045 mm^2 est répertorié.

L'interaction billes-Fbs ou BP- $\alpha_4\beta_1$ -Fbs a aussi été quantifiée par cytofluorométrie en mesurant le pourcentage de la population de Fbs portant les 2 traceurs fluorescents tel que décrit pour l'interaction Ramos-Fb. Comme contrôles négatifs, des billes ont été soit saturées avec 100 μg de BSA ou incubées avec l'intégrine recombinante inactivée pour 1 min à 100 °C. De plus, les billes ont été incubées en présence de 2 mM MnCl_2 , de 5 mM CaCl_2 ou d'anticorps bloquants (10 μg). Finalement, les Fbs ont aussi été stimulés avec le TNF- α (30 ng/mL).

3.8 Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyennes \pm écart type. Les expériences sont réalisées au moins 3 fois et les résultats représentatifs sont montrés. Les données brutes sont soumises soit au test de Student-t ou ANOVA 1-way, suivi par le test de Bonferroni grâce au logiciel Sigma STAT. Les valeurs $p \leq 0.05$ sont considérées comme significatives.

4 Résultats et analyse

Le point de départ de notre étude a été de sélectionner plusieurs lignées de cellules tumorales reconnues pour leurs propriétés invasives et pour l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, soient les cellules de mélanomes de souris (B16F1 et B16F10), de mélanomes humains (BLM, MV3, IF6, 530, WM9, 1205Lu, 451Lu), de carcinome mammaire humaine (MDA-MB-231), d'adénocarcinome des ovaires humaines (SKOV-3) et de lymphome humain (Ramos). Nous avons par la suite quantifié la capacité adhésive de ces lignées aux Fbs et évalué le niveau d'expression de la sous-unité α_4 de l'intégrine par cytofluorométrie. Ces résultats ont constitué les préliminaires de ce projet.

Comme indiqué à la figure 6, il semble y avoir une relation non-linéaire positive entre le niveau d'expression de la sous-unité α_4 de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ et la capacité des cellules tumorales à interagir avec les Fbs. Autrement dit, plus le niveau d'expression de la sous-unité de α_4 à la surface des cellules tumorales est élevé plus grande sera la capacité adhésives de ces cellules aux Fbs. En effet, les B16F10, B16F1 et Ramos sont respectivement les lignées qui présentent le plus haut niveau d'adhésion aux Fbs avec les niveaux d'expression respectifs de la sous-unité α_4 parmi les plus élevés. À l'inverse, la lignée MDA-MB-231 reconnue pour ne pas exprimer l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ et utilisée comme contrôle négatif dans notre expérience, n'a présenté aucune adhésion aux Fbs. Ce résultat a renforcé notre enthousiasme face à notre hypothèse.

Le cas de la lignée BLM nous a intrigués, cette lignée interagit avec les Fbs mais nous n'avons pas détecté d'expression de la sous-unité α_4 . Deux suppositions pourraient expliquer ce résultat: soit que d'autres molécules d'adhésion sont impliquées (notamment l'intégrine $\alpha_5\beta_1$) ou soit que, pour une raison inconnue, notre anticorps n'ait pas reconnu la sous-unité α_4 . Ainsi, il a été rapporté que l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ puisse exister sous différentes conformations et d'état d'affinité [96]. Il est donc possible que l'anticorps n'ait pas reconnu la sous-unité α_4 . À l'inverse, la lignée MV3 exprime un haut niveau de la sous-unité α_4 par rapport à sa capacité

adhésive aux Fbs. Il est possible que sur cette lignée cellulaire, l'intégrine soit détectable mais se présente dans un état de faible affinité de liaison.

Nous avons sélectionné les Ramos pour le restant de notre étude pour plusieurs raisons: d'abord, parce que nous avons déjà travaillé avec leurs homologues non cancéreux, les lymphocytes B, que nous isolions sélectivement ($CD45RA^+$) en laboratoire à partir du sang total de rat. Cette lignée permettait donc une étude comparative quant à l'interaction Fb-lymphocytes B et Fb-lymphome. De plus, les molécules d'adhésion cellulaire, et particulièrement les intégrines, sont très sensibles aux multiples traitements qu'exigerait une lignée adhérente; les Ramos étant en suspension, leur culture et leur traitement est plus simple et exige moins de manipulations. Pour terminer, c'est une des lignées qui présente un bon ratio entre le niveau d'expression de la sous-unité α_4 et la capacité adhésive aux Fbs comme l'indique la figure 6.

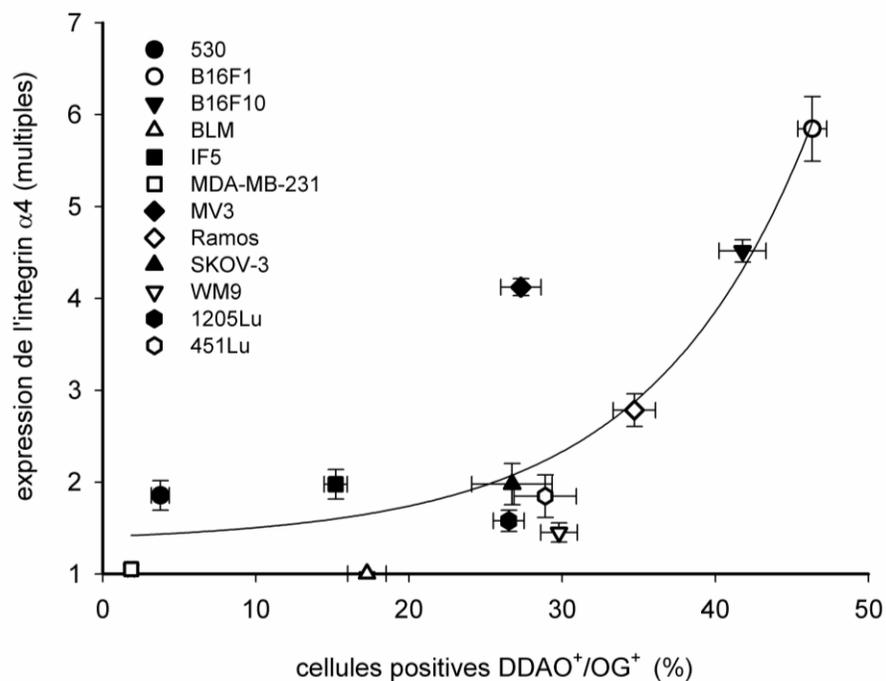


Figure 6: Corrélation positive entre le niveau d'expression de la sous-unité α_4 et la capacité adhésive de 12 lignées cellulaires hautement invasives. Le niveau d'expression de la sous-unité α_4 de $\alpha_4\beta_1$ est exprimé en fonction du pourcentage (%) de capacité adhésive des 12 lignées tumorales identifiées par la population DDAO⁺/OG⁺ (n=3).

Notre premier objectif consistait à comparer la modulation de la capacité adhésive des Ramos avec celle des lymphocytes B isolés sélectivement du sang total de rat. La figure 7 montre d'abord que l'interaction Fb-lymphocyte B reproduit les résultats rapportés antérieurement, à savoir que les lymphocytes interagissent fortement avec les Fbs et que cette interaction est modulable par le TNF- α et le PMA [1]. Les Ramos semblent se comporter comme leurs homologues non cancéreux. En effet, une augmentation significative de la capacité adhésive des Ramos est observée en réponse à une stimulation préalable des Fbs par le TNF- α , lequel est reconnu pour induire et réguler à la hausse les molécules d'adhésion, notamment ICAM-1 et VCAM-1. Par contre, le PMA n'a stimulé que l'adhésion des lymphocytes B, comme le montre l'augmentation significative de l'interaction en présence de PMA seul et une augmentation significative additionnelle lorsque combiné au TNF- α . Le PMA n'a eu aucun effet sur la capacité adhésive des Ramos.

Le PMA est un puissant activateur des lymphocytes par l'hydrolyse rapide des phospholipides inositols en diacylglycérol et en phosphates inositols par la phospholipase C (PLC). Le diacylglycérol est un activateur allostérique de la protéine kinase C (PKC) qui induit la sécrétion et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire lequel induit toute une cascade de réponses cellulaires additionnelles aboutissant à une activation lymphocytaire. Le PMA présente une structure analogue au diacylglycérol et induit l'activation de PKC.

Les Ramos sont des cellules hautement invasives, il est donc raisonnable de penser que ces cellules sont déjà dans un très haut niveau d'activation et que le PMA n'apporte aucune stimulation. C'est ce qui expliquerait les différences observées dans la modulation adhésive des Ramos et des lymphocytes B.

Un contrôle positif supplémentaire (contrôle + MnCl_2) aurait dû être considéré. En effet, le manganèse est reconnu pour induire les intégrines dans leur état de haute affinité; ce contrôle supplémentaire nous aurait permis de mieux comprendre l'effet du PMA. Cette expérience marquait le début de cette étude, mais malgré ce petit handicap, elle nous a permis de quantifier la modulation de l'interaction Fb-Ramos et de confirmer que les Fbs répondent aux lymphocytes B ainsi qu'à leurs homologues cancéreux les Ramos de la même manière. Les couples CD11a-CD18/ICAM-1, CD11b-CD18/ICAM-1 et $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 seraient peut-

être impliqués dans cette interaction comme nous l'avions déjà montré pour les lymphocytes B lors d'une précédente étude [1].

Avant de poursuivre l'analyse des résultats, il est important de mentionner qu'une comparaison des profils d'interaction des leucocytes (cellules mononuclées et polymorphonucléaires du sang périphérique) et des cellules tumorales (B16F10, B16F1, Ramos) avec différentes souches de Fbs a été effectuée. En effet, des Fbs humains de la peau, des Fbs murins stromaux de la moelle osseuse (M2-10B4) et des Fbs cardiaques de rat nous ont permis d'observer des résultats similaires entre toutes ces souches de Fbs : 1) une interaction similaire avec les leucocytes et les cellules tumorales; 2) la même perméabilité dans les chambres de Boyden (Fbs de la peau et cardiaques), 3) la même régulation à la hausse de VCAM-1 suite à une stimulation inflammatoire et 4) les mêmes récepteurs de surface déployés dans l'interaction avec les leucocytes d'une part (Fbs de la peau et cardiaques) et les cellules cancéreuses d'autre part (Fbs cardiaques et stromaux murins). Ces observations suggèrent que cette interaction est autant inhérente aux Fbs qu'aux cellules tumorales.

Nous avons donc poursuivi notre projet avec les Fbs cardiaques pour 1) la facilité de culture et 2) les Fbs murins stromaux étaient plus récalcitrants à faire des monocouches homogènes essentielles à la visualisation des jonctions intercellulaires. En effet, ces Fbs présentaient un phénotype cellulaire allongé alors que les Fbs cardiaques, lorsque utilisés à un passage maximum de 4, nous permettaient l'obtention de monocouches homogènes et la possibilité de bien délimiter les jonctions intercellulaires.

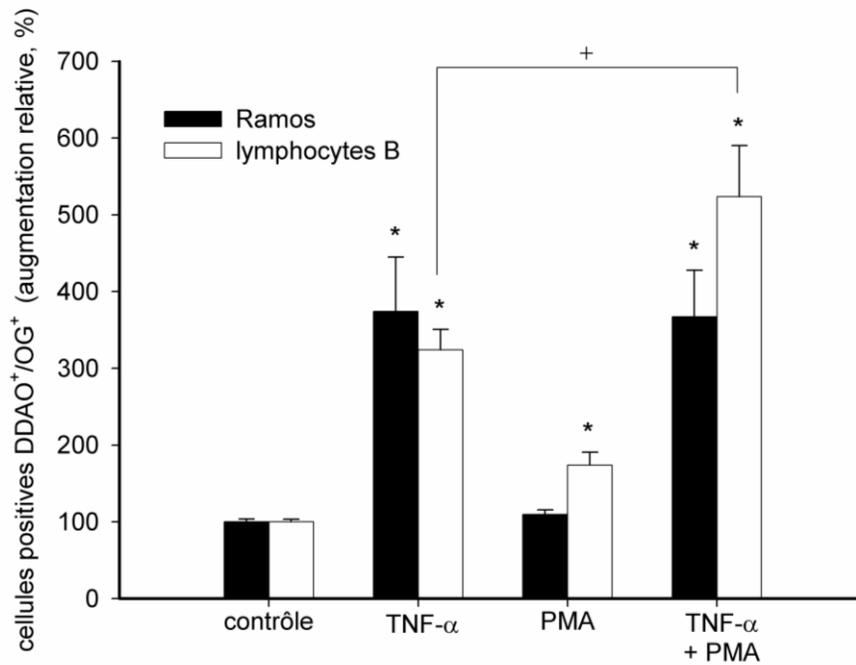


Figure 7: Comparaison de la capacité adhésive des lymphocytes B isolés du sang de rat (noir) et des lymphomes humains Ramos (blanc) avec les Fbs. Modulation de l'interaction par stimulation préalable des Fbs au TNF- α (30 ng/mL) et des Ramos ou des lymphocytes B au PMA (10^{-8} M) seul ou en combinaison. *SEM \leq 0.05 vs contrôle ; +SEM \leq 0.05 vs TNF- α ; (n=4).

Le prochain objectif en lice était de confirmer l'implication du contre-récepteur de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, soit VCAM-1, dans l'augmentation de l'interaction Fb-Ramos résultant d'une stimulation préalable des Fbs par le TNF- α . Pour ce faire, nous nous sommes concentrés sur la modulation de l'interaction en fonction du niveau d'expression de VCAM-1 par 1) stimulation au TNF- α des Fbs (figure 8) et 2) surexpression de VCAM-1 par transfection à la Lipofectamine (figure 9).

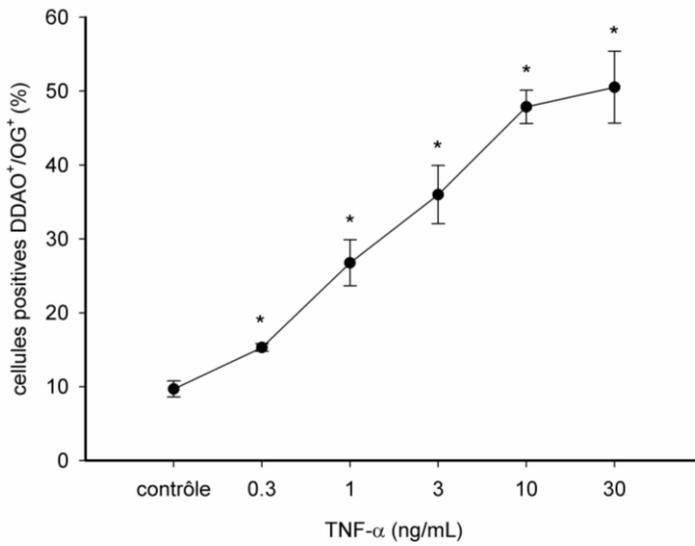
Nous avons donc stimulé les Fbs avec des concentrations croissantes de TNF- α (0.3 ng/mL à 30 ng/mL) et nous avons réalisé simultanément 1) des tests d'adhésion avec les Ramos et 2) un marquage de VCAM-1 à l'aide d'anticorps à la surface des Fbs suivi d'une analyse de son niveau d'expression par cytofluorométrie. Comme l'indique la figure 8A, l'augmentation dose-dépendante et significative de l'interaction Ramos-Fb s'accompagne d'une augmentation dose-dépendante du niveau d'expression de VCAM-1 à la surface des Fbs comme le montre la figure 8B. Cette association positive entre l'augmentation du niveau d'expression de VCAM-1 à la surface des Fbs et l'augmentation simultanée de la capacité adhésive des Ramos aux Fbs constituait un élément positif supplémentaire au renforcement de notre hypothèse.

Par la suite, nous avons surexprimé VCAM-1 à la surface des Fbs par transfection à la Lipofectamine (figure 9). Nous avons observé une augmentation significative de l'interaction Ramos-Fb (pCMV6-VCAM-1) en présence du vecteur muni de l'insert d'ADNc complet de VCAM-1 par rapport au contrôle + MnCl₂. Mentionnons toutefois une légère augmentation significative de l'interaction en présence du vecteur vide (pCMV6-XL5). Le traitement à la Lipofectamine est reconnu pour fragiliser la membrane plasmique et la réaction cellulaire primaire est de rapidement reprogrammer ses récepteurs de surface. Cette faible augmentation de l'interaction serait donc non spécifique. Finalement, la préincubation des Fbs-pCMV6-VCAM-1 avec un anticorps bloquant dirigé contre VCAM-1 dans des conditions saturantes a significativement réduit l'interaction Ramos-Fb(pCMV6-VCAM-1). Fait intéressant, le pourcentage d'interaction Ramos-Fb(pCMV6-VCAM-1) + VCAM-1-ab est significativement inférieur au contrôle ce qui suggère que l'anticorps a également bloqué l'expression basale de

VCAM-1 à la surface des Fbs. Autrement dit, l'anticorps a effectué un double blocage, il a bloqué le VCAM-1 induit et le VCAM-1 basal au sein de ces Fbs transfectés.

Ces deux résultats réunis, respectivement aux figures 8 et 9, permettent de conclure que l'augmentation de l'interaction Ramos-Fb suite à une stimulation par le TNF- α est bien le résultat de l'augmentation de l'expression de VCAM-1 à la surface des Fbs.

A)



B)

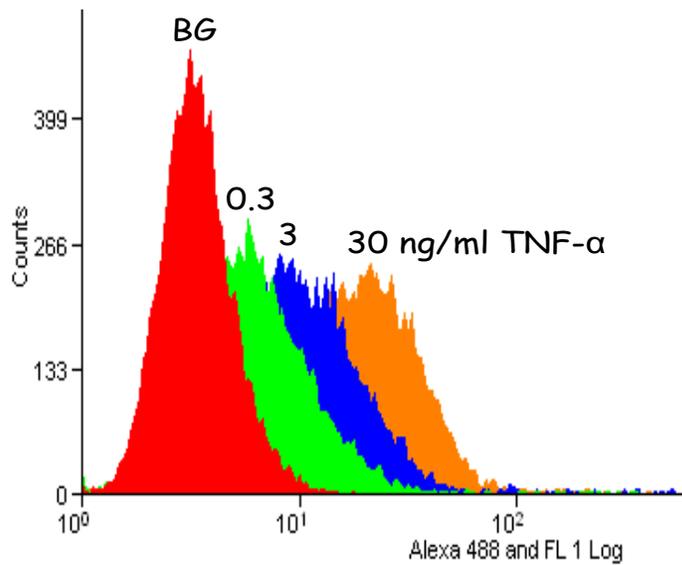


Figure 8: A) Quantification de l'interaction Ramos-Fb suite à une stimulation préalable des Fbs avec des concentrations croissantes de TNF- α (* $p \leq 0.05$ vs contrôle). B) Évaluation du niveau d'expression de VCAM-1 suite à une stimulation préalable des Fbs avec des concentrations croissantes de TNF- α (0.3 à 30 ng/mL) avec $n=6$.

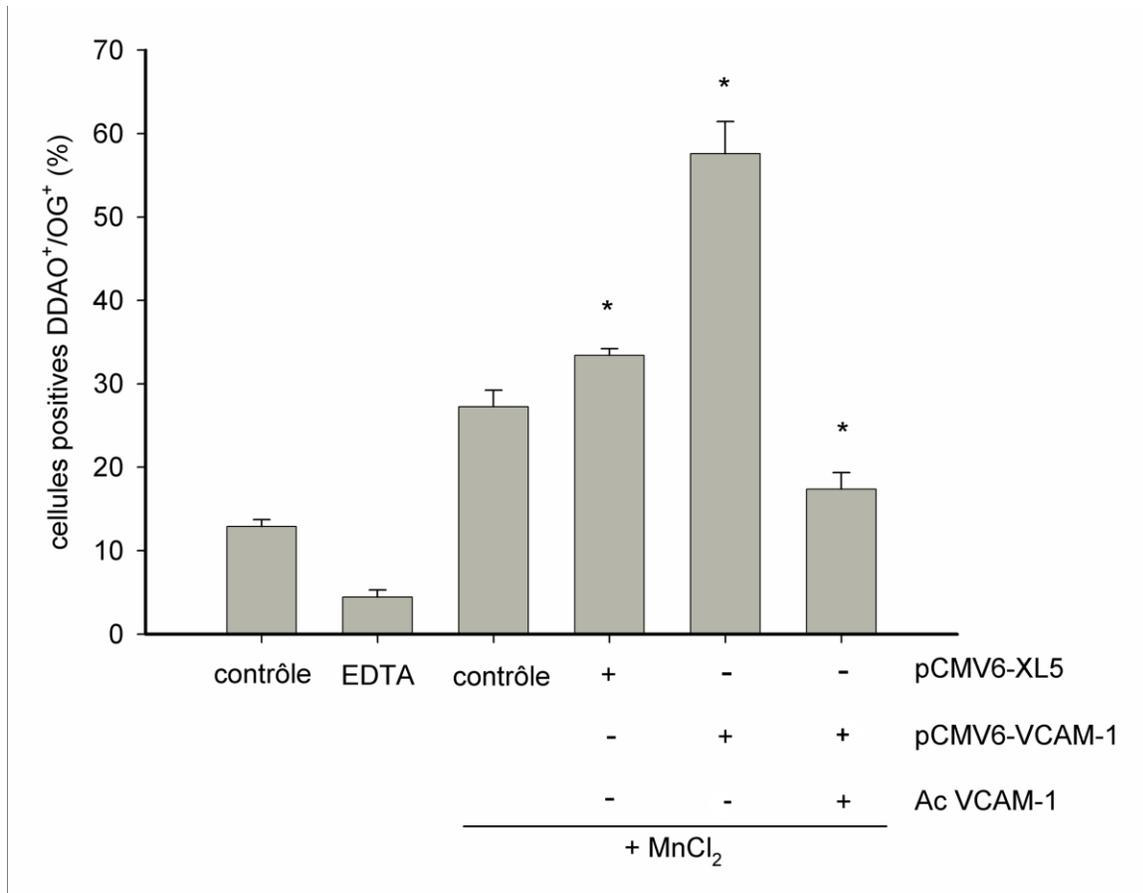


Figure 9: Modulation de l'interaction Ramos-Fb par la surexpression de VCAM-1 à la surface des Fbs par transfection d'un vecteur vide (pCMV6-XL5) et d'un vecteur contenant l'ADNc complet humain de VCAM-1 (pCMV6-VCAM-1). * $p \leq 0.05$ vs contrôle + $MnCl_2$ (2 mM). n=4.

Dans la suite logique de notre raisonnement, nous avons voulu examiner et étayer l'hypothèse de l'implication du couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 dans l'interaction Ramos-Fb grâce au blocage fonctionnel de VCAM-1 ainsi que des sous-unités α_4 et β_1 de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$. Pour ce faire, nous avons utilisé des anticorps bloquants dirigés contre les sous-unités α_4 et β_1 , seules ou en combinaison, et contre VCAM-1, seul ou en combinaison avec α_4 et β_1 . Les anticorps ont été utilisés dans des conditions saturantes, soit à $6 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cellules.

Nous avons sélectionné à la fois des contrôles négatifs et positifs. L'EDTA est reconnu pour être un puissant chélateur des cations divalents, nous l'avons donc utilisé comme contrôle négatif pour inactiver l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ et vérifier l'annulation de l'interaction. À l'inverse, le MnCl_2 a servi de contrôle positif, ce dernier étant un puissant inducteur de l'état de haute affinité des intégrines. Comme le montre la figure 10, l'EDTA a presque aboli l'interaction Ramos-Fb ce qui confirme que les molécules d'adhésion impliquées dans cette interaction sont bien de type intégrine. Nous observons également une augmentation de l'interaction Ramos-Fb en présence de MnCl_2 , condition qui a servi de contrôle pour les conditions suivantes. Nous avons également inclus une condition IgG afin d'écarter toutes les possibles interactions non spécifiques occasionnées par la présence de l'anticorps.

Comme le montre la figure 10, le blocage fonctionnel de la sous-unité α_4 d'une part, et VCAM-1 d'autre part, a significativement réduit l'interaction Ramos-Fb de 28% alors que le blocage de la sous-unité β_1 a réduit l'interaction de 80% sans réduction supplémentaire significative lorsque combinée à la sous-unité α_4 seule ou en combinaison avec VCAM-1.

Cette expérience a été réalisée plus de 3 fois et avec différentes souches de Fbs, des Fbs cardiaques, murins stromaux et humains de la peau. À ce point du projet, la reproductibilité de ce résultat imposait un fait indéniable: la sous-unité β_1 de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ est principalement impliquée dans l'interaction Ramos-Fb. Bien qu'elle puisse s'associer à plusieurs sous-unités α (α_1 à α_{11}), il n'en demeurait pas moins qu'elle assumerait, à elle seule, le poids de l'adhésion des Ramos aux Fbs.

Ces résultats nous ont permis de confirmer les précédents résultats soient que : 1) l'augmentation de l'interaction Ramos-Fb suite à une stimulation préalable des Fbs par le TNF- α est bien la conséquence de l'induction de l'expression de VCAM-1 (figure 7 et 8 soutenues par la figure 9) et 2) le contre-récepteur de VCAM-1, soit l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, est bien impliquée dans l'interaction comme le montre l'expérience de blocage (figure 10). Il semblerait toutefois que ce soit la sous-unité β_1 de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ à la surface des Ramos qui soit davantage impliquée dans cette interaction comme le montre la forte réduction de l'interaction de 80% en présence d'un anti- β_1 .

Le prochain objectif de notre projet consistait à déterminer, concrètement, à quoi correspondrait cette interaction d'un point de vue du devenir cellulaire des Ramos.

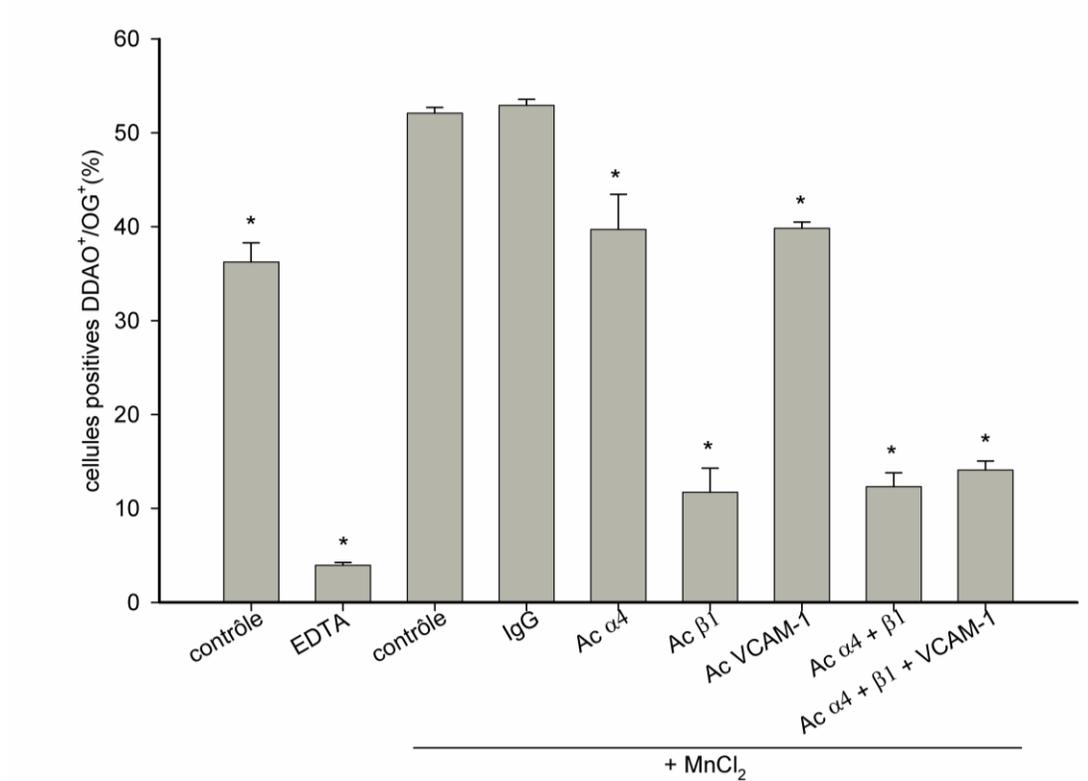


Figure 10: Confirmation de l'implication du couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 dans l'interaction Fb-Ramos par l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre les sous-unités α_4 et β_1 , seules ou en combinaison et contre VCAM-1, seule ou en combinaison avec les sous-unités α_4 et β_1 . Les anticorps sont utilisés dans des conditions saturantes ($6 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cellules). * $p \leq 0.05$ vs contrôle + MnCl₂ (2 mM); n=6.

La prochaine étape du projet devenait fort excitante: qu'advenait-il de cette interaction? Est-ce que les Ramos seraient internalisés dans le corps cellulaire des Fbs comme que nous l'avions observé avec leurs homologues non cancéreux les lymphocytes B? Est-ce que les Ramos seraient capables d'empéripolèse?

Nous avons donc effectué des tests d'adhésion sur lames dans les prochaines expériences et tenté d'examiner, grâce aux marquages des jonctions intercellulaires et des filaments intermédiaires, supplémentés d'analyses 3D, le devenir des Ramos adhérents aux Fbs.

Comme le montre la figure 11, l'analyse plus détaillée des tests d'adhésion sur lame des Ramos sur une monocouche de Fbs a révélé que les Ramos sont bel et bien capables de migrer à travers les Fbs autant par la voie paracellulaire (au niveau jonctionnel, indiqué par la flèche jaune) que transcellulaire (à travers le corps cellulaire, indiqué par la flèche blanche). La β -caténine est une protéine intracellulaire reliée à la cadhérine, un récepteur des jonctions intercellulaires. La β -caténine a été détectée grâce à un anticorps secondaire couplé à la rhodamine. Nous avons pu ainsi visualiser les jonctions intercellulaires de la monocouche de Fbs comme le montre le quadrant inférieur gauche de la figure 11.

La séparation des marqueurs utilisés (Fb-OG, Ramos-DDAO, β -caténine-rhodamine), grâce au logiciel Zen du microscope confocal, nous a permis de bien visualiser l'empreinte laissée par le corps cellulaire du Ramos dans la monocouche de Fbs, tel qu'indiqué par la flèche blanche dans la figure 10. Cette empreinte se trouve autant dans le corps cellulaire du Fb, soit à une distance maximale de 5 μm de la jonction intercellulaire tel qu'indiqué par la flèche blanche, qu'à la jonction intercellulaire elle-même (flèche jaune). Ces empreintes correspondent respectivement à des voies de migration transcellulaire et paracellulaire. La reconstitution 3D dans les axes xz et yz indiquée par la flèche blanche nous a révélé une information supplémentaire : le Ramos est partiellement enfoui dans le corps cellulaire du Fb; autrement dit, ce Ramos est en voie d'internalisation.

Lors de la prise d'images, il y avait une disparité quant à la taille des empreintes laissées par les Ramos dans le corps cellulaire des Fbs. Il était possible que les Ramos se

déforment, phénomène de déformation cellulaire déjà observé avec les cellules cancéreuses à la surface endothéliale. Par contre, les multiples reconstitutions 3D ont révélé une cinétique d'englobement différentielle d'un Ramos à l'autre. Il s'est avéré qu'une grande empreinte pouvait correspondre à un Ramos en pleine empéripolèse, avec un étalement cellulaire donné, alors qu'une empreinte plus petite pouvait représenter un Ramos en voie de commencer ou finir son empéripolèse. Il y avait également des empreintes vides que nous avons attribuées à des Ramos qui se sont détachés lors des lavages.

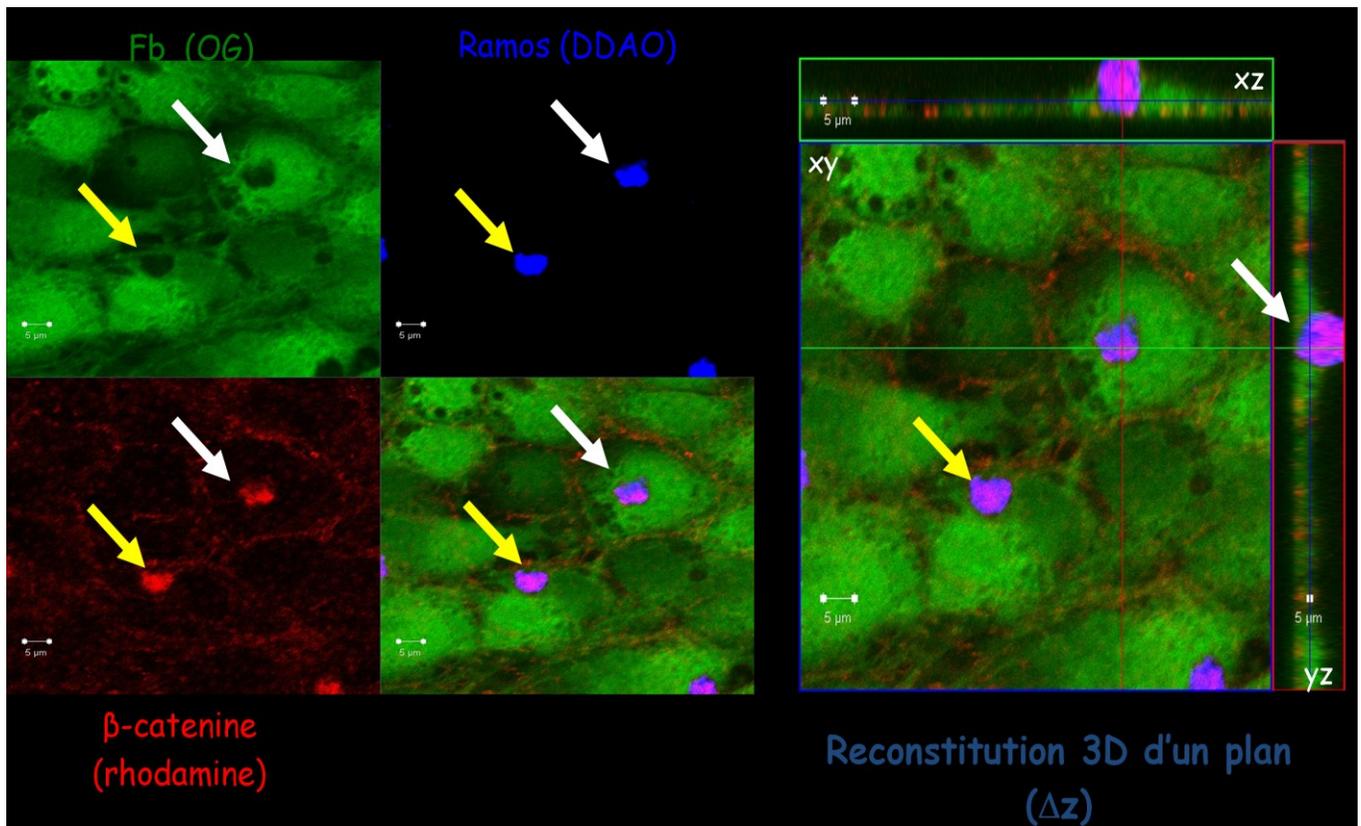


Figure 11: Visualisation 2D et 3D de la migration transcellulaire versus paracellulaire des Ramos (DDAO) à travers le corps cellulaire des Fbs (Oregon Green). Les jonctions intercellulaires d'une monocouche de Fbs sont révélées en marquant la β -caténine couplée à un anticorps secondaire fluorescent, la rhodamine (rouge). La présence d'un cône de migration dans le corps cellulaire des Fbs (flèche blanche) délimité par le marquage à la β -caténine correspond à l'empreinte laissée par la migration transcellulaire du Ramos (flèche blanche). À l'inverse, la migration paracellulaire du Ramos à la jonction intercellulaire des Fbs est indiquée par la flèche jaune.

La figure 12 est une parfaite illustration du phénomène d'empéripolèse des Ramos par les Fbs. Les colorations OG des Fbs et DDAO des Ramos sont optimales, le grossissement n'a engendré aucune perte de résolution et surtout, c'est une représentation sans équivoque : les deux Ramos sont dans le corps cellulaire du Fb, on le voit particulièrement bien dans l'axe yz aussi bien qu'en 2D dans l'axe xy. Les 3 représentations supplémentaires de rotations autour des axes confirment que les Ramos sont bel et bien englobés dans le corps cellulaire du Fb.

À ce point du projet, nous voulions comprendre comment le cytosquelette des Fbs s'accommodait de la présence d'une cellule dans son cytoplasme. Les études réalisées avec les cellules endothéliales pointent les réseaux de microfilaments d'actine dans la migration transcellulaire des leucocytes.

Des marquages de l'actine à la phalloïdine ou de la tubuline avec un anticorps n'ont montré aucune spécificité quant au phénomène que nous observions, ce qui nous a permis d'écartier l'implication des microfilaments d'actine et des microtubules dans notre étude. Nous nous sommes donc intéressés aux filaments intermédiaires, plus spécifiquement à la vimentine reconnue pour être exprimée au sein des Fbs et rapportée comme étant impliquée dans la migration transcellulaire endothéliale des homologues non cancéreux des Ramos, les lymphocytes B [144]. Nous avons également rapporté son implication pour l'empéripolèse des lymphocytes B par les Fbs dans notre précédente étude [1].

Comme le montre la figure 13, nous observons une colocalisation de la vimentine autour des cônes de transmigration des Ramos comme indiqué par la flèche blanche. Une analyse minutieuse du quadrant supérieur droit dans la partie inférieure à gauche révèle très bien l'implication de la vimentine au niveau des cônes de transmigration du Ramos.

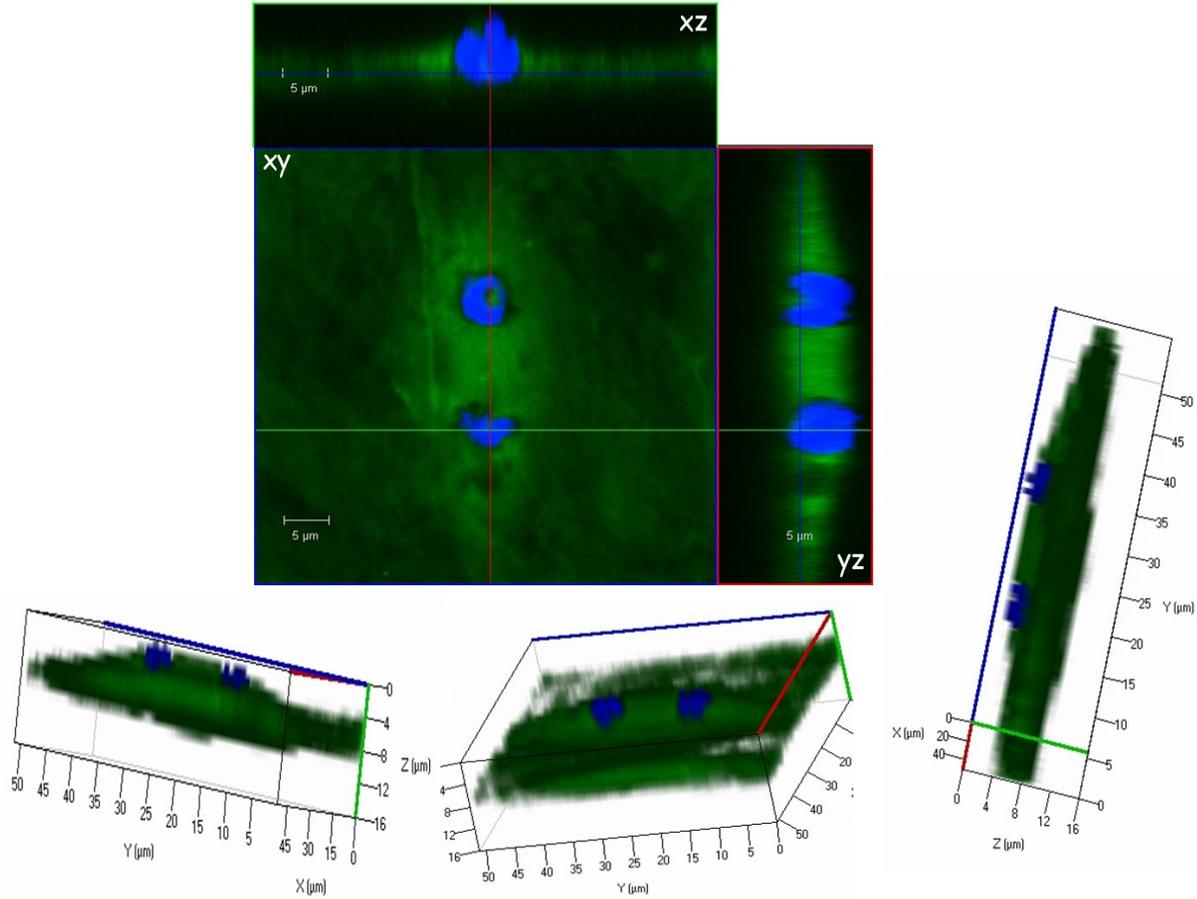


Figure 12: Illustration 3D du phénomène d'empéripolèse des 2 Ramos par un Fb. Reconstitution 3D d'un plan (Δz) montrant l'englobement des 2 Ramos (marqués au DDAO-bleu) dans le corps cellulaire du Fb (marqué à l'OG-vert). Représentations supplémentaires correspondant à une rotation autour des axes x, y et z afin de mieux visualiser et confirmer l'empéripolèse.

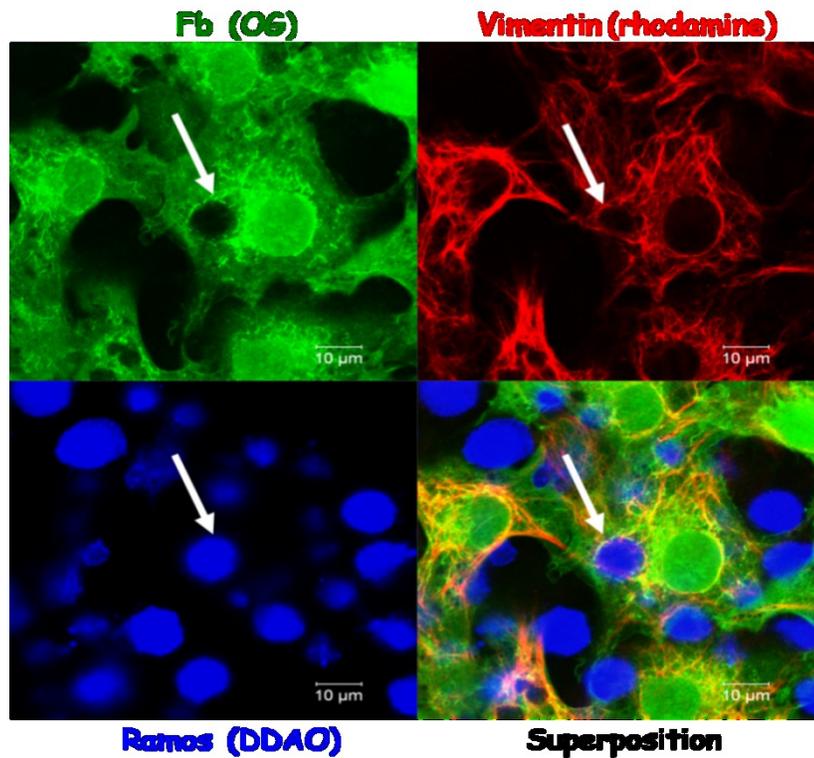


Figure 13: Implication des filaments intermédiaires (vimentine) dans le processus d'empériplèse. Les Fbs sont marqués à l'OG (vert), les Ramos au DDAO (bleu) et la vimentine est détectée grâce à un anticorps secondaire couplé à la rhodamine (rouge). La vimentine est localisée autour du cône de transmigration du Ramos, dans le corps cellulaire du Fb, comme indiqué par la flèche blanche.

Lorsque les intégrines sont activées, les sous-unités α et β s'associent pour former le site de reconnaissance et de liaison du ligand par un réarrangement conformationnel. Si le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 est effectivement impliqué dans l'interaction Ramos-Fb comme le suggèrent les précédents résultats, il serait possible d'observer une colocalisation spatiale de VCAM-1 et $\alpha_4\beta_1$ à l'interface de liaison des Ramos et des Fbs. Nous avons alors fait appel à la microscopie confocale. C'est grâce au perfectionnement de l'imagerie que nous avons pu observer et mieux définir l'implication de ce couple de récepteurs autant dans l'adhésion que dans l'empériolèse ou migration transcellulaire des Ramos à travers les Fbs.

Nous avons procédé à des tests d'adhésion des Ramos sur une monocouche de Fbs sur des lames. Après incubation des 2 types cellulaires, la monocouche de Fbs est fixée à paraformaldéhyde 4%. Par la suite, grâce à l'emploi d'anticorps spécifiques, la sous-unité α_4 à la surface des Ramos est marquée simultanément au marquage de VCAM-1 à la surface des Fbs. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à des fluorophores: nous avons utilisé des anticorps secondaires couplé à l'Alexa488 (vert) pour la sous-unité α_4 et à l'Alexa555 (rouge) pour VCAM-1 ainsi que la sous-unité β_1 . À la fin du marquage, la monocouche de Fbs est perméabilisée et les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (rose).

La figure 14 est une illustration de la superposition des 3 couleurs, soit le vert pour la sous-unité α_4 , le rouge pour VCAM-1 et le rose pour les noyaux. La différence de grosseur des noyaux des Fbs et des Ramos a servi d'indicateur pour discriminer les deux types cellulaires. De plus, comme le montre la figure 14, le marquage de la sous-unité α_4 fait toute la surface des Ramos et celui de VCAM-1, fait celle des Fbs. Lors de la prise de photo grâce au logiciel Zen du microscope confocal, les 3 marquages étaient révélés simultanément ce qui nous permettait de bien distinguer les Fbs des Ramos.

Les flèches rouges de la figure 14 ciblent la colocalisation de la sous-unité α_4 et VCAM-1 à l'interface de liaison du Ramos au Fb dans les représentations 3D des plans xz et yz. Cette colocalisation est concrétisée par l'apparition d'une tâche jaune à l'interface des deux cellules identifiées dans le plan xy, celui du Fb et celui du Ramos. Dans la reconstitution 3D dans l'axe xz (flèche rouge), le marquage de la sous-unité α_4 fait la surface du Ramos, ce qui

est attendu puisque c'est un récepteur de surface. Fait intéressant, le marquage spatial de la sous-unité α_4 semble plus intense et épais au niveau de la colocalisation avec VCAM-1 et simultanément, l'axe yz montre parfaitement que les deux noyaux sont au même niveau (même profondeur). Autrement dit, la grande proximité du noyau du Ramos avec celui du Fb suggère une fusion membranaire du Ramos internalisé avec la membrane plasmique du Fb exprimant VCAM-1. Grâce à la représentation de l'échelle, cette proximité est estimée à $3\mu\text{m}$, ce qui suggère fortement que ce Ramos est en voie d'empériplèse.

Il va sans dire que ces marquages imposaient plusieurs contraintes, notamment l'obtention d'une monocouche de Fbs, des dilutions d'anticorps primaires et secondaires optimisées pour minimiser le bruit de fond, un choix limité d'anticorps secondaires puisque le microscope confocal ne peut percevoir plus que 3 couleurs à la fois. Heureusement, les Ramos présentent un noyau cellulaire plus petit que celui des Fbs, ce qui nous a facilement permis de les distinguer par un marquage au DAPI ou au TOPRO et ainsi, réaliser des marquages d'anticorps sur des monocouches brutes.

Nos résultats par microscopie confocale complètent les résultats obtenus par cytofluorométrie. En effet, grâce à un blocage fonctionnel du couple $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1, la cytofluorométrie a confirmé son implication dans l'interaction Ramos-Fb que la microscopie confocale a renforcé grâce à la visualisation de la localisation spatiale des sous-unités α_4 , β_1 et VCAM-1 à l'interface de liaison des Fbs et des Ramos.

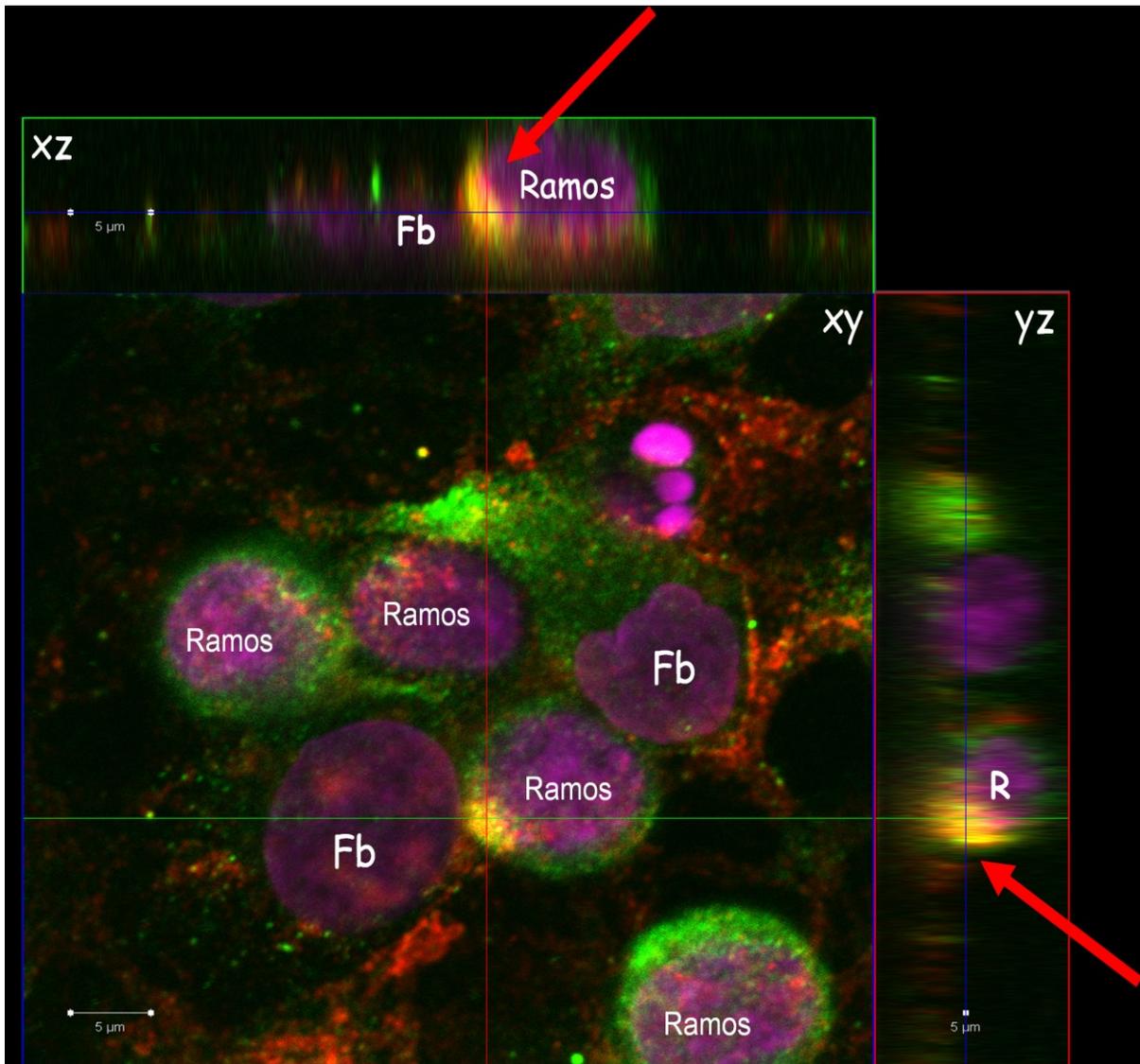


Figure 14: Colocalisation 3D de la sous-unité α_4 à la surface des Ramos et de VCAM-1 à la surface des Fbs. Représentation des plans xy, xz et yz où les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (rose), la sous-unité α_4 est marquée avec un anticorps secondaire Alexa488 (vert) et VCAM-1 par un anticorps secondaire Alexa555 (rouge). Les flèches rouges indiquent la colocalisation du vert (α_4) et du rouge (VCAM-1), soit le jaune à la jonction Ramos-Fb.

Pour clore la section de microscopie confocale, nous avons voulu visualiser l'empéripolèse en temps réel par vidéomicroscopie (la vidéo est en pièce jointe en annexe 2) est présenté en annexe II). La flèche rouge de la figure 15 indique le Ramos en empéripolèse et les 4 illustrations rendent compte de l'évolution de l'empéripolèse de ce Ramos en fonction du temps.

À 10 min, le Ramos est en adhésion et ce, jusqu'à 55 min, moment où commence son internalisation. À 70 min, le Ramos entame le processus d'empéripolèse, il est partiellement englobé et à 135 min, il est littéralement enfoui dans le Fb. La vidéo rend compte d'une cinétique d'adhésion et d'internalisation. En effet, le Ramos faisait de petits déplacements latéraux jusqu'à 70 min, temps requis pour amorcer l'empéripolèse. Ces déplacements latéraux ressemblent au roulement décrit pour les leucocytes à la surface endothéliale. De plus, une observation minutieuse de la reconstitution 3D dans l'axe xz nous a permis d'observer qu'à 135 min, la membrane plasmique du Fb renferme le Ramos; autrement dit, ce dernier est littéralement englobé par le Fb.

La figure 16 est une reconstitution 3D du Ramos internalisé par le Fb dans la vidéomicroscopie. L'image correspond à un grossissement la région encadrée en jaune dans la figure 15 à $t = 135$ min. Grâce au logiciel IMARIS[®] (Bitplane, London, England), qui reconstitue des plans de surface des intensités de fluorescence détectées (traitement des intensités en pixels), il a été possible d'obtenir une reconstitution 3D du Ramos internalisé directement dans l'épaisseur de la monocouche grâce à une coupure du plan.

La figure 16A correspond à la région 3D sélectionnée à partir de l'image brute correspondant au $t = 2:16:59$ h (soit $t = 139$ min). Le Ramos en empéripolèse a été coloré dans une teinte de bleu distincte et encadré en rouge. Cette représentation 3D ne permet pas de confirmer l'internalisation, elle révèle plusieurs Ramos dans le même plan que des Fbs. Par contre, la figure 16B correspond à la reconstitution des intensités de fluorescence détectée dans la figure A grâce au logiciel IMARIS[®]. Le Ramos encadré en rouge est clairement inséré dans la monocouche de Fbs, on distingue la portion dorsale et la portion ventrale le tout entouré de vert, du corps cellulaire du Fb. Cette reconstitution est un élément de confirmation des vues 2D et 3D car elle ne permet pas de discriminer les Fbs.

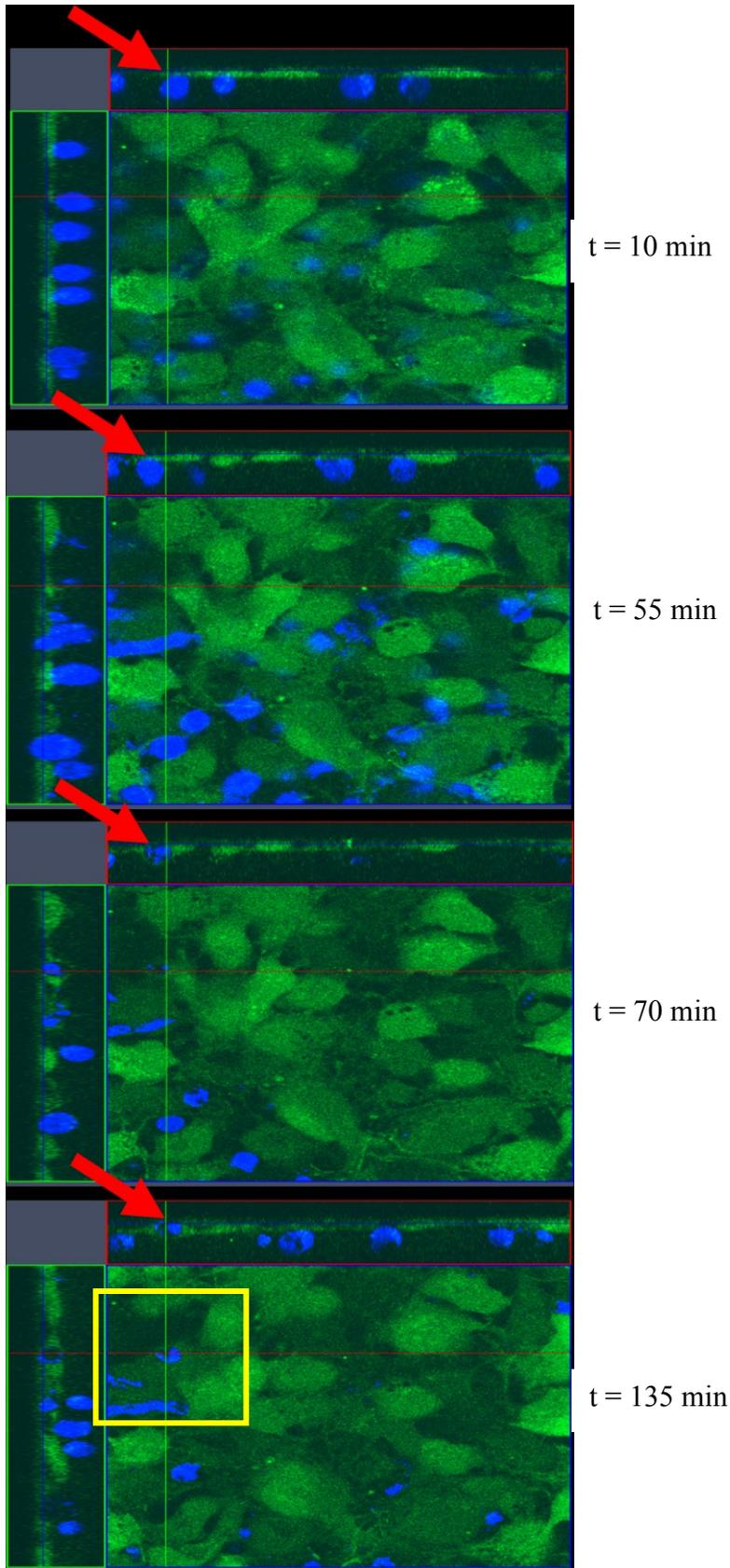


Figure 15: Visualisation de l'empéripolèse en temps réel d'un Ramos (DDAO-bleu) par un Fb (OG-vert) par vidéomicroscopie (indiqué par la flèche rouge). Analyse 3D ($x,y,\Delta z$) de chaque point pré-sélectionné au hasard ($x_1,y_1, x_2, y_2, \text{etc.}$) à une fréquence de 5 min et ce, pendant 28 cycles, totalisant ainsi 140 min. La vidéo est présentée en pièce jointe à l'annexe 2. Le carré jaune indique la région utilisée dans la réalisation de la figure 16 ($n=3$).

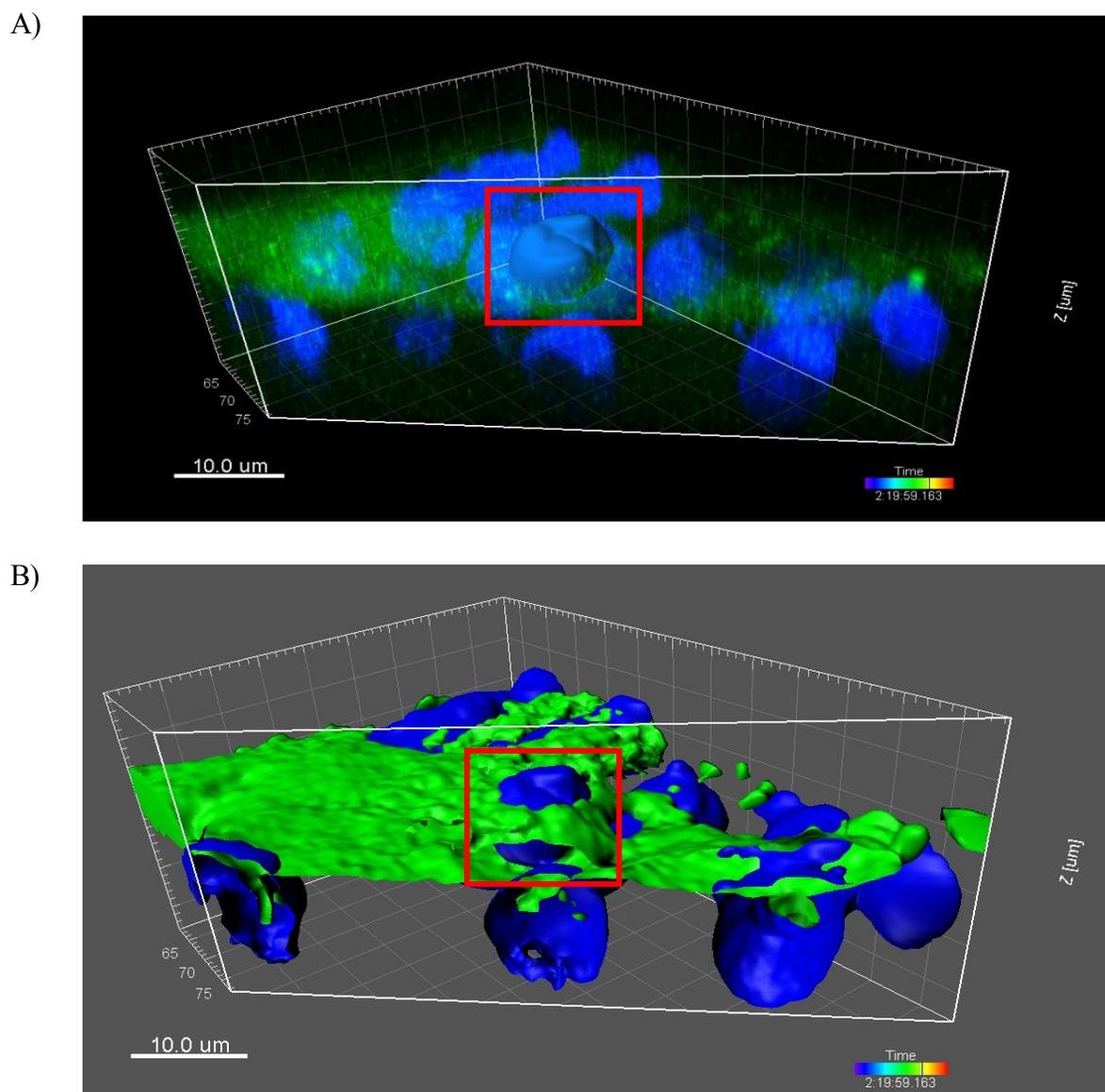


Figure 16: A) Représentation 3D des données brutes (intensités de fluorescence) et B) reconstitution 3D des intensités de fluorescence en plans de surface grâce au logiciel IMARIS[®] d'un grossissement de la région encadrée en jaune dans la figure 14 et qui correspond à l'empéripolèse du Ramos dans la vidéomicroscopie présentée en annexe 2. L'encadré rouge montre l'insertion du Ramos dans la monocouche de Fbs.

Afin de confirmer nos précédents résultats, nous avons utilisé un modèle mimétique des Ramos, soit des billes de polystyrène fluorescentes (BP) que nous avons tapissées de $\alpha_4\beta_1$ (BP- $\alpha_4\beta_1$). Ce modèle nous a permis d'étudier l'implication exclusive de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ dans l'adhésion et l'empéripolèse par les Fbs. Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité adhésive des BP- $\alpha_4\beta_1$ aux Fbs par cytofluorométrie ainsi que l'implication fonctionnelle des sous-unités α_4 et β_1 dans cette adhésion grâce aux anticorps bloquants dans des conditions saturantes.

Comme le montre la figure 17, nous avons bien une augmentation significative de l'interaction des BP- $\alpha_4\beta_1$ lorsque les Fbs sont stimulés par le TNF- α et les BP- $\alpha_4\beta_1$ au $MnCl_2$, confirmant bien la présence ainsi que l'induction de l'état de haute affinité de l'intégrine au sein des BP- $\alpha_4\beta_1$. L'annulation complète de l'interaction suite à une inactivation par la chaleur des BP- $\alpha_4\beta_1$ exclut toutes les interactions non spécifiques et constitue un excellent contrôle négatif. La stimulation préalable des Fbs par le TNF- α a doublé le niveau d'interaction confirmant 1) que l'interaction BP- $\alpha_4\beta_1$ - Fb est modulable et 2) que l'utilisation des billes de polystyrène tapissées de $\alpha_4\beta_1$ est un bon modèle mimétique des Ramos puisqu'il a conservé cette modulation.

Par contre, l'emploi d'anticorps bloquants dirigés contre la sous-unité β_1 d'une part et α_4 d'autre part, n'a réduit que très faiblement l'interaction bien que cette diminution soit significative. La proportion de réduction pour ce qui est de la sous-unité β_1 est de 15% versus 80% pour les Ramos (voir figure 9) et de 17 % versus 28% pour la sous-unité α_4 et ce, par rapport au contrôle (TNF- α + $MnCl_2$) pour toutes les conditions. Mentionnons que l'anticorps utilisé (HUTS21) dans cette expérience a la particularité de reconnaître exclusivement la sous-unité β_1 dans son état de haute affinité au sein des lignées humaines de type B dérivées de lymphome, de myélome ou de leucémie [145]. À mon avis, l'utilisation de cet anticorps n'explique pas les différences observées quant à l'implication de la sous-unité β_1 . Les concentrations habituellement utilisées de $MnCl_2$ dans la littérature varient de 0.5 mM à 5 mM avec une concentration physiologique avoisinant les 0.5mM. Nous avons optimisé la concentration de $MnCl_2$ à 2 mM grâce à un test dose-réponse effectué lors des étapes d'optimisation de l'interaction et où nous avons observé une interaction maximale à 2 mM. On

peut donc affirmer qu'il y avait suffisamment de $MnCl_2$ pour induire l'intégralité des intégrines dans leur état de haute affinité.

Les études sur les molécules d'adhésion, et plus particulièrement sur la superfamille des intégrines, sont ardues car le moindre changement conformationnel de ces molécules peut modifier en tout ou en partie une réponse attendue. Tapisser des billes de polystyrène de $\alpha_4\beta_1$ consiste à exclure la participation des portions transmembranaire et intracellulaire dans la régulation de l'affinité et de l'avidité de cette intégrine. La conformation de $\alpha_4\beta_1$ étant affectée, il est possible que l'anticorps HUTS21 utilisé ne reconnaisse plus aussi bien $\alpha_4\beta_1$ ce qui expliquerait la différence de blocage de la sous-unité β_1 observée. Durant les étapes d'optimisation, nous avons confirmé la présence structurale de $\alpha_4\beta_1$ à la surface des billes par cytofluorométrie; les pourcentages d'adhésion obtenus indiquent que $\alpha_4\beta_1$ a conservé ses propriétés fonctionnelles. Par contre, la structure conformationnelle de $\alpha_4\beta_1$ pourrait être affectée par l'absence des domaines transmembranaire et intracellulaire. Intuitivement, on dirait que si une intégrine a conservé ses propriétés fonctionnelles c'est qu'elle a conservé suffisamment de propriétés conformationnelles. On peut imaginer que la proximité d'un Fc exposant VCAM-1 induit un encombrement stérique local qui "oblige" $\alpha_4\beta_1$ à la surface des billes de polystyrène à adopter la bonne conformation. Dans le même ordre de pensée, l'anticorps ne peut, à lui seul, induire la bonne conformation et n'arrive donc pas à bien reconnaître BP- $\alpha_4\beta_1$ ce qui expliquerait les faibles réductions de l'interaction en présence des anticorps bloquants.

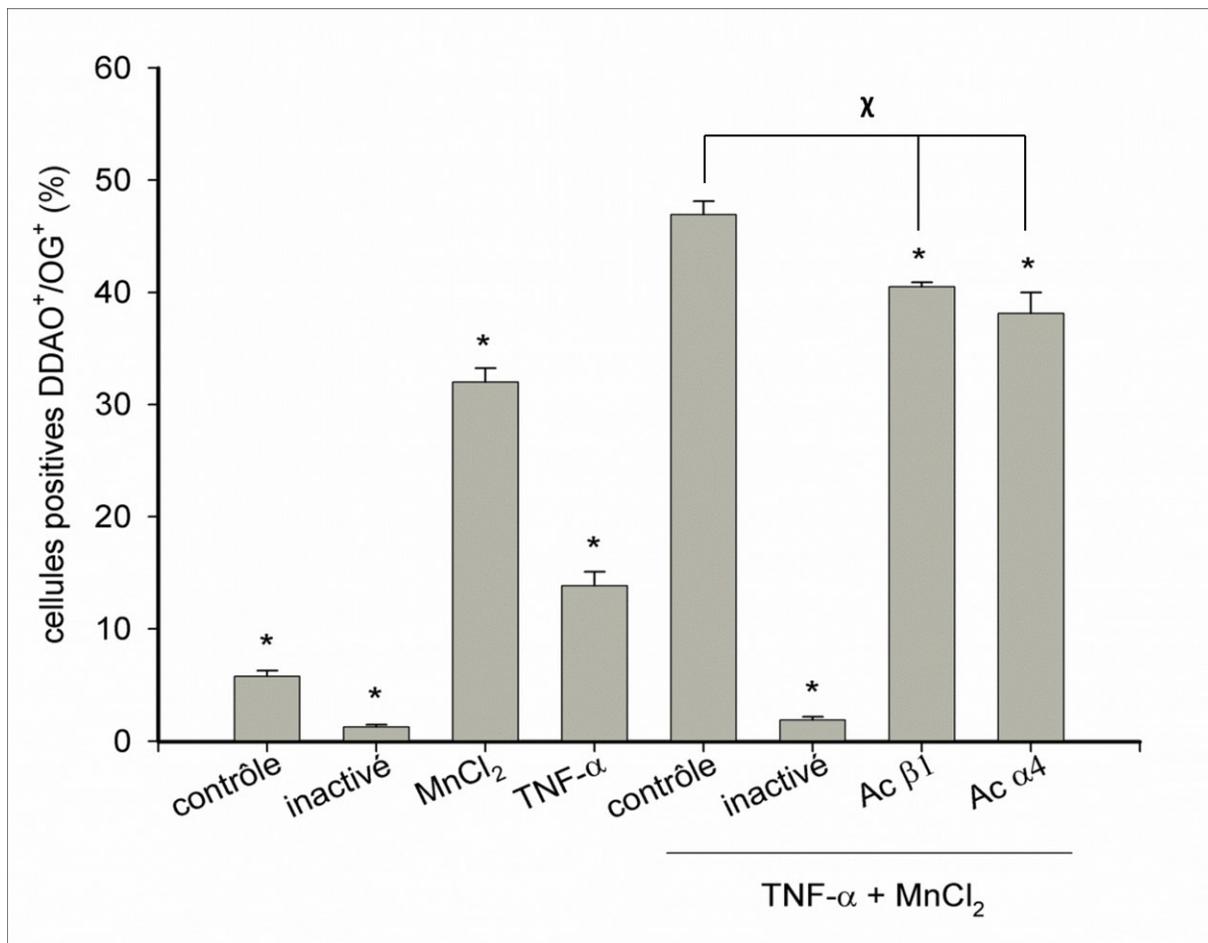


Figure 17: Confirmation de l'implication de $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 dans l'interaction Ramos-Fb par l'emploi d'un modèle mimétique de billes de polystyrène tapissées de $\alpha_4\beta_1$ (BP- $\alpha_4\beta_1$). Quantification et modulation de la capacité des BP- $\alpha_4\beta_1$ à interagir avec les Fbs après stimulation préalable des Fbs par le TNF- α (30 ng/mL) et l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre les sous-unités α_4 et β_1 . * $p < 0.001$ vs contrôle positif et $\chi < 0.001$ vs TNF- α + MnCl₂ (2 mM); n=3.

Finalement, les figures 18 et 19 résument tout le travail réalisé par microscopie confocale dans la dernière portion du projet. Dans un premier temps, nous avons voulu visualiser le processus d'empéripolèse des BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs. Comme le montre la figure 18, les Fbs sont capables d'internaliser BP- $\alpha_4\beta_1$ dans leur cytoplasme. Le plan xy rend compte de la présence de 3 billes de polystyrène tapissées de $\alpha_4\beta_1$ dans le corps cellulaire du Fb.

Les reconstitutions 3D dans les axes xz et yz illustrent parfaitement l'englobement des billes dans le cytoplasme des Fbs. Les représentations supplémentaires de la figure 18 sont particulièrement intéressantes car la vue du haut et celle du dessous nous indiquent 1) qu'une bille est complètement enfouie dans le Fb et 2) qu'ultimement, les billes sont capables de quitter le cytoplasme du Fb et de "ressortir par en dessous" comme le montre la vue du dessous. En effet, la vue de haut rend compte de 3 BP- $\alpha_4\beta_1$ dans l'axe xy. Quant à la vue du dessous, on en compte seulement 2. La vue latérale nous rend compte de l'épaisseur de la monocouche de Fbs. La bille, dont l'empreinte est la plus petite par la vue du haut correspond à celle ayant la plus grande empreinte par en dessous; autrement dit, elle ressort du Fb par en dessous.

Le Fb est non seulement un partenaire d'interaction de ces BP- $\alpha_4\beta_1$ mais il leur est également perméable: leur adhésion se solde par leur migration transcellulaire dans son cytoplasme et/ou leur empéripolèse par le Fb et, ultimement, finissent par ressortir par en dessous. La question se pose : est ce que les BP- $\alpha_4\beta_1$ migrent de façon transcellulaire à travers les Fbs ou est ce qu'elles sont internalisées par un mécanisme indépendant de la migration transcellulaire et qui revêt le nom d'empéripolèse?

Pour clore ce projet, la figure 19 résume la quantification de l'empéripolèse des BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs et ce, dans diverses conditions. Pour ce faire, nous avons comptabilisé le nombre d'inclusions de BP- $\alpha_4\beta_1$ dans le corps cellulaire des Fbs dans chaque champs conféré par l'objectif 40X du microscope confocal et qui correspond à une superficie totale de 0.045mm^2 . Ainsi, sur chaque puit d'une lame Lab-Tek de 8 puits, un minimum de 20 images sont acquises au hasard dans des champs distincts. Le nombre d'inclusions comptabilisées pour chaque condition est réalisé en triplicata (3 puits distincts). Comme le montre la figure

19, dans des conditions basales (contrôle), une moyenne de 6 inclusions par champs de 0.045mm^2 a été comptabilisée. Par contre, lorsque les BP- $\alpha_4\beta_1$ sont stimulées au MnCl_2 et les Fbs par le $\text{TNF-}\alpha$, une augmentation significative du nombre d'inclusions par un facteur de 3, soit une moyenne 17 inclusions/champ 0.045mm^2 est observée. Prétraiter les BP- $\alpha_4\beta_1$ au CaCl_2 , reconnu pour induire les intégrines dans leur état de basse affinité, a significativement réduit le nombre d'inclusions à un niveau basal, ce qui confirme que l'internalisation est bien modulée par le niveau d'affinité des intégrine. De surcroît, l'inactivation par la chaleur des BP- $\alpha_4\beta_1$ a complètement abolit leur capacité à être internalisée.

Ce résultat s'aligne aux précédents résultats à savoir qu'une stimulation au $\text{TNF-}\alpha$ des Fbs et la stimulation des Ramos ou des BP- $\alpha_4\beta_1$ au MnCl_2 augmentent 1) le niveau d'expression de VCAM-1; 2) le niveau d'interaction Ramos-Fb; 3) le niveau d'interaction de BP- $\alpha_4\beta_1$ -Fb qui se traduisent visiblement par une augmentation significative de l'empéripolèse des BP- $\alpha_4\beta_1/0.045\text{mm}^2$.

Cette expérience nous permet de proposer une nouvelle association positive: l'augmentation de l'interaction BP- $\alpha_4\beta_1$ -Fb s'accompagne de l'augmentation de l'empéripolèse des BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs. Autrement dit, l'interaction et l'internalisation subséquente des BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs sont deux processus cellulaires modulables, intimement reliés et qui dépendent majoritairement des Fbs.

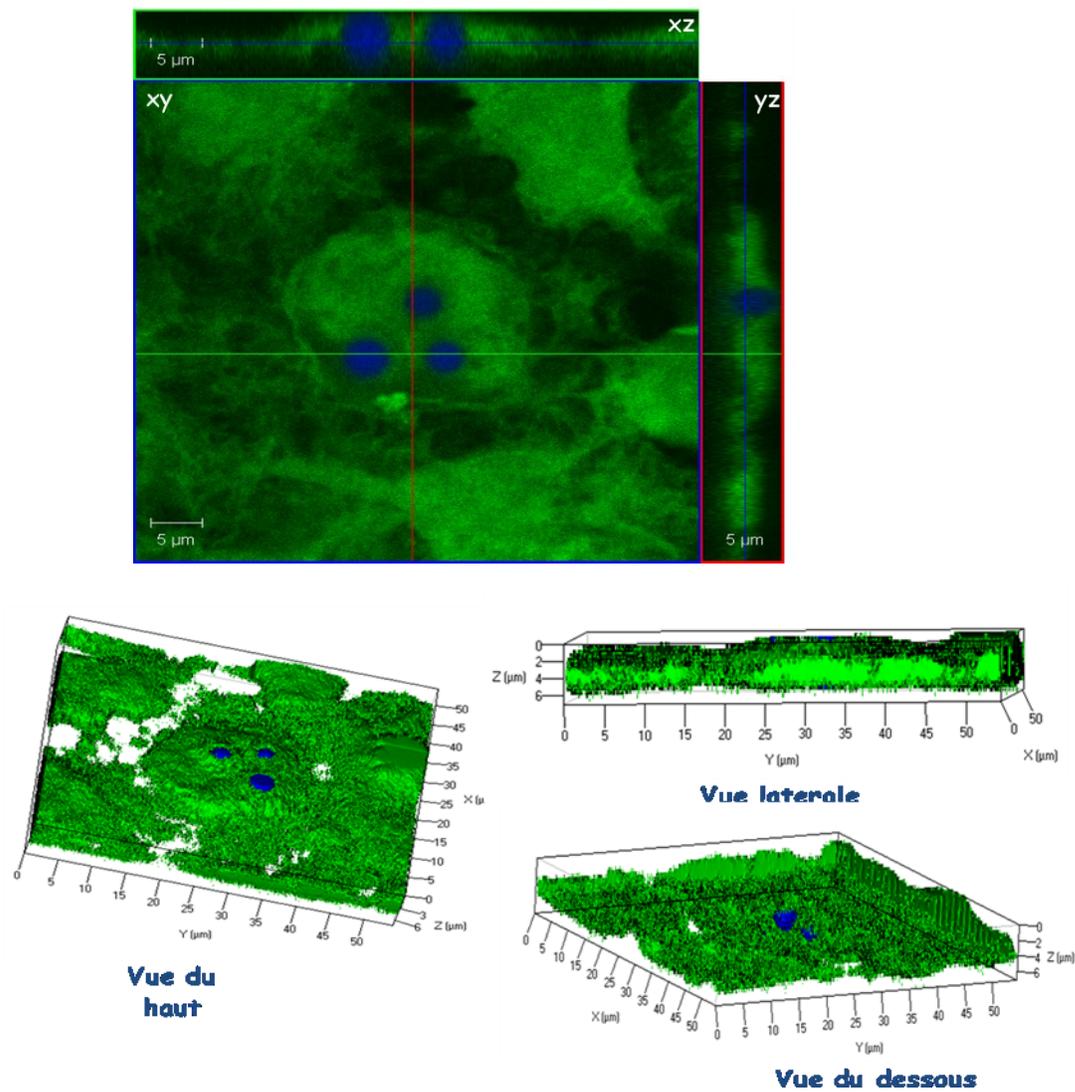


Figure 18: Visualisation 3D de l'empéripolèse de BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs (OG-vert). Reconstitution 3D d'un plan (Δz) montrant l'englobement de 3 BP- $\alpha_4\beta_1$ (bleu) dans le corps cellulaire du Fb. Représentations supplémentaires correspondant à une rotation autour des axes x, y et z afin de mieux visualiser et confirmer l'empéripolèse par une vue latérale, une vue du haut et une vue du dessous.

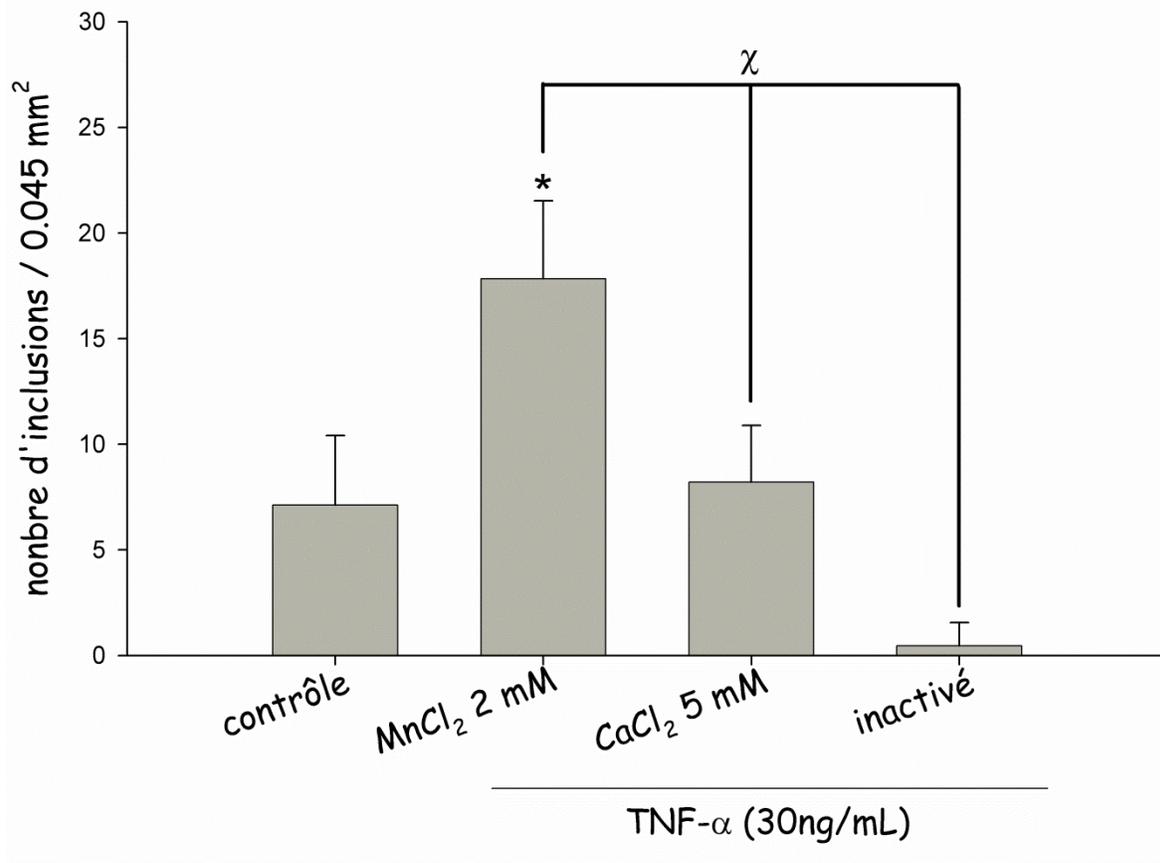


Figure 19: Modulation et quantification de l'empéripolèse par le décompte du nombre d'inclusions de BP- $\alpha_4\beta_1$ dans une monocouche de Fbs selon le ratio nb d'inclusions/0.045mm². Les BP- $\alpha_4\beta_1$ sont incubées en présence de MnCl₂ (2 mM), CaCl₂ (5 mM) ou inactivées par la chaleur. Les Fbs sont préalablement stimulés par le TNF- α (30 ng/mL). * p<0.001 vs contrôle et $\chi < 0.001$ vs TNF- α + MnCl₂; n=3.

5 Discussion

5.1 CAFs, partenaire d'interaction directe des cellules tumorales

À ma connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à une interaction physique directe entre des cellules tumorales et le composant le plus important du stroma tumoral, les Fbs. Nos résultats montrent, pour la première fois, que des cellules tumorales reconnues pour exprimer l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ interagissent directement avec les Fbs grâce au couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. Nos résultats témoignent également d'une corrélation non linéaire positive entre le niveau d'expression de la sous-unité α_4 de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ et la capacité adhésive des cellules tumorales qui l'expriment. La sélection de 12 lignées cellulaires tumorales hautement invasives, soient 2 lignées de mélanomes murins (B16F1 et B16F10), 7 lignées de mélanomes humains (BLM, MV3, IF6, 530, WM9, 1205Lu, 451Lu), une lignée de carcinome mammaire humain (MDA-MB-231), une lignée d'adénocarcinome des ovaires humains (SKOV-3) et une lignée de lymphome humain (Ramos) nous ont permis de rendre compte de cette corrélation.

Les lignées sélectionnées correspondent à différentes typologies de cancer ce qui indique que cette interaction n'est pas exclusive à un type de cancer en particulier mais semble plutôt inhérente à la cellule tumorale elle-même. La comparaison de la capacité adhésive des lignées tumorales à différentes souches de Fbs (humains de la peau, murins du stroma et cardiaques de rat) nous a permis d'arriver à la même conclusion, à savoir que la capacité à interagir avec des cellules tumorales est inhérente aux Fbs. Elle pourrait donc se produire au sein de n'importe quelle tumeur.

Dans une précédente étude, nous avons montré que les neutrophiles et les lymphocytes B interagissent directement avec les Fbs [1]. Nous avons donc sélectionné les Ramos, les homologues cancéreux des lymphocytes B, dans la poursuite de cette étude. Notre tout premier objectif consistait à faire une analyse comparative de la modulation de l'interaction 1) Ramos-Fb et 2) lymphocytes B-Fb. Nos résultats suggèrent que les lymphocytes B et les

Ramos présentent un profil d'interaction similaire avec les Fbs; autrement dit, que les récepteurs de surface déployés dans cette interaction pourraient être conservés. Bien que transformés, les Ramos semblent avoir conservé les propriétés adhésives des lymphocytes B. Aussi, comparer des cellules "normales" versus "tumorales" sous entend un niveau d'activation cellulaire différent; les lymphocytes B ont bien répondu à une activation au PMA alors que les Ramos y étaient complètement insensibles.

Durant le développement de ce projet, plusieurs activateurs ont été utilisés afin de stimuler les Ramos, en vain. L'IL-6, le SDF-1, le TNF- α ainsi que le fragment C5a n'ont eu aucun effet sur la capacité adhésive des Ramos. Une évidence s'est tranquillement installée dans le développement de ce projet : les Ramos sont des cellules tumorales peu activables. Le fait qu'elles soient hautement invasives implique qu'elles sont dans un état d'activation maximal ce qui constituerait une explication plausible. Autrement dit, il est difficile d'aller chercher une valeur ajoutée au niveau de l'expression ou de l'avidité des intégrines. La seule réponse, à la fois logique et cohérente, est celle de l'augmentation de l'affinité de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ suite à un prétraitement au $MnCl_2$ qui a suscité une augmentation significative de l'interaction Ramos-Fb. La classification des cancers sanguins présentée dans la section 1.9 de l'introduction nous permet de comprendre pourquoi toutes les tentatives de stimuler les Ramos ont échoué. Ces cellules ont perdu toute forme de connexion avec leur MET suite à une aberration génique leur conférant une capacité proliférative autonome. Elles seraient donc insensibles à tous les signaux qui émaneraient normalement d'un MET, notamment le SDF-1, L'IL-6 et même le CD44 qui a été rapporté comme étant un activateur de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ en favorisant sa translocation [146, 147].

Nos résultats témoignent d'un autre fait important: l'interaction Ramos-Fb est modulable, autant au niveau de l'affinité de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ à la surface des Ramos qu'au niveau de l'expression de son contre-récepteur VCAM-1 à la surface des Fbs. En effet, lorsque les Ramos sont incubés en présence de $MnCl_2$, nous observons une augmentation significative de l'interaction Ramos-Fb. Le $MnCl_2$ est un cation divalent reconnu pour induire un état de haute affinité des intégrines [148], il a donc été considéré comme contrôle positif dans toutes les expériences suivantes. Aussi, une stimulation des Fbs par le TNF- α , une cytokine

inflammatoire, a régulé à la hausse le niveau d'expression de VCAM-1 concomitante à une augmentation dose-dépendante de l'interaction Ramos-Fb en présence de concentrations croissantes de TNF- α . La surexpression de VCAM-1 à la surface des Fbs par transfection nous a également permis d'observer la même augmentation significative de l'adhésion des Ramos. De surcroît, le blocage fonctionnel de VCAM-1 à la surface des Fbs a réduit l'interaction Ramos-Fb en deçà du niveau basal, suggérant non seulement le blocage fonctionnel du VCAM-1 induit par le plasmide mais également le blocage du VCAM-1 basal.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure que l'augmentation de l'interaction Ramos-Fb suite à une stimulation par le TNF- α est bien le résultat de l'augmentation de l'expression de VCAM-1 à la surface des Fbs, expression qui a été détectée par cytofluorométrie.

Dans un contexte physiopathologique, nos résultats soulignent un fait encore inexploré: les cellules tumorales exprimant $\alpha_4\beta_1$ constituent des partenaires d'interaction directe des CAFs dans le MET inflammatoire, grâce au couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1, interaction qui, de plus, est modulable. Notre approche expérimentale a été d'augmenter le niveau d'expression de VCAM-1 par stimulation inflammatoire et par transfection, nous avons donc bien mimé les conditions *in vivo* des CAFs dans le MET.

Nous avons par la suite confirmé l'implication de $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 grâce à l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre les sous-unités α_4 , β_1 ainsi que VCAM-1, seuls ou en combinaison. Nous avons observé une diminution significative de l'interaction Ramos-Fb de 80% en présence d'un anti- β_1 et seulement de 20% en présence d'un anti- α_4 ou d'un anti-VCAM-1. Nous n'avons pas observé de diminution significative additionnelle de l'interaction lorsque l'anti- β_1 a été combiné à l'anti- α_4 , seuls ou en combinaison avec l'anti-VCAM-1. Ce résultat, d'abord surprenant, s'est imposé par sa reproductibilité: la sous-unité β_1 de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ est principalement impliquée dans l'interaction Ramos-Fb.

Un des aspects formidables de la rédaction est de ne donner généralement que les résultats positifs. Tout a l'air facile et cohérent mais l'auteur sait à quel point cette apparente fluidité a été semée d'embûches. Plusieurs pistes d'autres récepteurs potentiellement impliqués

directement ou indirectement dans cette interaction ont été explorées dans le développement de ce projet et se sont avérées sans issue. En effet, les Ramos se sont avérés négatifs quant à l'expression des intégrines suivantes: CD18, LFA-1, Mac1 et Cd11c ce qui a complètement écarté l'implication des couples intégrines β_2 /ICAM-1. Ils sont également négatifs à l'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ ainsi qu'à la sous-unité β_7 . De plus, le blocage fonctionnel des récepteurs suivants grâce à des anticorps n'a généré aucun résultat : CXCR4, CD44, ALCAM-1, MADCAM-1, ICAM-1, JAM-B, JAM-C, CD62L et CD62E. L'emploi de peptides RGD censés bloquer les intégrines qui comportent ce motif n'a mené à aucun résultat : RGDSP, CycloRGDdFV 2574, RGDpSP 3164 et CS-1. Plusieurs articles montrent que la reconnaissance des intégrines par certains anticorps dépend de l'état d'activation des intégrines et de l'exposition de différents épitopes [149, 150]. Il serait donc plausible que les anticorps n'aient pas reconnu leur cible pour ces raisons.

D'un point de vue théorique, l'éventail d'expression des intégrines au sein d'une cellule tumorale est étroitement relié à sa capacité métastatique. Il a été rapporté que les intégrines comportant les sous-unités α_3 et β_1 ainsi que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sont impliquées dans l'adhésion des lignées cancéreuses humaines de la prostate aux composés de la MEC alors que les lignées parentales non métastatiques déploient les intégrines comportant les sous-unités α_6 et β_4 [151]. Cette étude met en évidence l'importance de la sous-unité β_1 dans le processus d'adhésion des lignées tumorales humaines et renforce le concept de reprogrammation des intégrines qui accompagne le phénotype cancéreux. Même si l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est la plus communément étudiée des intégrines associées aux tumeurs solides, les intégrines exprimant la sous-unité β_1 sont aussi associées à la progression tumorale [152]. En effet, une corrélation négative a été observée entre le niveau d'expression de l'intégrine β_1 et le taux de survie au sein de cancers invasifs du sein et des petites cellules pulmonaires [153, 154]. Une étude a également rapporté que les intégrines exprimant la sous-unité β_1 ne sont pas seulement nécessaires mais essentielles pour induire des tumeurs mammaires au sein d'un modèle murin transgénique [155].

Ces études mettent en exergue l'importance de la sous-unité β_1 dans l'adhésion des cellules tumorales à la MEC et dans la tumorigénèse en général. Elles consolident notre

résultat que la sous-unité β_1 pourrait supporter, à elle seule, le poids de l'adhésion des Ramos aux Fbs. Dans une perspective thérapeutique, elle pourrait constituer une cible de choix pour minimiser la progression tumorale.

La grande famille des intégrines β_1 se divise en trois principales catégories : les récepteurs à collagène (α_1 , α_2 , α_9 , α_{10} et α_{11}), les récepteurs à laminine (α_3 , α_6 et α_7) ainsi que les récepteurs à motif RGD (α_v , α_5 et α_8). Ces derniers reconnaissent la vitronectine, la tenascine, la fibronectine et l'ostéopontine [96]. Il reste deux candidats possibles, $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$. Durant le développement de ce projet, nous avons envisagé l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ comme possible candidate puisqu'elle est répertoriée comme étant une intégrine protumorale [156, 157]. Après plusieurs marquages négatifs et une intensive revue de littérature, nous avons confirmé que les Ramos n'expriment pas l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ [158]. Il reste en lice l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, contre-récepteur de VCAM-1 et possible principal protagoniste dans cette interaction.

Trois études antérieures s'enlignent avec nos résultats, soit directement ou indirectement, et nous permettent de supporter notre hypothèse *in vivo*. La première datant de 2004, a montré, grâce aux micromatrices d'ADN, que les CAFs dérivés de métastases de colon dans le foie présentent un profil d'expression génique de VCAM-1 significativement augmenté par rapport à des Fbs quiescents de la peau (augmentation de 15.3 fois) [66]. Ils ont répertorié les gènes qui sont régulés à la hausse sans pour autant porter d'attention particulière à VCAM-1, le troisième gène le plus fortement régulé à hausse dans la liste, après le protéoglycan 1, un composant de MEC (augmentation de 36 fois) et l'ankyrine 3, une protéine cytosqueletique (augmentation de 19.7 fois). Mentionnons également la présence d'ICAM-1, IL-6, SDF-1 et de COX-2 dans la liste. Dans le contexte de notre projet, cette étude confirme un fait *in vivo*, le MET est enrichi en CAFs dont l'expression de VCAM-1 est significativement augmentée, ce qui constitue un environnement favorable à l'implantation des cellules tumorales exprimant l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ et corrèle avec le développement et la progression de plusieurs types de tumeurs malignes [116, 159, 160].

La deuxième étude, à la fois récente et étonnante, a rapporté que les CAFs associés à une néoplasie dans sa phase initiale présentent une signature pro-inflammatoire les menant 1)

à surexprimer SDF-1 et IL-6; 2) à recruter des macrophages proangiogéniques et 3) à favoriser la croissance tumorale. Cette signature génique serait sous le contrôle transcriptionnel de NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) et de COX-2 [161]. Justement, la première étude mentionnée ci-haut rend compte de l'augmentation de l'expression génique de IL-6, SDF-1 et COX-2 au sein des CAFs, ce qui renforce l'idée de signature pro-inflammatoire et raffermis le lien entre les médiateurs inflammatoires et les CAFs dans la progression tumorale. D'un point de vue mécanistique, VCAM-1 est sous le contrôle transcriptionnel de NF- κ B au sein des CAFs, ce qui suggère que la régulation à la hausse de VCAM-1 est concomitante à celle de l'IL-6, COX-2 et SDF-1. Autrement dit, l'induction d'un MET pro-inflammatoire serait concomitant à un stroma réactif enrichi en VCAM-1, condition favorable à la progression et à l'invasion des cellules tumorales.

Finalement, la troisième étude tout aussi récente a montré la présence de la même signature génique pro-inflammatoire au sein de cellules cancéreuses ayant été mises en contact avec des CAFs obtenus d'adénocarcinomes de la prostate. Cette signature permettrait aux cellules cancéreuses d'acquérir un phénotype motile confirmant l'hypothèse du "*Seed and Soil*", à savoir que les cellules stromales et tumorales partagent des voies d'activation communes durant la progression tumorales [162].

Ces trois études regroupées démontrent que 1) les CAFs interagissent indirectement avec les cellules tumorales dans le stroma réactif via des médiateurs inflammatoires qui permettent entre autre, leur enrichissement en VCAM-1, 2) l'augmentation de l'affinité et de l'avidité de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ au sein des cellules tumorales, ce qui favoriserait leur capacité motile et invasive [57, 58]. Autrement dit, **tout est finement orchestré pour permettre une interaction directe entre les Fbs et les cellules tumorales au sein du stroma tumoral du MET par un effet de proximité.** Cette hypothèse s'enlignait avec celle de Stephen Paget, à savoir qu'un enrichissement en VCAM-1 du stroma tumoral inflammatoire constituerait un environnement propice à l'implantation de cellules tumorales exprimant $\alpha_4\beta_1$, enrichissement qui supporterait et renforcerait le phénomène d'adressage cellulaire et tissulaire.

Seulement, un point demeure nébuleux: est-ce que les CAFs pourraient constituer une barrière stromale perméable comme stipulé dans notre hypothèse?

5.2 Les CAFs : possible barrière stromale perméable?

Nos résultats par microscopie confocale nous ont permis d'observer que les Ramos ne font pas qu'adhérer et interagir avec les Fbs, ils sont également internalisés ou englobés dans le corps cellulaire des Fbs, phénomène correspondant à l'empéripolèse et que nous avons observé précédemment avec les leucocytes [1]. Le marquage des jonctions intercellulaires des Fbs à la β -caténine nous a permis de confirmer 1) la présence d'une monocouche comme le montre la figure 11 et 2) la capacité des Ramos à transmigrer tant de façon paracellulaire que transcellulaire. Les représentations 3D sont sans équivoque, les Ramos en adhésion sur une monocouche de Fbs sont bel et bien internalisés dans le cytoplasme des Fbs et les cônes de migration sont entourés de filaments intermédiaires positifs à la vimentine. Aussi, grâce à la vidéomicroscopie, nous avons pu visualiser ce phénomène d'empéripolèse en temps réel sur une durée de 140 minutes. Cette vidéo nous a permis de distinguer deux phases : une phase d'adhésion prolongée qui a duré 70 min où les Ramos semblaient rouler à la surface des Fbs et une phase d'empéripolèse où les Ramos ont été internalisés par les Fbs. Finalement, l'emploi d'anticorps spécifiques nous ont permis de visualiser une colocalisation 3D de la sous-unité α_4 et de VCAM-1 à la jonction d'adhésion des Ramos aux Fbs.

La globalité de ces résultats suggère que l'adhésion des Ramos aux Fbs résulte en leur empéripolèse par les Fbs et que ce processus cellulaire implique le couple de récepteurs $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1.

L'équipe de Song *et al.* a récemment publié des résultats montrant que sur 50 spécimens de carcinomes oraux squameux (COS), 70% d'entre eux (35) endossaient une augmentation de l'expression de $\alpha_4\beta_1$ et qu'au sein des ECs dérivées de ces carcinomes, lorsque stimulées par le TNF- α à 10 ng/mL, l'expression de VCAM-1 était significativement augmentée ainsi que l'adhésion et la "fusion" des cellules de COS à l'endothélium. De surcroît, le blocage fonctionnel de $\alpha_4\beta_1$ et de VCAM-1 a significativement diminué l'adhésion et la "fusion" des cellules COS. Cette étude a conclu en affirmant que le TNF- α favoriserait non seulement l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium via le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 mais initierait également leur "fusion", un mécanisme régulateur qui aurait d'importantes

implications dans le développement de stratégies thérapeutiques pour prévenir la formation de métastases [163]. Pourquoi appeler "fusion" un phénomène cellulaire répertorié, décrit et observé depuis plus d'un demi siècle et qui porte déjà le nom d'empéripolèse?

Comme Song *et al.*, nos résultats montrent que les Fbs augmentent leur niveau d'expression de VCAM-1 suite à une stimulation préalable par le TNF- α . Cette stimulation a également eu pour effet 1) d'augmenter l'interaction Ramos-Fb ainsi que BP- $\alpha_4\beta_1$ -Fb et 2) de hausser l'empéripolèse des BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs. Ce qui ressort de l'étude de Song *et al.* est qu'elle est similaire à la nôtre à part que les Fbs sont remplacés par des ECs.

Parallèlement, une étude a montré que les lignées de mélanomes humains hautement invasives, les lignées 530, IF6, BLM et MV3 interagissent avec les cellules endothéliales avec une haute affinité et cette interaction repose essentiellement sur le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 [59]. Nous avons utilisé les mêmes lignées pour l'obtention des résultats préliminaires. La corrélation positive non linéaire dérivée de la compilation des capacités adhésive de ces lignées aux Fbs en fonction de leur niveau d'expression de la sous-unité α_4 de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ nous a permis de soutenir l'hypothèse que les cellules tumorales, quelle que soit leur souche ou leur typologie, pourraient interagir directement avec les Fbs via le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1.

Ces 2 études regroupées en plus des résultats présentés dans ce mémoire suggèrent une conclusion surprenante mais qui se défend très bien : **dans un contexte inflammatoire de tumorigénèse, les Fbs pourraient se comporter comme des ECs.** Suite à une stimulation par le TNF- α , l'interaction Ramos-Fb et BP- $\alpha_4\beta_1$ -Fb est modulée de la même façon que l'interaction COS-EC [163] et cette adhésion s'est traduite par l'empéripolèse des Ramos et des BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs et les cellules COS par les ECs [163]. Aussi, les lignées de mélanomes humains 530, IF6, BLM et MV3 adhèrent aussi bien aux ECs qu'aux Fbs via le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1.

Une telle conclusion a des implications cellulaires et moléculaires importantes. La barrière endothéliale joue un rôle crucial dans la perméabilité vasculaire durant les processus d'extravasation et d'intravasation [2, 5, 89, 90, 164]. Le terme "perméabilité fibroblastique" mérite une reconnaissance légitime, nos résultats lui accordant toute sa force. Mais au-delà de

toute considération rhétorique, les Fbs expriment des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) habituellement exprimées à la surface endothéliale; *in vivo*, les CAFs les surexpriment à l'échelle génique et leur expression peut-être modulée par des cytokines inflammatoires [66]. Ils interagissent autant avec les lymphocytes B et les neutrophiles qu'avec les lymphomes et une multitude de lignées tumorales de typologies et de souches différentes. Pour terminer, nous avons montré dans une étude antérieure, que les lymphocytes B et les granulocytes peuvent transmigrer à travers une monocouche de fibroblastes dans des chambres de Boyden, que cette transmigration pouvait être modulée par des agents inflammatoires et chimiotactiques, qu'elle correspondait autant à de la migration transcellulaire que paracellulaire et finalement, qu'elle impliquait entre autres le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1.

Nos présents résultats, jumelés aux précédents ainsi qu'a ceux de Song *et al.*, mettent en exergue la possible existence d'une **barrière fibroblastique stromale perméable** dans le MET inflammatoire, perméabilité associée au phénomène d'empéripolèse et qui semble reposer sur un mécanisme commun à la migration transcellulaire via le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. Le rôle de cette barrière stromale perméable est certes à examiner bien que certaines hypothèses ont déjà été proposées dans la littérature.

5.3 L'empéripolèse, une forme de perméabilité fibroblastique?

Le phénomène le plus fascinant de l'empéripolèse est le destin de la cellule internalisée. Beaucoup d'études rendent compte de ce processus cellulaire: il est largement décrit et observé. D'un point de vue mécanistique, la meilleure description qui en est faite est celle relative à la migration transcellulaire. Pour former des structures cellule-dans-cellule, la cellule doit être internalisée activement ou passivement. Un jeu de rôle apparaît. Est-ce l'hôte qui est proactive en internalisant sa cible ou est-ce une cellule donnée qui envahit une hôte passive? Autrement dit, d'où provient la force d'internalisation et de propulsion? Notre modèle mimétique, bien qu'imparfait, nous permet de répondre aisément à cette question. En effet, les billes fluorescentes de polystyrène tapissées de $\alpha_4\beta_1$ se sont comportées en tout point comme les Ramos: 1) leur capacité adhésive aux Fbs s'est avérée modulable et 2) leur capacité à transmigrer dans le corps cellulaire des Fbs est également similaire aux Ramos. Une conclusion s'impose: **l'adhésion suivie de l'empéripolèse des Ramos par les Fbs via le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 dépend surtout des Fbs.** Remplacer les Ramos par des particules inertes n'a en rien entravé ces processus cellulaires ce qui implique que la force d'internalisation provient des Fbs. En d'autres termes, l'hôte joue un rôle proactif en internalisant une cellule cible passive.

Cette capacité d'internalisation des Fbs a déjà été étudiée dans un contexte de dégradation du collagène matriciel. En effet, les Fbs sont capables de phagocyter des billes de collagène grâce à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$; la sous-unité α_2 serait rapidement recyclée ou synthétisée suite à la phagocytose alors que la sous-unité β_1 serait davantage impliquée dans l'étape d'internalisation [165]. La dégradation du collagène s'accompagnait d'une augmentation concomitante de l'acidité ce qui suggère que la machinerie cellulaire requise pour la dégradation intracellulaire du collagène au sein des Fbs ressemblerait au système vacuolaire des macrophages [166]. Le désassemblage des filaments d'actine des récepteurs β_1 faciliterait ainsi la liaison des billes de collagène et favoriserait la mobilité du récepteur à collagène à la surface cellulaire [167].

L'empéripolèse des Ramos par les Fbs ne s'est aucunement soldée par leur dégradation. Par contre, leur adhésion repose essentiellement sur la sous-unité β_1 de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$. Ces données indiquent que les **Fbs constituent un type cellulaire capable d'internalisation via leur sous-unité β_1** . Cette internalisation pourrait correspondre à 1) de la phagocytose, comme le montre la dégradation du collagène dépendante de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ ou à 2) de l'empéripolèse, comme le montre l'englobement des Ramos et des lymphocytes B dépendant du couple $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1. Le devenir des cellules internalisées est certes un grand point de discrimination qui mériterait d'être étudié.

Une question demeure. Quel est le rôle physiopathologique de cette empéripolèse? Justement, la littérature a proposé plusieurs explications physiopathologiques conséquentes au phénomène d'empéripolèse ou formation de structures "cellule-dans-cellule" que nous allons énumérer, discuter et mettre en perspective par rapport à nos résultats et à notre hypothèse.

La première, et la plus classique, est que l'empéripolèse par la cellule hôte serait une forme de cannibalisme, où la cellule internalisée est dégradée pour que l'hôte bénéficie de nutriments assurant sa survie. Cette proposition est soutenue par plusieurs observations *in vitro* de lymphocytes dégénérés dans des Fbs et dans des cellules réticulaires du thymus [125, 168]. Fais *et al.* soutiennent cette hypothèse en rapportant que l'ingestion de cellules T vivantes a conféré un avantage de survie à des cellules de mélanomes métastatiques en culture dans des conditions de privation métabolique [169].

Nos présentes observations par microscopie confocale et l'étude précédente du laboratoire [1] n'ont jamais révélé une dégradation des lymphocytes B et des Ramos dans le corps cellulaire des Fbs. Au contraire, on percevait très bien la préservation de l'intégrité de la membrane plasmique des Ramos. Par contre, la monocouche de Fbs était clairement altérée, perforée de cônes de migration et certains Fbs avaient perdu leur intégrité cellulaire. Cette observation impose une reconsidération des choses. Le cannibalisme peut être perçu dans les deux sens : la cellule cible, une cellule tumorale, pourrait envahir une cellule hôte afin de bénéficier de nutriments et d'assurer ainsi sa survie dans un contexte de stress métabolique.

Il faut se propulser dans le MET pour mieux concrétiser cette perspective. Lorsque les cellules tumorales acquièrent une capacité motile, qu'elles se détachent de la tumeur primaire, qu'elles reprogramment leurs récepteurs de surface comme mécanisme échappatoire à l'*anoïkis*, elles se retrouvent dans le stroma tumoral enrichi en CAFs. Comme déjà mentionné, ces derniers surexpriment VCAM-1 et constituent des partenaires d'interaction directe des cellules tumorales reconnues pour surexprimer l'intégrine $\alpha_4\beta_1$. Les cellules tumorales invasives, alors en suspension dans l'espace péritumoral et en attente d'une surface propice à leurs déplacements, se retrouvent en forte proximité avec les CAFs qui représentent jusqu'à 75% du stroma tumoral, en nombre et en volume. Nos résultats montrent que les CAFs sont perméables aux cellules tumorales grâce au couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. Dans un contexte de stress métabolique, le microenvironnement immédiat est limité en oxygène et en nutriments. La perspective d'un cannibalisme des CAFs par les cellules tumorales serait donc cohérente et plausible dans un tel contexte.

La deuxième explication la plus populaire est la protection de la cellule cible par l'hôte. L'exemple le mieux caractérisé est l'observation d'oligodendrocytes viables dans le cytoplasme d'astrocytes au sein du cerveau de patients atteints de sclérose multiple, un syndrome de démyélinisation auto-immune caractérisant la maladie de Creutzfeld-Jacob, un désordre neurologique dégénératif [170]. Les oligodendrocytes synthétisent la myéline qui couvre et protège les axones neuronales. Ces études rapportent que les astrocytes endossent un rôle protecteur et l'internalisation des oligodendrocytes leur a permis de survivre, d'assurer leur maturation et même de proliférer [171, 172].

Dans le cadre de notre étude, nous avons observé des Ramos complètement englobés dans le cytoplasme des Fbs, autant dans les tests d'adhésion sur lame qu'en suspension. Il est donc plausible qu'*in vivo*, lorsque les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire et qu'elles se retrouvent dans le stroma tumoral enrichi en CAFs, leur internalisation via le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 aurait pour conséquence de les protéger. En effet, le stroma tumoral est hautement inflammatoire et plusieurs études indiquent que les cellules inflammatoires, notamment les cellules T, envahissent les cellules tumorales et initient une cascade de cytotoxicité [124, 173-176]. Une corrélation a même été observée entre l'habileté des cellules NK à envahir des cellules de mélanome en culture par empéripolèse et le niveau de

cytotoxicité engendré [175]. Il est donc cohérent de stipuler que l'empéripolèse des cellules tumorales exprimant l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ par les CAFs serait, entre autres, un mécanisme de protection face à l'immunosurveillance dans le MET inflammatoire.

Une troisième explication a été proposée pour décrire les échanges de matériel génétique engendrés par empéripolèse. La formation de structures "cellule-dans-cellule" entre cellules tumorales voisines ou entre des cellules tumorales et des cellules hématopoïétiques pourraient aboutir à 1) de la tétraploïdie, 2) de l'aneuploïdie ou encore, 3) au mélange génique de cellules tumorales et de cellules normales [123]. Dans cet ordre d'idées, une étude a rapporté, au sein de cellules HEK-293 exprimant la forme activée d'AKT2, que le processus d'internalisation s'est accompagné d'une augmentation concomitante d'aneuploïdie dans ces cellules [177].

Notre approche expérimentale ne nous permet pas d'évaluer cette possibilité. Il aurait toutefois été intéressant de récolter les Ramos, d'une part, et les Fbs, d'autre part, puis de les remettre en culture pour observer un changement du comportement cellulaire, du profil d'expression des récepteurs de surface et plus particulièrement, de la capacité motile des Ramos. Cette perspective devrait être examinée car cet échange d'informations génétiques pourrait avoir de profondes répercussions sur le comportement cellulaire des cellules tumorales, notamment le développement de l'aneuploïdie, l'instabilité génétique et l'émergence de sous-clones tumoraux plus invasifs et plus résistants.

Pour conclure cette section, la représentation schématique de la figure 20 est une récapitulation des résultats obtenus et une brève revue du devenir des cellules tumorales suite à leur empéripolèse par les CAFs dans un contexte physiopathologique. Il est plausible de supposer que les cellules tumorales internalisées le sont autant pour leur protection, leur survie ou encore, pour l'émergence de nouveaux sous-clones tumoraux plus invasifs et/ou plus résistants. Dépendamment du stade d'évolution de la tumeur, des conditions métaboliques et/ou des conditions thérapeutiques, l'empéripolèse pourrait endosser des rôles multiples et diversifiés qui mériteraient d'être étudiés.

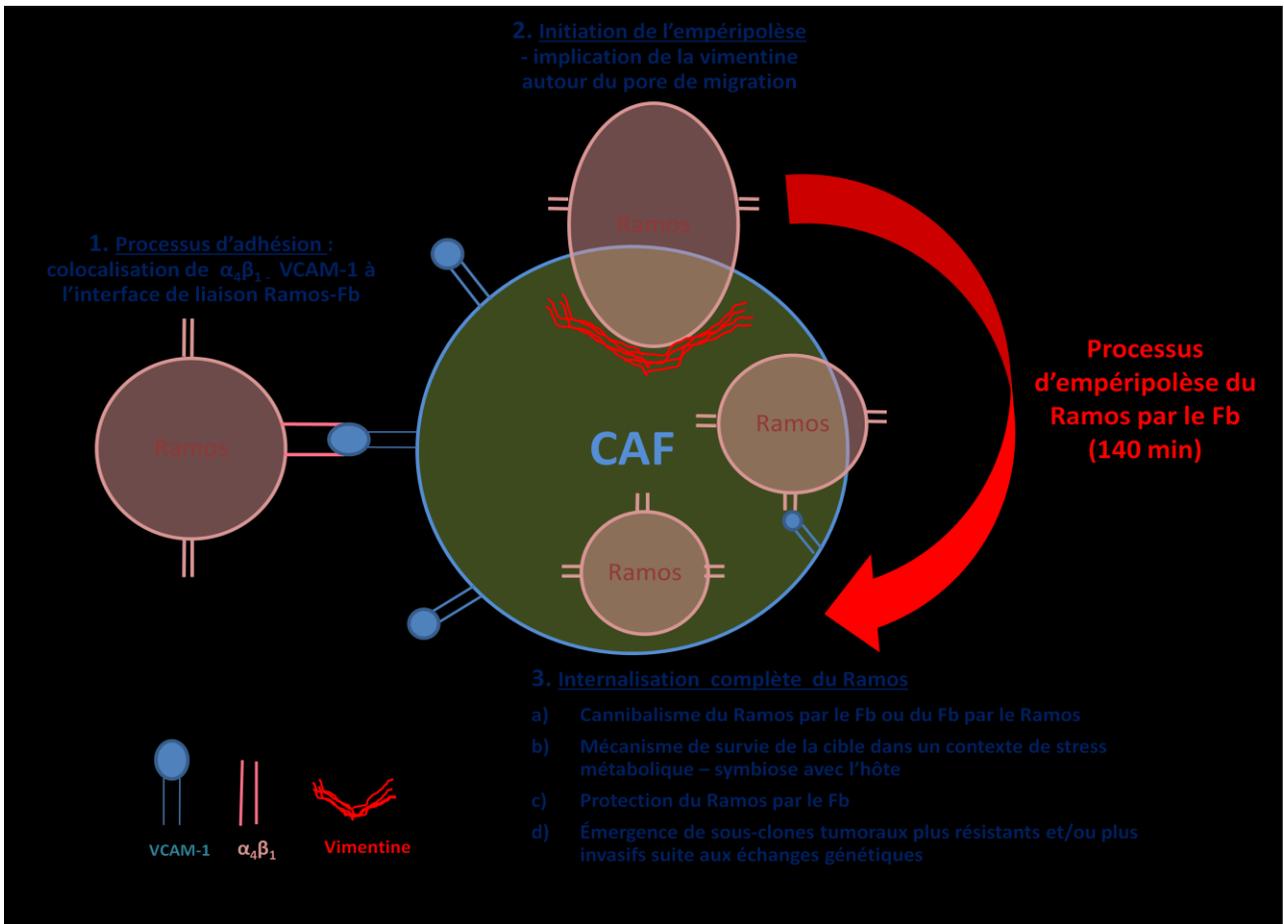


Figure 20: Récapitulation des faits saillants de cette étude. L'adhésion suivie de l'empéripolèse des Ramos par les Fbs est un processus cellulaire actif et modulable qui repose sur le couple de récepteurs $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. Les filaments intermédiaires sont concentrés autour des pores de transmigration et cette empéripolèse endosserait plusieurs fonctions physiopathologiques.

5.4 Est-ce que l'empéripolèse pourrait être observée *in vivo*?

Les Ramos interagissent directement avec les Fbs et cette interaction résulte en leur empéripolèse par les Fbs via le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. De plus, cette internalisation pourrait endosser plusieurs fonctions protumorale telles que discutées. Cibler le couple $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 demeurerait une stratégie efficace de prévention thérapeutique qui présente l'avantage de cibler une interaction spécifique au sein du stroma tumoral. Cependant, une grande question demeure. Est-ce que l'empéripolèse des Ramos par les Fbs, observée *in vitro*, pourrait se produire *in vivo*?

Justement, l'équipe de Peng *et al.* a développé un ligand de haute affinité de $\alpha_4\beta_1$, le LLP2A, un peptide mimétique qu'ils ont conjugué à la biotine et qui leur a permis de faire de l'imagerie de tumeurs *in vivo*. Leur étude rapporte que le LLP2A biotinylé a été internalisé par des tumeurs murines exprimant $\alpha_4\beta_1$ ce qui leur a permis de les visualiser par des méthodes optiques [178]. D'autres équipes ont conjugué ce peptide mimétique dans le but de faire de l'imagerie SPECT (*Single photon emission tomography*) ou PET (*Positron emission tomography*). Ces deux techniques d'imagerie ont été développées pour pouvoir observer et évaluer des fonctions cellulaires et moléculaires sans perturber l'hôte et dans le cas de plusieurs pathologies, comme le cancer, de faire de l'imagerie *in vivo* sans avoir recours à des pratiques invasives.

L'imagerie SPECT repose sur l'utilisation de radiomarqueurs, les plus couramment utilisés étant ^{99m}TC , ^{111}In , ^{123}I et ^{201}Tl . Ces radiomarqueurs sont conjugués à une molécule cible, le LLP2A, et l'utilisation d'une caméra gamma ainsi que sa rotation permet l'obtention d'une représentation 3D de la distribution des radiomarqueurs. Ces derniers ont la particularité d'avoir une longue durée de vie, de quelques heures à quelques jours, ils sont faciles à produire et sont abordables. Par contre, la faible résolution spatio-temporelle ainsi que l'obstacle éthique face à l'administration de radioactivité sont ses points les plus faibles [179].

Quant à l'imagerie PET, elle consiste à conjuguer un positron émetteur d'un épitope à une molécule cible, le LLP2A. Le positron anéanti les électrons dans l'espace immédiat ce qui

provoque l'émission de photons qui sont détectés et traités de façon à estimer la densité de l'anéantissement du positron et ainsi, mesurer la densité de la molécule originale à un emplacement donné. La présence d'un cyclotron est essentielle ce qui est souvent très onéreux. Par contre, PET offre une excellente résolution spatio-temporelle [179].

Une équipe a entrepris une étude comparative et a mis au point 1) le LLP2A-DOTA en conjuguant le LLP2A à un acide tétra-acétique puis le LLP2A-DOTA a été marqué avec ^{111}In pour l'imagerie SPECT et 2) LLP2A conjugué au ^{64}Cu puis mis en présence d'un chélateur de cuivre Cu(II) très stable (CB-TEA) pour l'imagerie PET [180]. Cette étude a révélé, grâce à un modèle de lymphome murin Raji, l'adduction de ^{64}Cu -CB-TEA2-LLP2A dans les tumeurs, la rate et la moelle osseuse, soient tous les tissus arborant un haut niveau d'expression de $\alpha_4\beta_1$ [180]. Une étude récente a rapporté l'emploi de ^{64}Cu -CB-TEA2-LLP2A comme un outil radiopharmaceutique pour cibler les cellules de moelle osseuse exprimant $\alpha_4\beta_1$ aux sites de métastases osseuses dans un modèle murin de carcinomes mammaires humains [181]. Cette étude a réussi à suivre la progression de la formation de métastases qui s'est manifestée par l'accumulation de cellules dérivées de la moelle osseuse exprimant $\alpha_4\beta_1$ dans différentes niches prémétastasiques. Ces accumulations ont pu être quantifiées grâce au ^{64}Cu -CB-TEA2-LLP2A. En résumé, ce radiomarqueur (^{64}Cu) est conjugué au ligand peptido-mimétique de haute affinité de $\alpha_4\beta_1$ (LLP2A) ce qui a permis son internalisation dans les tissus exprimant $\alpha_4\beta_1$. La révélation de cette internalisation a été possible grâce à l'ajout de Cu(II).

De façon comparable, les Ramos et toute cellule tumorale exprimant $\alpha_4\beta_1$, pourraient internaliser LLP2A ce qui permettrait sa détection *in vivo*. L'objectif est de visualiser le phénomène d'empéripolèse, soit la détection et la quantification de cellules tumorales exprimant $\alpha_4\beta_1$ dans le corps cellulaire des Fbs. Pour ce faire, il faudrait réaliser un double marquage qui permettrait la détection simultanée des Fbs et des cellules tumorales exprimant $\alpha_4\beta_1$.

Pour ce faire, il faudrait d'abord induire la formation de métastases dans un modèle murin, par exemple suite à l'injection sous-cutanée de Ramos ou de MV3 dans des souris de souche C57BL/6. Les tumeurs se développent normalement dans les 14 à 21 jours. Le LLP2A-

^{64}Cu serait par la suite administré de façon intraveineuse. Après 2 heures, les souris sont sacrifiées et les tumeurs prélevées. Des coupes de ces tumeurs sont préparées ce qui permettrait d'effectuer un double marquage. Les Fbs pourraient être détectés par un marquage spécifique, le FSP1 (fibroblast-specific protein 1) [182]. Puis, les Ramos ou les MV3 seraient détectés par l'ajout du chélateur Cu(II) (CB-TE2A). La lignée MDA-MB-231 reconnue pour ne pas exprimer $\alpha_4\beta_1$ pourrait servir de contrôle négatif. L'emplacement des tumeurs n'est pas encore un paramètre d'intérêt.

Ce double marquage permettrait une quantification 1) du ^{64}Cu -CB-TEA2-LLP2A internalisé par les Ramos ou MV3 exprimant $\alpha_4\beta_1$ au sein des tumeurs 2) du ^{64}Cu -CB-TEA2-LLP2A des Ramos ou MV3 en colocalisation avec le marquage FSP1. À ce stade, une étude statistique permettrait une quantification de la proportion relative des Ramos ou des MV3 en empéripolèse dans les Fbs par rapport à la quantité totale de Ramos ou MV3 présente. Bien entendu, cette quantification d'empéripolèse serait normalisée à l'adduction cellulaire du ^{64}Cu -LLP2A, qui correspond à la somme des fractions ^{64}Cu -LLP2A internalisée et liée. Une telle approche permettrait l'obtention de résultats sans précédent: une visualisation ainsi qu'une quantification du phénomène d'empéripolèse *in vivo*.

Une approche immunohistochimique, plus simple, pourrait également permettre l'observation de cette empéripolèse des Ramos par les Fbs au sein du même modèle murin évoqué ci-dessus. Les cellules de lymphomes sont reconnues pour être fortement positives au CD20 [135, 183, 184], une phosphoprotéine glycosylée exprimée à la surface des cellules B, et négatives au CD3 et CD43 [135]. Une fois les animaux sacrifiés et les lames montées, un marquage immunohistochimique au CD20 permettrait la détection des Ramos et un marquage FSP1 celle des Fbs. Un tel marquage pourrait être observé par microscopie et révélerait l'empéripolèse des Ramos dans les Fbs. D'ailleurs, Lopes *et al.* ont utilisé cette approche expérimentale pour rapporter l'empéripolèse de lymphomes malins dans des histiocytes [135], une des rares études qui prouvent que l'empéripolèse n'est pas un phénomène exclusif à la maladie de Rosai-Dorfman.

Avoir recours à un modèle animal serait particulièrement intéressant car le prélèvement des tissus tumoraux arborant l'empéripolèse de cellules tumorales par CAFs permettrait peut-être 1) la quantification du niveau de cytotoxicité, 2) la quantification du stress oxydatif, 3) la mise en culture ex-vivo des tumeurs dans le but de prélever des cellules tumorales post-empéripolèse afin d'étudier a) leurs propriétés motiles, b) leurs propriétés invasives, c) leur composition d'ADN, d) l'expression de leurs récepteurs de surface, particulièrement $\alpha_4\beta_1$ et finalement, e) leur résistance face à certains médicaments. Ces études permettraient de mieux comprendre le destin de la cellule internalisée et de mieux cerner l'empéripolèse dans un contexte physiologique et physiopathologique.

5.5 Empéripolèse et migration transcellulaire, mécanisme commun ou distinct?

Lorsqu'on parle d'empéripolèse, on l'associe intuitivement à la migration transcellulaire puisque l'internalisation se fait à travers le corps cellulaire de la cellule hôte. Avant de se concentrer sur le mécanisme impliqué dans ce processus cellulaire, il est essentiel de démystifier la migration transcellulaire, en saisir ses principaux composants pour finalement mettre en lumière si ces deux processus cellulaires seraient une suite logique l'un de l'autre.

Lossinsky et Shivers ont proposé que l'extravasation se produit préférentiellement par la voie qui oppose le moins de résistance (*path of least resistance*), une idée qui a récemment été supportée par une étude *in vivo* [185].

La présence de jonctions intercellulaires comme voie de transmigration paracellulaire ne constitue pas forcément la route la plus énergétiquement favorable. Contrairement à une perception assez commune et largement diffusée dans les livres académiques et les représentations schématiques, les jonctions interendothéliales *in vivo* sont souvent tortueuses et organisées par sections qui, souvent, se chevauchent [186] ce qui minimise la linéarité jonctionnelle. Les jonctions sont stabilisées par des complexes hautement organisés (jonctions adhérentes, jonctions serrées et jonctions de type GAP) couplés aux réseaux d'actine corticale [164]. La migration de type paracellulaire implique un coût énergétiquement élevé pour le désassemblage des jonctions ainsi que l'assemblage des fibres de stress dépendante de Rho pour induire une contraction endothéliale [187, 188].

Au contraire, l'épaisseur totale de l'endothélium qui doit être franchie par migration transcellulaire est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres aux sites périphériques ou péri-jonctionnels ($\approx 5 \mu\text{m}$), distance à estimer à la baisse en raison de la présence de vésicules endothéliales ainsi que de calvéoles attachées à la membrane plasmique [189-192]. Même s'il est difficile de donner des valeurs absolues, intuitivement, il est raisonnable de penser que la migration transcellulaire impliquerait une barrière énergétique plus faible que celle de la

migration paracellulaire et constituerait donc une voie de transmigration énergétiquement favorable. Supportant cette idée, une étude a montré, dans un modèle murin de scléroses multiples (encéphalomyélite auto-immune), que 100% des lymphocytes qui transmigrent à travers la barrière sang-cerveau le font par voie transcellulaire [186].

Intuitivement, il est raisonnable de supposer que la transmigration d'une cellule à travers une autre cellule impliquerait deux mécanismes complémentaires, celui de la cellule envahie qui accommode, via toute sa machinerie intracellulaire, une autre cellule dans son cytoplasme. Quant à la cellule internalisée, elle amorcerait une sorte de "cascade d'entrée" qui complèterait les efforts déployés par la cellule hôte.

Justement, il a été proposé et observé que la migration transcellulaire des leucocytes à travers l'endothélium dépend de la formation de structures spécifiques, à la surface des leucocytes, résultant de la polymérisation des microfilaments d'actine. En effet, de multiples études rendent compte de la formation de protrusions, similaires à des podosomes, qui avoisinent les 500 nm en diamètre et en profondeur et qui se forment préférentiellement sur la face ventrale des cellules hautement migratoires [193-195]. En ce qui a trait aux cellules cancéreuses, des analyses d'ultrastructures *in vivo* et *in vitro* ont révélé la présence d'un continuum de protrusions de différentes profondeurs, allant de 100 à 2000 nm. Celles supérieures à 1000 nm portent le nom de podosomes invasifs, des structures qui partagent beaucoup de similarités avec les invadopodes et qui confèrent des propriétés invasives aux cellules tumorales hautement métastatiques [195, 196].

Il a été rapporté que ces invadopodes sont composés des réseaux d'actine dendritique, celle spécifique aux lamellipodes, et des structures d'actine en faisceaux spécifiques aux filopodes [197]. La délétion des marqueurs lamellipodiaux et filipodiaux a significativement réduit la formation d'invadopodes ce qui a confirmé l'importance de ces deux types de structures d'actine dans la formation des invadopodes. Par contre, pour ce qui est de l'élongation des invadopodes, elle semble impliquer les filaments intermédiaires, notamment la vimentine, et les microtubules. Cette élongation permet aux cellules tumorales de franchir la

membrane basale pour atteindre le stroma. Cette cinétique tri-phasique impliquerait donc tous les composants du cytosquelette.

Il est important de mentionner que le phénomène d'empéripolèse des Ramos par les Fbs dépend surtout des Fbs car lorsque les Ramos sont remplacés par des BP- $\alpha_4\beta_1$, la présence de ces particules inertes n'a en rien entravé leur processus d'internalisation par les Fbs. Ceci implique que les Ramos jouent un rôle passif ce qui nous permet d'écarter la possible formation d'une quelconque structure dépendante de l'actine en leur sein. D'ailleurs, nos tentatives expérimentales par microscopie confocale n'ont pu révéler la formation d'un quelconque réseau d'actine près des cônes de transmigration des Ramos. Par contre, la vimentine a été observée autour des cônes de transmigration des Ramos dans le corps cellulaire des Fbs ce qui sous entend la participation des filaments intermédiaires des Fbs dans cette empéripolèse.

Dans la même optique, des études avec des ECs rendent compte de la participation active des ECs dans la transmigration des leucocytes. La formation de "structures d'accueil" ou "*docking structures*" qui semblent étreindre les leucocytes a été observée à la surface endothéliale *in vivo* [191, 198, 199]. Barreiro *et al.* ont été le premier groupe à décrire ces structures endothéliales riches en actine, α -actinine, vinculine, VASP, ezrine, moesine ainsi que ICAM-1 et VCAM-1 [200]. Dans leur modèle, l'attachement des leucocytes a induit un agglomération d'ICAM-1 et de VCAM-1 à la surface endothéliale ce qui a permis de mettre en évidence la présence de cônes comme guides directionnels pour la transmigration des leucocytes [201]. La formation de ces cônes de transmigration requiert 1) la polymérisation localisée des filaments d'actine [200, 202], 2) la présence intacte des microtubules [202] et 3) l'implication des filaments intermédiaires, plus spécifiquement de la vimentine [144]. Ces études regroupées démontrent un lien mécanistique entre VCAM-1 et la vimentine dans la formation des cônes de transmigration des leucocytes dans les ECs.

Justement l'équipe de Nieminem *et al.* a rapporté qu'au sein des ECs, les filaments intermédiaires, plus spécifiquement la vimentine, régule la barrière qui gouverne l'extravasation leucocytaire. Ils ont rapporté que les homologues non cancéreux des Ramos, les

lymphocytes B, privilégient la voie de migration transcellulaire lors de leur migration transendothéliale. Les filaments intermédiaires des lymphocytes B, avec ceux des ECs, forment une structure d'ancrage dynamique aux sites de contact des deux types cellulaires [144]. De surcroît, la délétion de la vimentine a 1) altéré l'expression et la distribution des molécules d'adhésion critiques au processus d'extravasation (ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des ECs et la sous-unité β_1 à la surface des cellules mononucléaires du sang), 2) a compromis l'intégrité endothéliale et 3) a réduit significativement le processus d'extravasation.

Nos résultats conjugués à ceux des études mentionnées montrent 1) que les filaments intermédiaires jouent un rôle actif dans la migration transcellulaire des Ramos à travers les Fbs, ou empéripolèse des Ramos par les Fbs et 2) qu'ils jouent le même rôle pour la migration transcellulaire des lymphocytes B à travers les ECs. Plusieurs petites conclusions s'imposent: 1) les lymphocytes B et leurs homologues cancéreux, les Ramos, partageraient des mécanismes de migration transcellulaire communs; 2) comme mentionné ci-haut, les Fbs semblent se comporter et réagir comme des ECs; 3) la migration transcellulaire et l'empéripolèse partageraient un mécanisme d'internalisation commun mais le devenir cellulaire de la cellule internalisée les distinguerait et finalement, 4) il existe effectivement un lien mécanistique entre la vimentine et VCAM-1 qui mériterait d'être plus amplement étudié.

Nous avons développé un modèle mimétique qui consistait à tapisser des billes fluorescentes de polystyrène de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, nous permettant ainsi de remplacer les Ramos par les billes. Ce modèle mimétique s'est avéré très concluant car il nous a permis d'associer la modulation de l'interaction BP- $\alpha_4\beta_1$ -Fb à celle de la modulation de l'empéripolèse des BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs. L'augmentation significative de l'interaction BP- $\alpha_4\beta_1$ -Fb en présence de TNF- α et de MnCl₂ s'accompagne d'une augmentation significative de l'empéripolèse des BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs. Cette association suggère que le processus d'adhésion et celui d'empéripolèse sont étroitement liés, que l'adhésion via $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 résulte en l'empéripolèse des BP- $\alpha_4\beta_1$ par les Fbs.

Une des conclusions majeures de cette étude est que l'adhésion des Ramos aux Fbs et l'empéripolèse des Ramos par les Fbs partageraient un mécanisme commun qui

implique la vimentine et le couple de récepteurs $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. La deuxième grande conclusion de cette étude est que le processus d'empéripolèse des Ramos par les Fbs dépend majoritairement des Fbs.

5.6 $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1, protagoniste d'une possible résistance thérapeutique?

L'étude plus approfondie d'une possible interaction Ramos-Fb dans le stroma tumoral du MET m'a amenée à considérer une probable implication dans une possible résistance thérapeutique. Même si aucun antagoniste dirigé contre $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1 n'est administré dans le cadre d'un traitement contre le cancer à l'heure actuelle, cette éventualité sera bientôt envisagée et tout porte à croire qu'une résistance thérapeutique en sera sa plus grande limite. Des essais cliniques ont été entrepris pour le traitement des myélomes multiples (MM) et les résultats se font attendre.

Le natalizumab, le seul antagoniste commercialisé dans le cadre d'un traitement de la SM [203, 204] et de la maladie de Crohn [205], a fait l'objet de plusieurs retraits par son manufacturier en raison d'effets secondaires importants: certains patients immunodéprimés, estimés à 130 en mai 2011, sont décédés des suites d'une leuco-encéphalopathie multifocale progressive (PML) [206-209]. Il a été remis sur le marché en 2006 et n'a fait l'objet d'aucun retrait depuis parce que la FDA a estimé que les bénéfices cliniques étaient plus importants que les risques encourus. Le natalizumab bloquerait l'interaction $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1 mais cette action ne serait pas exclusive aux cellules tumorales, elle empêcherait simultanément la migration des leucocytes et affecterait ainsi l'inflammation.

La résistance thérapeutique est un important obstacle dans la plupart des traitements contre le cancer. La majorité des études qui se sont concentrées sur ce problème répertorient deux cas de résistance. Le premier est une résistance thérapeutique dite intrinsèque ou acquise des cellules cancéreuses, qui s'explique par la présence de mutations préexistantes qui confèrent un phénotype de résistance comme stipulé dans l'hypothèse de Luria-Delbruck [210]. Le deuxième est une résistance qui se développe suite à une thérapie qui visait à réduire le nombre de cellules tumorales initiales mais qui a échoué à éradiquer un nombre suffisant pour prévenir une récurrence clinique. Les outils diagnostiques nécessitent

approximativement 10^9 cellules tumorales pour une détection précoce et tout traitement qui réduit le nombre de cellules en deçà de ce seuil considère une rémission complète [152]. Dans les cas de récurrence après rémission, le courant de pensée actuel soutient que les cellules tumorales dérivent du phénomène de maladie minimale résiduelle ou MRD (*minimal residual disease*). Les facteurs impliqués dans la survie de ces cellules tumorales et dans le MRD peuvent être intrinsèques ou extrinsèques, soient dus à des facteurs internes ou externes à la cellule tumorale.

C'est très précisément dans cette perspective extrinsèque que l'interaction Ramos-Fb fait sa majestueuse entrée en scène. Dans le stroma tumoral, les CAFs constituent le type cellulaire dominant, ils sont enrichis en VCAM-1 et constitueraient des partenaires d'interaction directe des cellules tumorales exprimant $\alpha_4\beta_1$. Nos résultats, avec le soutien de plusieurs études antérieures, tendent à montrer que l'adhésion des cellules tumorales via leur sous-unité β_1 leur conférerait une résistance thérapeutique indirecte puisque l'interaction $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 favoriserait la survie cellulaire. En effet, des modèles *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'implication de la sous-unité β_1 est directement liée à l'acquisition d'une résistance thérapeutique. L'adhésion des cellules tumorales via leurs intégrines β_1 aurait engendré 1) une résistance thérapeutique des petites cellules pulmonaires tumorales [211], 2) une résistance au paclitaxel dans les tumeurs mammaires [212] et 3) une inhibition des bris de l'ADN double brin induit par l'etoposide au sein de cellules endothéliales murines dérivées de tumeurs [213]. À la lueur de ces résultats, bloquer l'interaction $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 serait une bonne stratégie de séquestration des cellules tumorales qui, via leur adhésion avec leur sous-unité β_1 , initieraient un programme de survie.

Dans les cancers de type hématopoïétiques, l'adhésion des cellules tumorales aux composants matriciels ou aux cellules stromales via l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ a engendré *de novo* une "résistance thérapeutique initiée par l'adhésion cellulaire" (*Cell adhesion-mediated drug resistance* CAM-DR) [214-219]. Une de ces études a montré que les cellules de myélomes sélectionnées résistantes ont une régulation à la hausse des sous-unités α_4 , β_1 et β_7 ce qui suggère l'implication de ces intégrines dans l'acquisition de ce phénotype [214]. Cette même étude révèle également que des cellules de myélomes sensibles à la médication ont subi une

désensibilisation suite à leur adhésion à la fibronectine et ce changement de phénotype n'était ni encouru par une baisse d'accumulation de ladite médication ni par une régulation à la hausse des membres de la famille de Bcl-2.

Ce phénotype CAM-DR a été observé en présence de différents types d'agents chémothéoriques, incluant le mephaman a (un agent alkylant), le doxorubicine (anthracycline, un inhibiteur de la topoisomérase II) et le mitoxantrone (anthracenedione, un inhibiteur de la topoisomérase II) [214-217, 220]. Et le plus important à mentionner est que ce CAM-DR est également impliqué dans l'acquisition d'une résistance au paclitaxel et etoposide, résistance conférée par l'intégrine β_1 . Une stratégie qui pourrait se montrer efficace serait de combiner ces agents chémothéoriques avec un agent anti- $\alpha_4\beta_1$. Il n'en demeure pas moins qu'administrer un antagoniste de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ engendrerait peut-être une immunodépression, un effet secondaire important.

Justement, une étude récente a montré que l'adhésion des cellules de lymphome humain aux cellules stromales humaines de la moelle osseuse (la lignée HS-5) les a fortement protégées de la toxicité induite par le rituximab [221]. Ce dernier est administré à des patients atteints de lymphomes et bien qu'il induise l'apoptose des cellules B malignes, il s'est avéré incapable d'éradiquer complètement les populations de lymphomes des MET de la moelle osseuse et des nodules lymphatiques. Par contre, la combinaison du rituximab avec le natalizumab s'est avérée très efficace à éradiquer le phénotype CAM-DR *in vitro*. Concrètement, le natalizumab a réduit l'adhérence des cellules de lymphome humain à la fibronectine de 75 à 95%; autrement dit, il a renversé la protection stromale contre le rituximab [221].

Bien que cette étude s'enlign parfaitement avec notre hypothèse, il est important de souligner que ce qui peut se révéler efficace *in vitro* ne l'est peut-être pas *in vivo* pour de multiples raisons, notamment un métabolisme trop rapide, une toxicité, l'inaccessibilité de la cible, les effets secondaires indésirables, etc. Aussi, une parenthèse s'impose: cette étude englobe les cellules stromales sans discriminer un type cellulaire particulier. À la lueur des résultats obtenus dans cette étude, ce serait la fraction des CAFs qui serait responsable du

phénotype CAM-DR. Le natalizumab a bloqué l'interaction $\alpha_4\beta_1$ - VCAM-1 ce qui a renversé ce phénotype presque intégralement.

Il est donc tout à fait plausible que **l'adhésion des cellules tumorales aux CAFs dans le MET enclencherait un mécanisme de survie cellulaire.** La majorité des agents cytotoxiques visent les cellules en division rapide, celles dont le cycle cellulaire est accéléré. Justement, plusieurs études tendent à montrer que l'adhésion des cellules tumorales via la sous-unité β_1 déclenche des voies de signalisation qui favorisent une quiescence cellulaire. Cette quiescence cellulaire a constitué un obstacle de taille dans l'éradication des cellules tumorales adhérentes à la MEC et aux cellules stromales de la moelle osseuse dans le MET de la moelle osseuse [217, 222-224]. On peut même parler d'interaction écran. De plus, il a été suggéré que l'adhésion via β_1 active d'autres voies de signalisation qui font pencher la balance vers la survie cellulaire au détriment de l'apoptose [225]. Une des implications physiopathologiques de l'adhésion des Ramos aux Fbs serait l'induction d'une survie cellulaire qui leur conférerait peut-être une résistance thérapeutique.

6 Conclusion

Pour la première fois, une interaction directe est observée, étudiée et caractérisée entre les Fbs et une multitude de lignées tumorales de différentes typologies et souches, interaction qui semble inhérente aussi bien aux Fbs qu'aux cellules tumorales. L'étude de l'interaction Ramos-Fb a révélé qu'elle repose principalement sur le couple de récepteurs $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1, qu'elle est modulable autant par le niveau d'inflammation induit à la surface des Fbs que par l'état d'affinité de l'intégrine. Cette interaction se concrétise par l'internalisation des Ramos dans le corps cellulaire des Fbs, phénomène correspondant à l'empéripolèse. L'utilisation d'un modèle mimétique de billes fluorescentes de polystyrène tapissées de $\alpha_4\beta_1$ a permis d'établir que les processus d'adhésion et d'empéripolèse sont étroitement liés et nécessitent le couple de récepteurs $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1. Cette empéripolèse implique également les filaments intermédiaires de vimentine autour des cônes de migration des Ramos ainsi que la colocalisation de la sous-unité α_4 et de VCAM-1 à l'interface d'adhésion des Ramos aux Fbs, deux conditions caractérisant la migration transcellulaire des lymphocytes B à travers l'endothélium vasculaire.

Dans un contexte physiopathologique, notre approche est innovatrice car elle cible un type cellulaire particulier du stroma tumoral, les CAFs. Considérant 1) une vision cafocentrique émergente, 2) que les CAFs représentent le constituant le plus important du stroma tumoral, 3) que leur nombre augmente massivement par rapport à tous les autres types cellulaires et 4) qu'ils initient toute une régulation mitogène, inflammatoire et pro-tumorale du stroma tumoral, ils constituent à la fois un bon choix et un excellent reflet de la réalité stromale du MET.

Les Fbs pourraient constituer une barrière stromale perméable au sein du stroma tumoral, perméabilité conférée par leur capacité d'empéripolèse, une forme de perméabilité fibroblastique qui favoriserait l'échappement des cellules invasives de la tumeur primaire. L'empéripolèse serait alors un des processus cellulaires impliqués dans la cascade métastatique. La raison d'être de cette empéripolèse mérite d'être étudiée, le devenir des

cellules internalisées pourrait permettre une meilleure compréhension de certains mécanismes, notamment celui d'une possible résistance thérapeutique conférée par l'ancrage des cellules tumorales via leurs sous-unités β_1 . Cibler le couple $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1 serait donc une excellente stratégie de contournement dans ce cas.

7 Bibliographie

1. Couture, P., et al., *Adhesion and transcellular migration of neutrophils and B lymphocytes on fibroblasts*. Exp Cell Res, 2009. **315**(13): p. 2192-206.
2. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
3. Witz, I.P., *The tumor microenvironment: the making of a paradigm*. Cancer Microenviron, 2009. **2 Suppl 1**: p. 9-17.
4. Franco, O.E., et al., *Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis*. Semin Cell Dev Biol. **21**(1): p. 33-9.
5. Carmeliet, P. et R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
6. Tilley, J.W., et al., *The discovery of VLA-4 antagonists*. Curr Top Med Chem, 2004. **4**(14): p. 1509-23.
7. Porter, J.R., *Novel VLA-4 antagonists*. IDrugs, 2000. **3**(7): p. 788-98.
8. Folkman, J., *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin Cancer Biol, 1992. **3**(2): p. 65-71.
9. Chambers, A.F., et al., *Critical steps in hematogenous metastasis: an overview*. Surg Oncol Clin N Am, 2001. **10**(2): p. 243-55, vii.
10. Langley, R.R. et I.J. Fidler, *Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis*. Endocr Rev, 2007. **28**(3): p. 297-321.
11. Johnson, J.P., *Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma*. Cancer Metastasis Rev, 1999. **18**(3): p. 345-57.
12. Kalluri, R. et M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
13. Franco, O.E. et S.W. Hayward, *Targeting the tumor stroma as a novel therapeutic approach for prostate cancer*. Adv Pharmacol, 2012. **65**: p. 267-313.
14. Pietras, K. et A. Ostman, *Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma*. Exp Cell Res, 2010. **316**(8): p. 1324-31.
15. Mueller, M.M. et N.E. Fusenig, *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 839-49.
16. Barsky, S.H., et al., *Desmoplastic breast carcinoma as a source of human myofibroblasts*. Am J Pathol, 1984. **115**(3): p. 329-33.
17. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
18. Parsonage, G., et al., *A stromal address code defined by fibroblasts*. Trends Immunol, 2005. **26**(3): p. 150-6.
19. Chang, H.Y., et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12877-82.
20. Rodemann, H.P. et G.A. Muller, *Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis*. Am J Kidney Dis, 1991. **17**(6): p. 684-6.

21. Simian, M., et al., *The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells*. Development, 2001. **128**(16): p. 3117-31.
22. Gabbiani, G., et al., *Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction*. Experientia, 1971. **27**(5): p. 549-50.
23. Desmouliere, A., et al., *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 56-66.
24. Rasanen, K. et A. Vaheri, *Activation of fibroblasts in cancer stroma*. Exp Cell Res, 2010. **316**(17): p. 2713-22.
25. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
26. Gabbiani, G., *The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 500-3.
27. Tsukada, T., et al., *HHF35, a muscle actin-specific monoclonal antibody. II. Reactivity in normal, reactive, and neoplastic human tissues*. Am J Pathol, 1987. **127**(2): p. 389-402.
28. Lohr, M., et al., *Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 550-5.
29. Bronzert, D.A., et al., *Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5763-7.
30. Shao, Z.M., et al., *Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated*. Oncogene, 2000. **19**(38): p. 4337-45.
31. Strutz, F., et al., *Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation*. Kidney Int, 2000. **57**(4): p. 1521-38.
32. Cat, B., et al., *Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 13): p. 2727-38.
33. Stuhlmann, D., et al., *Paracrine effect of TGF-beta1 on downregulation of gap junctional intercellular communication between human dermal fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(2): p. 321-6.
34. Kojima, Y., et al., *Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(46): p. 20009-14.
35. Cirri, P. et P. Chiarugi, *Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin*. Am J Cancer Res, 2011. **1**(4): p. 482-97.
36. Silzle, T., et al., *The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue*. Int J Cancer, 2004. **108**(2): p. 173-80.
37. Orimo, A. et R.A. Weinberg, *Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type*. Cell Cycle, 2006. **5**(15): p. 1597-601.
38. Fukumura, D., et al., *Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells*. Cell, 1998. **94**(6): p. 715-25.
39. Bremnes, R.M., et al., *The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(1): p. 209-17.

40. Brown, L.F., et al., *Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(5): p. 1041-56.
41. Stetler-Stevenson, et al., *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. Annu Rev Cell Biol, 1993. **9**: p. 541-73.
42. Akhurst, R.J., *TGF-beta antagonists: why suppress a tumor suppressor?* J Clin Invest, 2002. **109**(12): p. 1533-6.
43. Elenbaas, B. et R.A. Weinberg, *Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation*. Exp Cell Res, 2001. **264**(1): p. 169-84.
44. Aoyagi, Y., et al., *Overexpression of TGF-beta by infiltrated granulocytes correlates with the expression of collagen mRNA in pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2004. **91**(7): p. 1316-26.
45. Boire, A., et al., *PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells*. Cell, 2005. **120**(3): p. 303-13.
46. Sternlicht, M.D., et al., *The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis*. Cell, 1999. **98**(2): p. 137-46.
47. Friedl, P. et K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
48. van Kempen, L.C., et al., *Melanoma progression in a changing environment*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(2): p. 65-7.
49. Lynch, C.C. et L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication*. Differentiation, 2002. **70**(9-10): p. 561-73.
50. Hynes, R.O., *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1216-9.
51. Roy, R., et al., *Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(31): p. 5287-97.
52. Li, H., et al., *Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 805-15.
53. Giannoni, E., et al., *Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness*. Cancer Res, 2010. **70**(17): p. 6945-56.
54. Ruffini, P.A., et al., *Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer*. Cancer, 2007. **109**(12): p. 2392-404.
55. Matsuo, Y., et al., *CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1alpha co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer*. Int J Cancer, 2009. **124**(4): p. 853-61.
56. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. Cell, 2005. **121**(3): p. 335-48.
57. Kim, S.Y., et al., *Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases*. Clin Exp Metastasis, 2008. **25**(3): p. 201-11.
58. Cardones, A.R., et al., *CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta(1) integrin*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6751-7.

59. Klemke, M., et al., *High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers.* J Cell Physiol, 2007. **212**(2): p. 368-74.
60. Durning, P., et al., *Fibroblasts from patients with breast cancer show abnormal migratory behaviour in vitro.* Lancet, 1984. **2**(8408): p. 890-2.
61. Sugimoto, H., et al., *Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment.* Cancer Biol Ther, 2006. **5**(12): p. 1640-6.
62. Knudson, W., et al., *Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(21): p. 6767-71.
63. Wald, O., et al., *Interaction between neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts through the CXCL12/CXCR4 axis: role in non-small cell lung cancer tumor proliferation.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **141**(6): p. 1503-12.
64. Cornil, I., et al., *Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(14): p. 6028-32.
65. Gleave, M.E., et al., *Prostate and bone fibroblasts induce human prostate cancer growth in vivo: implications for bidirectional tumor-stromal cell interaction in prostate carcinoma growth and metastasis.* J Urol, 1992. **147**(4): p. 1151-9.
66. Nakagawa, H., et al., *Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles.* Oncogene, 2004. **23**(44): p. 7366-77.
67. von Andrian, U.H. et C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin.* N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
68. Carman, C.V. et T.A. Springer, *Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate.* Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(5): p. 533-40.
69. Strell, C. et F. Entschladen, *Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells.* Cell Commun Signal, 2008. **6**: p. 10.
70. Galdiero, M., et al., *Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins.* Infect Immun, 1997. **65**(2): p. 699-707.
71. van Wely, C.A., et al., *Expression of L-selectin on Th1 cells is regulated by IL-12.* J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1214-21.
72. Wyble, C.W., et al., *TNF-alpha and IL-1 upregulate membrane-bound and soluble E-selectin through a common pathway.* J Surg Res, 1997. **73**(2): p. 107-12.
73. Osborn, L., et al., *Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes.* Cell, 1989. **59**(6): p. 1203-11.
74. Rice, G.E. et M.P. Bevilacqua, *An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion.* Science, 1989. **246**(4935): p. 1303-6.
75. Gopalan, P.K., et al., *Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin.* J Immunol, 1997. **158**(1): p. 367-75.
76. Sriramarao, P., et al., *E-selectin preferentially supports neutrophil but not eosinophil rolling under conditions of flow in vitro and in vivo.* J Immunol, 1996. **157**(10): p. 4672-80.

77. Simon, S.I., et al., *Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4348-58.
78. Ley, K., et al., *Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 669-75.
79. Brunk, D.K., et al., *Sialyl Lewis(x)/E-selectin-mediated rolling in a cell-free system*. Biophys J, 1996. **71**(5): p. 2902-7.
80. Simon, S.I. et C.E. Green, *Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation*. Annu Rev Biomed Eng, 2005. **7**: p. 151-85.
81. Kunkel, E.J., et al., *Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3301-8.
82. Kobayashi, H., et al., *Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression*. Curr Med Chem, 2007. **14**(4): p. 377-86.
83. Petruzzelli, L., et al., *Structure and function of cell adhesion molecules*. Am J Med, 1999. **106**(4): p. 467-76.
84. Zimmerman, G.A., et al., *Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules*. Immunol Today, 1992. **13**(3): p. 93-100.
85. Zerneck, A., et al., *Combinatorial model of chemokine involvement in glomerular monocyte recruitment: role of CXC chemokine receptor 2 in infiltration during nephrotoxic nephritis*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5755-62.
86. Miles, F.L., et al., *Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2008. **25**(4): p. 305-24.
87. Dejana, E., et al., *Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue?* Exp Cell Res, 1999. **252**(1): p. 13-9.
88. Breviario, F., et al., *Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(8): p. 1229-39.
89. Hordijk, P.L., et al., *Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 12)**: p. 1915-23.
90. Corada, M., et al., *Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9815-20.
91. Corada, M., et al., *Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability*. Blood, 2001. **97**(6): p. 1679-84.
92. Lu, P., et al., *The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression*. J Cell Biol, 2012. **196**(4): p. 395-406.
93. Schwartz, M.A. et D.E. Ingber, *Integrating with integrins*. Mol Biol Cell, 1994. **5**(4): p. 389-93.
94. Giancotti, F.G. et F. Mainiero, *Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1198**(1): p. 47-64.
95. Giancotti, F.G. et E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1028-32.
96. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
97. Takada, Y., et al., *The integrins*. Genome Biol, 2007. **8**(5): p. 215.

98. Sixt, M., et al., *Beta1 integrins: zip codes and signaling relay for blood cells*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(5): p. 482-90.
99. Desgrosellier, J.S. et D.A. Cheresh, *Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(1): p. 9-22.
100. Diaz, L.K., et al., *Beta4 integrin subunit gene expression correlates with tumor size and nuclear grade in early breast cancer*. Mod Pathol, 2005. **18**(9): p. 1165-75.
101. Vonderheide, R.H., et al., *Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding to VLA-4*. J Cell Biol, 1994. **125**(1): p. 215-22.
102. Cybulsky, M.I., et al., *Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(17): p. 7859-63.
103. Luster, A.D., et al., *Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1182-90.
104. Okahara, H., et al., *Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis*. Cancer Res, 1994. **54**(12): p. 3233-6.
105. Garofalo, A., et al., *Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases*. Cancer Res, 1995. **55**(2): p. 414-9.
106. Schadendorf, D., et al., *Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(5): p. 366-71.
107. Fritzsche, J., et al., *Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches*. Thromb Haemost, 2008. **100**(6): p. 1166-75.
108. Danen, E.H., et al., *The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells*. Exp Cell Res, 1998. **238**(1): p. 188-96.
109. Landen, C.N., et al., *Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer*. Neoplasia, 2008. **10**(11): p. 1259-67.
110. Chen, Q. et J. Massague, *Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5520-5.
111. Podar, K., et al., *The selective adhesion molecule inhibitor Natalizumab decreases multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications*. Br J Haematol, 2011. **155**(4): p. 438-48.
112. Olson, D.L., et al., *Anti-alpha4 integrin monoclonal antibody inhibits multiple myeloma growth in a murine model*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(1): p. 91-9.
113. Mori, Y., et al., *Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis*. Blood, 2004. **104**(7): p. 2149-54.
114. Kibler, C., et al., *Adhesive interactions of human multiple myeloma cell lines with different extracellular matrix molecules*. Cell Adhes Commun, 1998. **5**(4): p. 307-23.
115. Uchiyama, H., et al., *Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines*. Blood, 1992. **80**(9): p. 2306-14.
116. Michigami, T., et al., *Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and alpha(4)beta(1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1953-60.

117. de la Fuente, M.T., et al., *Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax*. Leukemia, 1999. **13**(2): p. 266-74.
118. Nowlin, D.M., et al., *A novel cyclic pentapeptide inhibits alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin-mediated cell adhesion*. J Biol Chem, 1993. **268**(27): p. 20352-9.
119. Rijcken, E., et al., *ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate in vivo leucocyte adherence and inflammation in rat inflammatory bowel disease*. Gut, 2002. **51**(4): p. 529-35.
120. Humble, J.G., et al., *Biological interaction between lymphocytes and other cells*. Br J Haematol, 1956. **2**(3): p. 283-94.
121. Rosai, J. et R.F. Dorfman, *Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy. A newly recognized benign clinicopathological entity*. Arch Pathol, 1969. **87**(1): p. 63-70.
122. Rosai, J. et R.F. Dorfman, *Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy: a pseudolymphomatous benign disorder. Analysis of 34 cases*. Cancer, 1972. **30**(5): p. 1174-88.
123. Overholtzer, M. et J.S. Brugge, *The cell biology of cell-in-cell structures*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(10): p. 796-809.
124. Fujinami, N., et al., *Interaction of mononuclear leukocytes with malignant melanoma*. Lab Invest, 1981. **45**(1): p. 28-37.
125. Ioachim, H.L., *Emperipolesis of lymphoid cells in mixed cultures*. Lab Invest, 1965. **14**(10): p. 1784-94.
126. Tavassoli, M., *Emperipolesis by megakaryocytes in blood loss*. Br J Haematol, 1981. **49**(4): p. 660-1.
127. Chemnitz, J. et P. Bichel, *Tumour cell-tumour cell emperipolesis studied by transmission electron microscopy*. Exp Cell Res, 1973. **82**(2): p. 319-24.
128. Shelton, E. et A.J. Dalton, *Electron microscopy of emperipolesis*. J Biophys Biochem Cytol, 1959. **6**: p. 513-4.
129. Lee, K.P., *Emperipolesis of hematopoietic cells within megakaryocytes in bone marrow of the rat*. Vet Pathol, 1989. **26**(6): p. 473-8.
130. Djaldetti, M. et Z. Strauss, *Emperipolesis by megakaryocytes in patients with non-Hodgkin's lymphoma and megaloblastic anemia*. J Submicrosc Cytol, 1982. **14**(2): p. 407-13.
131. Dreyer, D.A., et al., *A Study on Intracellular Lymphocytes ("Emperipolesis") in Tissue Culture of Lymph Nodes from Patients with Malignant Lymphoma*. Tex Rep Biol Med, 1964. **22**: p. 61-9.
132. Poppema, S., *Sternberg-Reed cells with intracytoplasmic lymphocytes. Phagocytosis or emperipolesis?* Virchows Arch A Pathol Anat Histol, 1978. **380**(4): p. 355-9.
133. Schumacher, H.R., et al., *Letter: Research, serendipity, and emperipolesis*. Lancet, 1974. **1**(7861): p. 812.
134. Takeya, M. et K. Takahashi, *Emperipolesis in a case of malignant lymphoma: electron microscopic and immunohistochemical investigation*. Ultrastruct Pathol, 1988. **12**(6): p. 651-8.
135. Lopes, L.F., et al., *Emperipolesis in a case of B-cell lymphoma: a rare phenomenon outside of Rosai-Dorfman disease*. Ann Diagn Pathol, 2003. **7**(5): p. 310-3.
136. Koller, P.C. et C. Waymouth, *Observations on intracellular leucocytes in tissue cultures of a rat tumour*. J R Microsc Soc, 1952. **72**(3): p. 173-6.

137. Pulvertaft, R.J., *Cellular associations in normal and abnormal lymphocytes*. Proc R Soc Med, 1959. **52**(5): p. 315-22.
138. Wekerle, H., et al., *Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization*. J Exp Med, 1980. **151**(4): p. 925-44.
139. Larsen, T.E., *Emperipolesis of granular leukocytes within megakaryocytes in human hemopoietic bone marrow*. Am J Clin Pathol, 1970. **53**(4): p. 485-9.
140. Chambers, A.F., et al., *Clinical targets for anti-metastasis therapy*. Adv Cancer Res, 2000. **79**: p. 91-121.
141. Burger, J.A. et T.J. Kipps, *Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(3): p. 461-6.
142. Caligaris-Cappio, F., *Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2003. **123**(3): p. 380-8.
143. Burger, J.A., et al., *The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies*. Blood, 2009. **114**(16): p. 3367-75.
144. Nieminen, M., et al., *Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(2): p. 156-62.
145. Garcia-Gila, M., et al., *Analysis of the activation state of alpha4beta1 integrin in human B cell lines derived from myeloma, leukemia or lymphoma*. FEBS Lett, 1997. **418**(3): p. 337-40.
146. Siegelman, M.H., et al., *The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion*. J Clin Invest, 2000. **105**(5): p. 683-91.
147. Okada, T., et al., *Significance of VLA-4-VCAM-1 interaction and CD44 for transendothelial invasion in a bone marrow metastatic myeloma model*. Clin Exp Metastasis, 1999. **17**(7): p. 623-9.
148. Juliano, R.L., *Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 283-323.
149. Luque, A., et al., *Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain*. J Biol Chem, 1996. **271**(19): p. 11067-75.
150. Shu, F., et al., *Activated alpha4 integrins are preferentially expressed on immature thymocytes and activated T cells*. Dev Immunol, 2002. **9**(2): p. 73-84.
151. Edlund, M., et al., *Integrin expression and usage by prostate cancer cell lines on laminin substrata*. Cell Growth Differ, 2001. **12**(2): p. 99-107.
152. Meads, M.B., et al., *The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2519-26.
153. Oshita, F., et al., *High expression of integrin beta1 and p53 is a greater poor prognostic factor than clinical stage in small-cell lung cancer*. Am J Clin Oncol, 2004. **27**(3): p. 215-9.
154. Yao, E.S., et al., *Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 659-64.
155. White, D.E., et al., *Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction*. Cancer Cell, 2004. **6**(2): p. 159-70.

156. Adachi, M., et al., *Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 96-101.
157. Soung, Y.H., et al., *Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression*. BMB Rep, 2010. **43**(5): p. 311-8.
158. Miyake, K., et al., *Requirement for VLA-4 and VLA-5 integrins in lymphoma cells binding to and migration beneath stromal cells in culture*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 653-62.
159. Langley, R.R., et al., *Endothelial expression of vascular cell adhesion molecule-1 correlates with metastatic pattern in spontaneous melanoma*. Microcirculation, 2001. **8**(5): p. 335-45.
160. Slack-Davis, J.K., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 is a regulator of ovarian cancer peritoneal metastasis*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1469-76.
161. Erez, N., et al., *Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner*. Cancer Cell, 2010. **17**(2): p. 135-47.
162. Toullec, A., et al., *Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(6): p. 211-30.
163. Song, K., et al., *Tumor necrosis factor-alpha enhanced fusions between oral squamous cell carcinoma cells and endothelial cells via VCAM-1/VLA-4 pathway*. Exp Cell Res, 2012. **318**(14): p. 1707-15.
164. Bazzoni, G. et E. Dejana, *Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis*. Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 869-901.
165. Lee, W., et al., *Role of integrins in regulation of collagen phagocytosis by human fibroblasts*. J Cell Physiol, 1996. **168**(3): p. 695-704.
166. Arora, P.D., et al., *A novel model system for characterization of phagosomal maturation, acidification, and intracellular collagen degradation in fibroblasts*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35432-41.
167. Segal, G., et al., *Involvement of actin filaments and integrins in the binding step in collagen phagocytosis by human fibroblasts*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 1): p. 119-129.
168. Tinari, A., et al., *Hyperphagia by self- and xeno-cannibalism: cell death by indigestion?: a reminiscence of the Phedrus Fabula "Rana Rupta et Bos"?* Autophagy, 2008. **4**(1): p. 128-30.
169. Lugini, L., et al., *Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3629-38.
170. Nishie, M., et al., *Oligodendrocytes within astrocytes ("emperipolesis") in the cerebral white matter in hepatic and hypoglycemic encephalopathy*. Neuropathology, 2006. **26**(1): p. 62-5.
171. Wu, E. et C.S. Raine, *Multiple sclerosis. Interactions between oligodendrocytes and hypertrophic astrocytes and their occurrence in other, nondemyelinating conditions*. Lab Invest, 1992. **67**(1): p. 88-99.
172. Shintaku, M. et C. Yutani, *Oligodendrocytes within astrocytes ("emperipolesis") in the white matter in Creutzfeldt-Jakob disease*. Acta Neuropathol, 2004. **108**(3): p. 201-6.
173. Radosevic, K., et al., *Occurrence and a possible mechanism of penetration of natural killer cells into K562 target cells during the cytotoxic interaction*. Cytometry, 1995. **20**(4): p. 273-80.

174. Xia, P., et al., *Emperipolesis, entosis and beyond: dance with fate*. Cell Res, 2008. **18**(7): p. 705-7.
175. Burns, E.R., et al., *Characterization of the cell population mediating cytotoxicity and emperipolesis in human malignant melanomas*. Trans Assoc Am Physicians, 1981. **94**: p. 366-71.
176. Pihl, E., et al., *Electron microscope observations of the in vitro interaction between human leucocytes and cancer cells*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1974. **52**(5): p. 737-43.
177. Jin, J. et J.R. Woodgett, *Chronic activation of protein kinase Bbeta/Akt2 leads to multinucleation and cell fusion in human epithelial kidney cells: events associated with tumorigenesis*. Oncogene, 2005. **24**(35): p. 5459-70.
178. Peng, L., et al., *Combinatorial chemistry identifies high-affinity peptidomimetics against alpha4beta1 integrin for in vivo tumor imaging*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(7): p. 381-9.
179. Rahmim, A. et H. Zaidi, *PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges*. Nucl Med Commun, 2008. **29**(3): p. 193-207.
180. Denardo, S.J., et al., *¹¹¹In-LLP2A-DOTA Polyethylene Glycol-Targeting {alpha}4{beta}1 Integrin: Comparative Pharmacokinetics for Imaging and Therapy of Lymphoid Malignancies*. J Nucl Med, 2009. **50**(4): p. 625-34.
181. Shokeen, M., et al., *Molecular imaging of very late antigen-4 (alpha4beta1 integrin) in the premetastatic niche*. J Nucl Med, 2012. **53**(5): p. 779-86.
182. Strutz, F., et al., *Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1*. J Cell Biol, 1995. **130**(2): p. 393-405.
183. Tedder, T.F., et al., *Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(1): p. 208-12.
184. Fang, D., et al., *A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9328-37.
185. Lossinsky, A.S. et R.R. Shivers, *Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review*. Histol Histopathol, 2004. **19**(2): p. 535-64.
186. Wolburg, H., et al., *Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(2): p. 181-90.
187. Luscinikas, F.W., et al., *Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair*. Semin Immunol, 2002. **14**(2): p. 105-13.
188. Wojciak-Stothard, B. et A.J. Ridley, *Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability*. Vascul Pharmacol, 2002. **39**(4-5): p. 187-99.
189. Azzali, G., et al., *Macrophage migration through the endothelium in the absorbing peripheral lymphatic vessel of the small intestine*. J Submicrosc Cytol Pathol, 1990. **22**(2): p. 273-80.
190. Cho, Y. et P.P. De Bruyn, *Internal structure of the postcapillary high-endothelial venules of rodent lymph nodes and Peyer's patches and the transendothelial lymphocyte passage*. Am J Anat, 1986. **177**(4): p. 481-90.
191. Feng, D., et al., *Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 903-15.

192. Azzali, G., et al., *The "mode" of lymphocyte extravasation through HEV of Peyer's patches and its role in normal homing and inflammation*. *Microvasc Res*, 2008. **75**(2): p. 227-37.
193. Allavena, P., et al., *Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium*. *J Exp Med*, 1991. **173**(2): p. 439-48.
194. Carman, C.V., et al., *Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes*. *Immunity*, 2007. **26**(6): p. 784-97.
195. Linder, S. et M. Aepfelbacher, *Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells*. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(7): p. 376-85.
196. Yamaguchi, H., et al., *Cell migration in tumors*. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(5): p. 559-64.
197. Schoumacher, M., et al., *Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia*. *J Cell Biol*. **189**(3): p. 541-56.
198. Faustmann, P.M. et R. Dermietzel, *Extravasation of polymorphonuclear leukocytes from the cerebral microvasculature. Inflammatory response induced by alpha-bungarotoxin*. *Cell Tissue Res*, 1985. **242**(2): p. 399-407.
199. Fujita, S., et al., *An ultrastructural study of in vivo interactions between lymphocytes and endothelial cells in the pathogenesis of the vascular leak syndrome induced by interleukin-2*. *Cancer*, 1991. **68**(10): p. 2169-74.
200. Barreiro, O., et al., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. *J Cell Biol*, 2002. **157**(7): p. 1233-45.
201. Wittchen, E.S., *Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009. **14**: p. 2522-45.
202. Carman, C.V., et al., *Endothelial cells proactively form microvilli-like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1*. *J Immunol*, 2003. **171**(11): p. 6135-44.
203. Rudick, R.A., et al., *Health-related quality of life in multiple sclerosis: effects of natalizumab*. *Ann Neurol*, 2007. **62**(4): p. 335-46.
204. Fiore, D., *Multiple sclerosis and Natalizumab*. *Am J Ther*, 2007. **14**(6): p. 555-60.
205. Ghosh, S., et al., *Natalizumab for active Crohn's disease*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(1): p. 24-32.
206. Aksamit, A.J., *Review of progressive multifocal leukoencephalopathy and natalizumab*. *Neurologist*, 2006. **12**(6): p. 293-8.
207. Kappos, L., et al., *Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring*. *Lancet Neurol*, 2011. **10**(8): p. 745-58.
208. Clifford, D.B., et al., *Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(4): p. 438-46.
209. Calabresi, P.A., et al., *The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL*. *Neurology*, 2007. **69**(14): p. 1391-403.
210. Coldman, A.J. et J.H. Goldie, *A stochastic model for the origin and treatment of tumors containing drug-resistant cells*. *Bull Math Biol*, 1986. **48**(3-4): p. 279-92.

211. Hodkinson, P.S., et al., *ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through beta1 integrin-dependent activation of PI3-kinase*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(10): p. 1776-88.
212. Aoudjit, F. et K. Vuori, *Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells*. *Oncogene*, 2001. **20**(36): p. 4995-5004.
213. Hoyt, D.G., et al., *Integrin activation suppresses etoposide-induced DNA strand breakage in cultured murine tumor-derived endothelial cells*. *Cancer Res*, 1996. **56**(18): p. 4146-9.
214. Damiano, J.S., et al., *Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines*. *Blood*, 1999. **93**(5): p. 1658-67.
215. Damiano, J.S., et al., *Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation*. *Leukemia*, 2001. **15**(8): p. 1232-9.
216. Hazlehurst, L.A., et al., *Cell adhesion to fibronectin (CAM-DR) influences acquired mitoxantrone resistance in U937 cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(4): p. 2338-45.
217. Hazlehurst, L.A., et al., *Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR)*. *Oncogene*, 2000. **19**(38): p. 4319-27.
218. Hazlehurst, L.A., et al., *Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells*. *Blood*, 2001. **98**(6): p. 1897-903.
219. Yanamandra, N., et al., *Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(2): p. 591-9.
220. Hazlehurst, L.A., et al., *Genotypic and phenotypic comparisons of de novo and acquired melphalan resistance in an isogenic multiple myeloma cell line model*. *Cancer Res*, 2003. **63**(22): p. 7900-6.
221. Mraz, M., et al., *Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin alpha-4-beta-1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance*. *Br J Haematol*, 2011. **155**(1): p. 53-64.
222. Jundt, F., et al., *Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells*. *Blood*, 2004. **103**(9): p. 3511-5.
223. Nefedova, Y., et al., *Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines*. *Blood*, 2004. **103**(9): p. 3503-10.
224. Lwin, T., et al., *Cell adhesion induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas*. *Blood*, 2007. **110**(5): p. 1631-8.
225. Shain, K.H., et al., *Adhesion-mediated intracellular redistribution of c-Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-like inhibitory protein-long confers resistance to CD95-induced apoptosis in hematopoietic cancer cell lines*. *J Immunol*, 2002. **168**(5): p. 2544-53.

8 Annexe 1: étude précédente du laboratoire

Patrick Couture, Jérémie Paradis-Massie, Nadia Oualha, Gaétan Thibault, Adhesion and transcellular migration of neutrophils and B lymphocytes on fibroblasts. *Exp Cell Res*, 2009, **315**(13): p.2192-206.

Ma contribution à cet article a été de comparer la capacité adhésive des cellules sanguines mononuclées et polymorphonucléaires du sang total de rat avec différentes souches de Fbs, soient des Fbs cardiaques et des Fbs de la peau. Les résultats sont présentés à la figure 3 et nous ont permis de montrer que cette capacité adhésive est inhérente aux Fbs.

De surcroît, j'ai confirmé les résultats montrés à la figure 6 par western blot (mentionné), à savoir l'augmentation de l'expression de VCAM-1 détectée par cytofluorométrie suite à une stimulation des Fbs au TNF- α .

9 Annexe 2: Vidéo de l'empéripolèse d'un Ramos sur une monocouche de fibroblastes

Le processus d'empéripolèse du Ramos par le Fb est situé à la jonction des deux lignes blanches perpendiculaires dans le plan xy et une projection de cet évènement sur les axes yz et xz permet de bien visualiser l'englobement du Ramos par le Fb en fonction du temps. Cette vidéo totalise 140 minutes et correspond à une analyse 3D de la jonction des deux lignes blanches selon 28 cycles de 5 minutes.