

Université de Montréal

**Rôle du TGF- β dans la modulation du
microenvironnement tumoral leucémique**

par

Louis-Philippe Caron

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de Maître

en Microbiologie et Immunologie

Septembre, 2013

© Louis-Philippe Caron, 2013

Résumé

Le microenvironnement tumoral et les cellules et molécules signal (cytokines et chimiokines) qu'ils contiennent sont reconnus comme jouant un rôle prépondérant dans la progression des tumeurs. Il devient donc nécessaire d'étudier la relation entre les molécules signal, les cellules infiltrantes et les cellules tumorales. Le TGF- β est une puissante cytokine immunosuppressive et suppressive de la croissance cellulaire, dont le rôle dans la formation du microenvironnement tumoral leucémique est mal connu.

Dans cette étude, nous avons étudié le modèle injectable de leucémie lymphoïde T EL4 (cellules tumorales produisant du TGF- β) de souche C57BL/6. Nous avons caractérisé l'infiltration de cellules myéloïdes et lymphoïdes au niveau des tumeurs par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence. L'analyse des cellules infiltrant les tumeurs EL4 nous a permis de montrer la forte présence de lymphocytes T et de cellules myéloïdes CD11b⁺. Nous avons donc poursuivi l'étude afin de mieux caractériser ces cellules. Nous avons montré que ces cellules se retrouvent en périphérie de la tumeur et en périphérie des vaisseaux sanguins de la tumeur. Ces cellules ont des phénotypes nous laissant croire qu'elles appartiennent à la famille des cellules dite myéloïdes suppressives. Ces cellules ont de forts niveaux de transcrits de VEGF et de MMP9 au niveau de la tumeur ainsi qu'au niveau systémique, mais ne semblent pas avoir une forte capacité inhibitrice *in vitro*. Afin de déterminer si la production tumorale de TGF- β influe le recrutement de ces cellules, nous avons transformé des cellules EL4 à l'aide d'un shRNA afin de diminuer la production de TGF- β (shRNA-TGF- β) et comparé l'infiltration myéloïde et lymphoïde de tumeurs formées avec des cellules EL4 contrôles (shRNA-Luc). Une diminution de 50% dans les niveaux de transcrits de TGF- β n'affecte pas la croissance tumorale mais semble diminuer l'infiltration par des cellules myéloïdes. La présente étude nous a permis de mieux comprendre le modèle de leucémie EL4 et le rôle des populations cellulaires myéloïdes dans le microenvironnement tumoral leucémique. La diminution du TGF- β produit par les cellules tumorales réduit l'infiltration de ces populations myéloïdes dans la tumeur EL4. Le rôle précis de ces cellules est encore à déterminer. Ces résultats sont en accord avec le fait qu'une thérapie anti-TGF- β n'est pas

suffisante pour contrer la progression tumorale, mais pourrait influencer sur le résultat post-chimiothérapie et l'immunothérapie en altérant la composition du microenvironnement.

Mots-clés : Cancer, Leucémie, TGF- β , Microenvironnement tumoral, Immunosuppression, MDSCs

Abstract

The cells and signal molecules (cytokines and chemokines) making up the tumoral microenvironment are known to play an essential role in tumor progression. It seems to be necessary to study the relationship between infiltrating cells, tumor cells and signal molecules. TGF- β is a potent immunosuppressive and growth suppressive cytokine whose role in the formation of the leukemia microenvironment remains unclear.

In this study, we investigated the injectable T lymphocyte leukemia EL4 model (tumor cells producing TGF- β) of C57BL/6 strain. We characterised the myeloid and lymphoid infiltration in EL4 tumors using flow cytometry and fluorescence microscopy. Our analysis of EL4 tumor infiltrating cells showed a high concentration of T lymphocytes and myeloid cells CD11b⁺. We have undertaken our study to better characterize these cells. We showed that these cells are present at the periphery of the tumor and are surrounding blood vessels in the tumor. These cells have phenotypes leading us to believe that they belong to the family of so-called myeloid suppressor cells. They have high levels of transcripts of VEGF and MMP9 in the tumor and the systemic level, but do not seem to have a strong inhibitory capacity *in vitro*. To determine whether the tumor production of TGF- β affects the recruitment of these cells, we transformed EL4 cells using a shRNA to reduce the production of TGF- β (TGF- β shRNA) and compared the myeloid and lymphoid infiltration of tumors formed with EL4 cell controls (shRNA-Luc). A 50% decrease in transcript levels of TGF- β does not affect tumor growth but appears to decrease infiltration by myeloid cells. This study allowed us to better understand the pattern of EL4 leukemia and the role of myeloid leukemia cell populations in the tumor microenvironment. The decrease of TGF- β produced by tumor cells reduces the infiltration of these myeloid populations within the EL4 tumor. The precise role of these cells still needs to be determined. These results are in agreement with the fact that anti-TGF- β therapy is not sufficient to counteract tumor progression, but may affect the post-chemotherapy and immunotherapy results by altering the composition of the microenvironment.

Keywords : Cancer, Leukemia, TGF- β , Tumor microenvironment, Immunosuppression

Table des matières

Liste des abréviations.....	ix
Introduction.....	1
1. La leucémie.....	3
1.1 Les traitements.....	5
2. TGF- β : Transforming Growth Factor Beta.....	7
2.1 La voie de signalisation du TGF- β	8
2.2 Rôle du TGF- β	13
2.1.1 Rôle du TGF- β dans l'organisme.....	13
2.1.2 Rôle du TGF- β dans la leucémie.....	14
3. Le microenvironnement tumoral.....	15
3.1 Les populations cellulaires infiltrantes.....	17
3.2 Les populations infiltrantes issues du système immunitaire.....	18
3.2.1 Les lymphocytes T régulateurs.....	18
3.2.2 Les MDSC: Myeloid-derived Suppressor Cells.....	19
3.2.3 Les macrophages.....	20
4. Les médiateurs et protéines d'intérêts.....	20
5. Vue d'ensemble, hypothèse et objectifs.....	23
6. Matériel et méthodes.....	24
6.1 Génération de tumeurs dans un modèle murin.....	24
6.2 Caractérisation des populations cellulaires infiltrantes.....	25
6.3 Caractérisation des populations Ly6c ⁺ et Ly6g ⁺	26
6.4 Caractérisation des populations CD11b ⁺	26
6.4.1 Localisation des cellules CD11b ⁺ infiltrant la tumeur.....	26
6.4.2 Évaluation de l'expression génique de TGF- β , VEGF et MMP9.....	27
6.4.3 Évaluation de l'effet anti-prolifératif des populations CD11b ⁺ sur les populations de lymphocytes T.....	28
6.4.4 Évaluation en microscopie de l'expression de TGF- β par les cellules CD11b ⁺	29
6.5 Transformation des cellules EL4.....	29

6.6	Caractérisation des populations infiltrant la tumeur EL4 transformée dans un modèle de souris B6.RAG et B6.SJL	30
6.7	Évaluation de la croissance des tumeurs EL4 transformées dans un modèle de souris B6.RAG1 et B6.SJL.....	31
6.8	Analyses statistiques	31
7.	Résultats	31
7.1	Caractérisation des leucocytes infiltrant l'environnement leucémique	31
7.1.1	Caractérisation des populations myéloïdes de la tumeur au jour 6.....	34
7.1.2	Caractérisation des populations myéloïdes de la tumeur au jour 21	35
7.1.3	Caractérisation des populations myéloïdes de la rate de souris porteuses de tumeurs au jour 6	36
7.1.4	Caractérisation des populations myéloïdes de la rate de souris porteuses de tumeurs au jour 21	37
7.1.5	Caractérisation des populations lymphoïdes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ de la rate de souris porteuses de tumeurs et de tumeurs EL4 au jour 6 et 21	39
7.2	Mesure de l'accumulation de lymphocytes T activés dans les rates de souris porteuses de tumeurs et de tumeurs EL4.....	41
7.2.1	Comparaison de l'activation entre les populations de lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ de rates et de tumeurs EL4	41
7.2.2	Accumulation de Th (CD4) effecteurs de rates et de tumeurs EL4	42
7.2.3	Accumulation de CTL (CD8) activés de rates et de tumeurs EL4	43
7.3	Caractérisation par microscopie des populations myéloïdes Ly6c et Ly6g de rates et de tumeurs EL4	45
7.4	Localisation des cellules myéloïdes (CD11b ⁺) dans la tumeur EL4.....	47
7.5	Mesure de l'expression génique de gènes d'intérêts par les cellules CD11b ⁺ de rates et de tumeurs EL4	49
7.5.1	Expression de TGF-β.....	49
7.5.2	Expression de VEGF	50
7.5.3	Expression de MMP9.....	51
7.6	Mesure de l'effet anti-prolifératif des cellules CD11b de rates et de tumeurs sur les lymphocytes T.....	53

7.7 Évaluation qualitative en microscopie de l'expression de TGF par les cellules CD11b de tumeurs EL4	56
7.8 Caractérisation des populations infiltrantes suivant le « knockdown » de TGF- β des cellules EL4.....	58
7.8.1 Caractérisation des populations de la tumeur au jour 6 dans le modèle murin B6.SJL	59
7.8.2 Caractérisation des populations de la tumeur EL4 shLuc et EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin B6.SJL	61
7.8.3 Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et shTGF- β au jour 6 dans le modèle murin B6.SJL.....	62
7.8.4 Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 au jour 21 dans le modèle murin B6.SJL.....	63
7.8.5 Caractérisation des populations de la tumeur EL4 shLuc et EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin RAG.B6	64
7.8.6 Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin RAG.B6	65
7.9 Évaluation de la croissance des tumeurs.....	68
8. Discussion	71
9. Conclusion	77
Bibliographie.....	79

Liste des figures

Figure 1 : L'hématopoïèse.....	2
Figure 2 : Structure du pro-TGF- β	9
Figure 3 : Processus de production, de sécrétion et d'activation du TGF- β	10
Figure 4 : Le TGF- β se lie au TGF- β R (Récepteur) de type I et de type II.	12
Figure 5 : Infiltration cellulaire du microenvironnement tumoral.	16
Figure 6 : Tumeur EL4 de 21 jours dans le bas du dos d'une souris B6.SJL	24
Figure 7 : Résultat type lors de l'isolation des populations myéloïdes d'une rate de souris par cytométrie en flux.	33
Figure 8 : Caractérisation des populations myéloïdes de la tumeur au jour 6.	34
Figure 9 : Caractérisation des populations myéloïdes de la tumeur au jour 21.	35
Figure 10 : Caractérisation des populations myéloïdes de rates de souris porteuses de tumeurs de 6 jours.	36
Figure 11 : Caractérisation des populations myéloïdes de la rate de souris porteuses de tumeurs au jour 21.	38
Figure 12 : Résultat type lors de l'isolation des populations lymphoïdes d'une rate de souris par cytométrie en flux.	39
Figure 13 : Caractérisation des populations lymphoïdes de la rate de souris porteuses de tumeurs et de tumeurs EL4 au jour 6 et 21.	40
Figure 18 : Localisation des cellules myéloïdes (CD11b ⁺) dans la tumeur EL4.	48
Figure 19 : Expression de TGF- β par les cellules CD11b ⁺ de rates et de tumeurs EL4. ..	50
Figure 20 : Expression de VEGF par les cellules CD11b ⁺ de rates et de tumeurs EL4. ..	51
Figure 21 : Expression de MMP9 par les cellules CD11b ⁺ de rates et de tumeurs EL4. ..	52
Figure 22 : Mesure de l'effet anti-prolifératif des cellules CD11b ⁺ sur les lymphocytes T CD4 ⁺	54
Figure 23 : Mesure de l'effet anti-prolifératif des cellules CD11b ⁺ sur les lymphocytes T CD8 ⁺	55
Figure 24 : Évaluation qualitative en microscopie de l'expression de TGF par les cellules CD11b de tumeurs EL4.	57

Figure 25 : Vérification par qPCR et par Western Blot de l'efficacité du «Knockdown» de TGF-β dans les cellules EL4.....	58
Figure 26 : Caractérisation des populations de la tumeur au jour 6 dans le modèle murin B6.SJL.....	60
Figure 27 : Caractérisation des populations de la tumeur EL4 shLuc et EL4 shTGF-β au jour 21 dans le modèle murin B6.SJL.....	61
Figure 28 : Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et shTGF-β au jour 6 dans le modèle murin B6.SJL.	62
Figure 29 : Caractérisation des populations de cellules de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shTGF-β au jour 21 dans le modèle murin B6.SJL.....	63
Figure 30 : Caractérisation des populations de la tumeur EL4 shLuc et EL4 shTGF-β au jour 21 dans le modèle murin RAG.B6.	65
Figure 31 : Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et EL4 shTGF-β au jour 21 dans le modèle murin RAG.B6.	67
Figure 32 : Cinétique de croissance des tumeurs EL4 shLuc et shTGF-β dans les modèles murins B6.SJL et RAG.B6.	69
Figure 33 : Volume final au jour 21 des tumeurs EL4 shLuc et shTGF-β dans les modèles murins B6.SJL et RAG.B6.	70

Liste des abréviations

A

ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
Akt: Protéine kinase B
API6 : Apoptosis inhibitor 6
Arg1: Arginase 1
ARN: Acide ribonucléique
ASXL2: Additional Sex Combs Like 2
ATP: Adénosine-5'-triphosphate

B

Bcl-xl: B-cell lymphoma-extra large
BCR-Abl: Breakpoint cluster region-
Abelson
BMPs: Bone Morphogenetic Proteins

C

CAF: Fibroblaste associé au cancer
CCR7: C chemokine receptor type 7
CD: Cluster of differentiation
CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl
ester
C-myc: Avian myelocytomatosis viral
oncogene homolog
CTL: Cytotoxic T cell
CXCL1: Chemokine ligand 1
CXCR4: Chemokine receptor type 4

D

DAPI: 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DC: Dendritic cell
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's
medium

E

EGF: Epidermal growth factor
eNOS: Endothelial nitric oxide synthase
Erk: Extracellular signal-regulated kinases

F

F4/80: Macrophage associated receptor
FAK: Focal adhesion kinase
FAP: Fibroblast activation protein
FasL: Fas Ligand
FBS: Fetal bovine serum
Fc: Fragment crystallizable region
FITC: Fluorescein isothiocyanate
Foxp3: Forkhead Box P3
FSC: Forward Scatter
Fw: Forward

G

GFP: Green fluorescent protein
Gr-1: GPI-linked myeloid differentiation
marker
GVHD: Graft-versus-host disease
GVL: Graft-versus-leukemia

H

HPRT: Hypoxanthine
phosphoribosyltransférase
HRP: Horseradish peroxidase

I

IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN γ : Interféron gamma
Ig: Immunoglobuline
IL : Interleukine
iNOS: Inducible nitric oxide synthase

J

JAK: Janus kinase

K

KDR: Kinase insert domain receptor
KO: Knockout

L

LAM : Leucémie aiguë myéloblastique
LAP: Latency associated protein
LLA: Leucémie lymphoblastique aiguë
LLC: Leucémie lymphoblastique
chronique
LMC: Leucémie myéloïde chronique
LTBP: Latent TGF-beta binding protein
Ly6c: Lymphocyte antigen 6C
Ly6g: Lymphocyte antigen 6G

M

M1/M2: Phénotype macrophage 1 et 2
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MCP-1: Monocyte Chemoattractant protein
1
MDSC: Myeloid-derived suppressor cells
MMP: Matrix metallopeptidase

N

NK: Natural killer cell
nNOS: Neuronal nitric oxide synthase
NO: Nitric oxide
Nrp1: Neuropiline 1

O

OCT: Optimal cutting
temperature compound

P

P38: Mitogen-activated protein kinase
P53: Tumor Protein P53
Pen: Pénicilline
PI3: Peptidase inhibitor 3
PI3k: Phosphatidylinositol 3-kinase
PKN: Protein kinase N
Ph: Chromosome de philadelphie

Q

qPCR : Quantitative polymerase chain
reaction

R

RAG: Recombination activating gene
RhoA: Ras homolog family member A
Rock: Rho-associated, coiled-coil
containing protein kinase
ROS: Reactive oxygen species
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
medium
RQ: Relative quantification
Rv: Reverse

S

SMAD: Mothers against decapentaplegic
homolog
shRNA: Short hairpin RNA
Src: Proto-oncogene tyrosine-protein
kinase
SSC: Side scatter
STAT: Signal transduction and activator
of transcription

Strep: Streptomycine

T

TBST: Tris-buffered saline and tween
T β R: TGF- β receptor
TCR β : T cell receptor beta
Td: Doubling time
TET2: Methylcytosine Dioxygenase 2
TGF- β : Transforming growth factor beta
Th: Lymphocyte T helper
TKI: Tyrosine-kinase inhibitor
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
Treg: Lymphocyte T régulateur

V

VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGFR: Vascular endothelial growth
factor receptor

*Je dédie cet ouvrage au Dr. Monique Cadrin.
Je te donne de l'ouvrage depuis 27 ans, je ne
vais certainement pas arrêter maintenant!*

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche le Dr. Jean-Sébastien Delisle de m'avoir permis de participer à ses travaux de recherche et d'avoir partagé avec moi sa passion pour la recherche. Je souhaite à tous le monde «un bon boss» comme le Dr. Delisle.

Je souhaite également remercier le Dr. Cédric Carli avec qui j'ai partagé de délicieux moments au laboratoire. Merci Cédric pour ton support dans les moments difficiles de laboratoire et de la vie en générale.

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet. Martine Dupuis, à la cytométrie en flux, pas seulement pour tes «skills» avec la machinerie lourde, mais pour ta bonne humeur et ta gentillesse.

Merci Dr. Stéphanie Thiant pour ton soutien, ton amitié, tes conseils, ta franchise, ton sens de l'humour, ta présence et tes beaux yeux!... les partys, la bière, les barbecues, etc!

Merci à Philippe Laflamme pour les mêmes raisons, sauf les beaux yeux.

Merci à l'Université de Montréal, à la Société leucémie/lymphome du Canada et au Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont pour avoir soutenu financièrement ma recherche.

Un gros merci spécial à ma famille, parce que je vous aime.

Introduction

La leucémie est un cancer qui se développe à partir des cellules souches du sang au niveau de la moelle osseuse. Il existe quatre principaux types de leucémies soit : deux types qui dérivent des cellules souche myéloïdes, la leucémie aiguë myéloblastique (LAM), la leucémie myéloïde chronique (LMC) et deux types qui dérivent des cellules lymphoïdes, la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) (Figure 1). La société canadienne du cancer prévoit que, en 2013 5,800 canadiens recevront un diagnostic de leucémie et 2,600 canadiens mourront de leucémie. Au Canada, 1 homme sur 53 et 1 femme sur 72 développera une leucémie au cours de sa vie.

Comme mentionné plus haut, les leucémies sont des cancers hématologiques qui résultent du dérèglement de la prolifération ou des mécanismes d'apoptose des cellules hématopoïétiques et de leur incapacité à se différencier en cellules matures. Puisque les cellules leucémiques possèdent les marqueurs membranaires des cellules souches normales elles peuvent contourner le système immunitaire et échapper à sa vigilance, car malgré le fait que les cellules leucémiques expriment des antigènes tumoraux, ces antigènes du soi ne semblent pas amener de réponse immunitaire de haute avidité [1]. De plus, les cellules cancéreuses sécrètent des médiateurs (IL-10, TGF- β , IL-1 β , médiateurs induits par les enzymes IDO et iNOS) qui vont contrer la réponse immunitaire anti-cancer. De tous ces facteurs, le «Transforming growth factor-beta» (TGF- β), est une cytokine très importante puisqu'elle est capable de supprimer la croissance cellulaire, dans une grande variété de cancer, et a aussi la capacité d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale [2]. Alors que le TGF- β a été détecté à de fortes concentrations dans plusieurs tumeurs malignes hématopoïétiques, son impact sur la formation d'un microenvironnement leucémique immunosuppresseur n'a jamais été totalement élucidé.

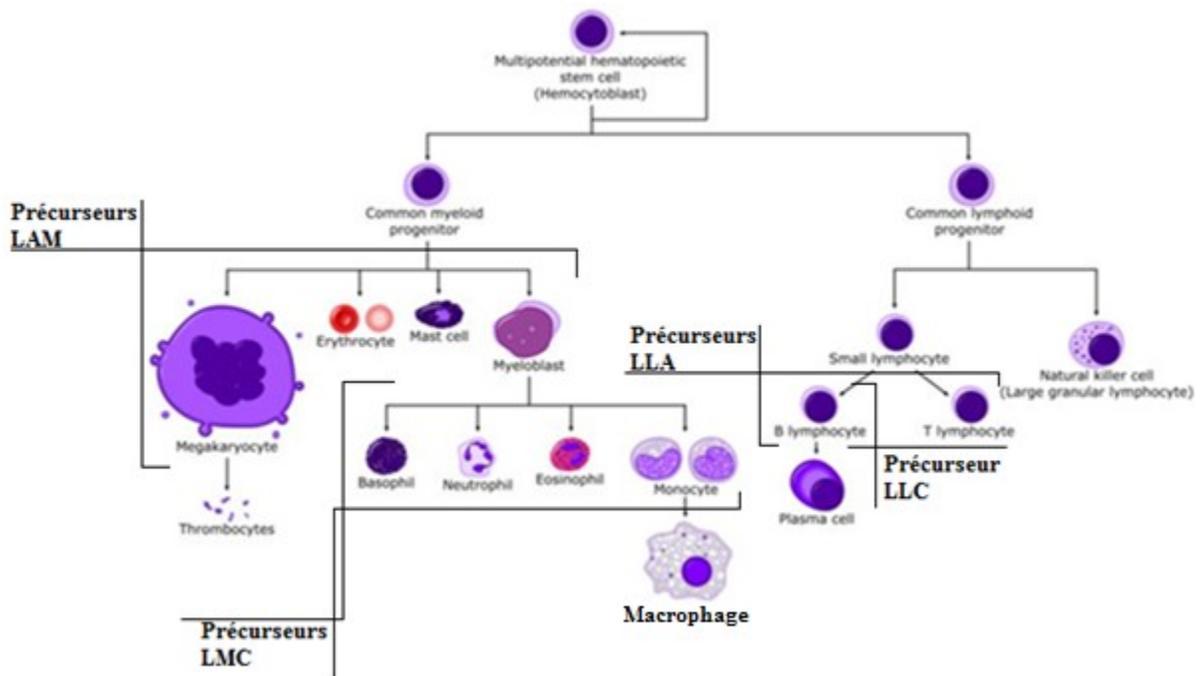


Figure 1 : L'hématopoïèse.

Représentation graphique de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules d'origines myéloïdes et en cellules d'origines lymphoïdes. Adapté de «www.dicts.info».

1. La leucémie

C'est en 1847 que le terme «leucémie» apparaît pour la première fois dans la littérature. Rudolf Virchow, un chercheur allemand, a initialement nommé et caractérisé la maladie. Lors d'une autopsie, Virchow remarque que le sang de la patiente est particulièrement dense. Suite à une analyse par microscopie, il réalise que la densité très élevée du sang est la conséquence d'une prolifération excessive des cellules blanches du sang [3].

Aujourd'hui, nous en savons beaucoup plus sur cette maladie. Les nombreuses études réalisées sur le sujet nous ont amené à décrire la leucémie comme une maladie complexe dépendante de nombreux facteurs extrinsèques comme intrinsèques. Des études menées pour identifier les facteurs de risque liés au développement des leucémies ont montré que des facteurs environnementaux tel que le tabagisme, la prise de certains médicaments chimiothérapeutiques (ex. : cyclophosphamide, melphalan, busuflan, chlorambucil), l'exposition à des produits chimiques (ex. : benzène, fumée secondaire, pesticides) et l'exposition aux radiations sont associés à un risque accru de développer une leucémie [4] [5] [6]. Certaines prédispositions génétiques peuvent également augmenter les risques de développer ce type de cancer (ex. : mutation des gènes TP53, TET2, ASXL2) [7] [8].

On reconnaît aujourd'hui quatre grands types de leucémies. La leucémie myéloïde aiguë (LMA) affecte les personnes de tous âges mais surtout les personnes âgées de 60 ans et plus. À l'origine, la maladie est causée par le dysfonctionnement de cellules souches hématopoïétiques caractérisé par une inhibition de leur différenciation, une accumulation de cellules à différents stades de maturation et une diminution de la production de cellules hématopoïétiques saines [9]. Il existe différents sous-types de leucémies myéloïdes aiguës, leur classification est faite en fonction de la morphologie des cellules, de leur immunophénotype, et des altérations moléculaires et génétiques. L'analyse de ces facteurs permet d'identifier le type d'LMA, d'établir un pronostic et d'appliquer la thérapie la mieux adaptée pour chaque patient. [10]

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie myéloproliférative qui affecte les personnes de tous âges, mais principalement les individus âgés de 55 ans et plus. Elle est caractérisée par une surproduction de cellules à tous les stades de différenciation, mais particulièrement de granulocytes. La LMC se caractérise par une augmentation du nombre de cellules myéloïdes matures et immatures, et une diminution de la différenciation des cellules hématopoïétiques. En 1960, Nowell et Hungerford ont découvert ce qu'ils ont nommé le «chromosome de Philadelphie» (Ph) qui est le résultat d'une translocation chromosomique entre les chromosomes 9 et 22, et ont associé la présence de ce chromosome avec le développement de la LMC [11]. La protéine hybride formée, *BCR-Abl*, a entre autre une activité tyrosine kinase et peut activer plusieurs protéines qui jouent un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Cette aberration chromosomique n'est pas spécifique à la LMC, mais est présente dans plus de 90% des cas de LMC. Cette découverte représente la première démonstration du lien entre un cancer particulier et un réarrangement chromosomique [10, 12].

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est le type de cancer le plus commun chez les enfants. Il existe différents sous-types d'LLA, dont l'LLA d'origine T (T-LLA) et l'LLA d'origine B (B-LLA). La T-LLA apparaît suite à une transformation maligne de cellules progénitrices hématopoïétiques de lymphocytes T. Ce type d'LLA représente de 10% à 15% des cas d'LLA pédiatriques et 25% des cas d'LLA chez l'adulte. La maladie est caractérisée par une forte infiltration de cellules T immatures dans la moelle osseuse, un taux élevé de cellules blanches dans le sang, la présence de masses médiastinales (souvent d'origine thymique) avec épanchements pleuraux et, dans plusieurs cas, une infiltration du système nerveux central [13, 14]. La B-LLA est le résultat d'une transformation maligne de cellules progénitrices hématopoïétiques de lymphocytes B. Environ 75% des patients atteints de B-LLA sont âgés de moins de 6 ans. Approximativement 75% des cas de B-LLA vont présenter une altération chromosomique sous forme d'aneuploïdie. L'hyperdiploïdie avec un gain d'au moins 5 chromosomes est la forme d'aneuploïdie la plus fréquente [15, 16].

La leucémie lymphoblastique chronique (LLC) est la leucémie la plus commune dans la population adulte. La LLC est causée par la transformation de progéniteurs de lymphocytes B immatures et incompétents en cellules malignes. La maladie est caractérisée par une

augmentation de cellules blanches dans le sang où 95% sont de petits lymphocytes d'apparence mature exprimant les protéines CD19, CD5 et CD23 et dont l'expression d'IgM, d'IgD et de CD79b est réduite. Les ganglions semblent atteints (lymphomes lymphocytiques) et la moelle osseuse est infiltrée par les cellules tumorales. Les translocations chromosomiques impliquant des oncogènes comme P53 sont souvent la cause de LLC [17, 18].

1.1 Les traitements

Il n'existe pas de traitement unique pour contrer la leucémie. Ceci s'explique par la grande variété de sous-types de leucémies. Une analyse de la morphologie des cellules, de la présentation au niveau de la membrane de certaines molécules (ex. : CD19, CD5, CD23) et une analyse génétique sont nécessaires pour déterminer le type de leucémie qui affecte le patient. Les traitements prodigués aux patients sont déterminées en fonction des différents diagnostics.

Le traitement principal de la leucémie myéloïde aiguë (LMA) est l'administration rapide de fortes doses d'agents chimiothérapeutiques. L'administration de ce traitement chez les patients âgés est souvent impossible en raison du danger des effets secondaires. Le traitement conventionnel se fait en deux phases, une phase d'induction et une phase de consolidation qui peut inclure la transplantation de cellules souches allogéniques. La phase d'induction consiste en l'administration d'une combinaison de daunorubicin et de la cytarabine deux agents qui affectent la réplication de l'ADN et qui par conséquent bloquent la mitose. Le traitement a pour but de détruire les cellules leucémiques et mener à la rémission complète. L'objectif de la phase de consolidation est l'élimination des cellules leucémiques résiduelles en administrant des doses moyennes ou fortes de cytarabine [9]. La dernière intervention est la transplantation de cellules souches allogéniques. Certaines cellules immunitaires du donneur s'attaquent aux cellules leucémiques produisant l'effet GVL (graft versus leukemia) à la suite de la reconnaissance d'alloantigènes. L'effet GVL est inégal d'un patient à l'autre à cause de facteurs encore mal définis. Aussi dans certains cas, les cellules immunitaires du donneur s'attaquent aux cellules saines du receveur, c'est l'effet GVHD (graft versus host disease). Les effets GVL et GVHD sont épidémiologiquement associés, un

patient peut bénéficier de l'effet GVL et être affligé par l'effet GVHD, mais il demeure possible d'observer un phénomène sans l'autre [19].

Comme mentionné plus haut, la leucémie myéloïde chronique est caractérisée par la translocation d'un chromosome qui entraîne l'expression d'une protéine hybride à propriété tyrosine-kinase la BCR-ABL. Présentement, il existe sur le marché trois inhibiteurs de tyrosine-kinase (TKI) pour le traitement de ce type de leucémie. L'imatinib agit sur le site de liaison de l'ATP de la protéine BCR-ABL ce qui bloque la phosphorylation des protéines impliquées dans la transduction du signal de division et la mort par apoptose de la cellule. Le dasatinib est un TKI de 2^{ème} génération 350 fois plus puissant que l'imatinib. Comme l'imatinib, il interagit avec la protéine tyrosine-kinase et inhibe son activité de phosphorylation. La troisième molécule, le nilotinib possède une structure semblable à celle de l'imatinib, mais son affinité pour le site de liaison de l'ATP sur la protéine BCR-ABL est environ 50 fois supérieure. Comme dans le cas des deux autres inhibiteurs, il bloque la phosphorylation des protéines impliquées dans la cascade qui mène à la division cellulaire et induit l'apoptose de la cellule. Le dasatinib et le nilotinib ont montré une capacité à induire une réponse hématologique et cytogénétique chez des patients qui ne répondaient pas à l'imatinib, l'inhibiteur tyrosine kinase le plus utilisé. [20]. La greffe allogénique demeure une alternative chez les patients éligibles qui échouent un traitement par TKI.

Les traitements disponibles pour les patients atteints de leucémie lymphoïde aiguë (LLA) sont des traitements de combinaisons entre chimiothérapie, TKIs, radiothérapie, greffe de cellules souches hématopoïétiques et administration d'anticorps monoclonaux. Le traitement de base dépend du type d'LLA diagnostiquée, Ph⁺ ou Ph⁻ (chromosome de Philadelphie), et de l'âge du patient. Pour les patients atteints d'une LLA Ph⁺, la greffe de cellules souches hématopoïétiques est privilégiée [21]. Une phase de préparation est nécessaire avant que la greffe puisse être effectuée et plusieurs protocoles sont à l'étude pour évaluer la méthode la plus efficace et la moins dangereuse pour le patient. Les méthodes les plus utilisées pour la préparation des patients consistent en : la chimiothérapie seule à forte dose [22, 23] ou encore la chimiothérapie combinée à l'irradiation totale [24, 25].

Le traitement classique de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une combinaison de fludarabine, de cyclophosphamide et de rituximab [26]. Dans certains cas,

lorsqu'une délétion de 17p ou une mutation de TP53 est détectée, le traitement sera remplacé par l'alemtuzumab combiné avec la méthylprednisolone et préférablement accompagnée d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. [27] L'alemtuzumab est un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine CD52. CD52 est exprimé dans 36% à 66% des cas de leucémie [28]. La fixation de l'anticorps à l'antigène guide, vers les cellules tumorales, les cellules du système immunitaire qui possèdent un récepteur au fragment Fc de l'anticorps (cellules NK et/ou macrophages) [29]. Suite à cela, ces cellules de l'immunité innée vont induire la mort des cellules cibles par le système du complément ou par induction d'un signal intracellulaire (ex. : Fas/FasL) [29]. La méthylprednisolone induit l'apoptose des cellules leucémiques en interférant avec la voie de signalisation JAK/STAT [30].

À l'heure actuelle, plusieurs traitements disponibles sollicitent l'aide du système immunitaire (greffe de moelle osseuse et anticorps monoclonaux) pour combattre les cellules néoplasiques. Malheureusement, ces traitements ne sont pas toujours efficaces et c'est pour cette raison que nous cherchons des moyens pouvant améliorer l'efficacité des traitements.

2. TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

C'est au début des années 80 que le TGF- β a été isolée et nommée pour la première fois. À cette même époque les chercheurs ont montré l'existence de la signalisation paracrine et autocrine et donc l'importance de l'environnement cellulaire dans le contrôle de l'activité cellulaire. Isolée à partir de cellules de sarcomes murins, le TGF- β a été directement associé au cancer [31]. Peu de temps après sa découverte dans les tissus cancéreux, soit en 1983, le TGF- β est aussi isolé à partir de tissus sains. Rapidement, la même équipe de chercheurs montre que le TGF- β est sécrété dans de nombreux tissus non néoplasiques comme le placenta, le rein et les plaquettes sanguines [32]. Rapidement l'importance du TGF- β a été reconnue et de nombreuses études ont été réalisées sur son rôle au cours du développement embryonnaire, dans l'organisme sain, et dans un contexte néoplasique [33].

Les effets du TGF- β sur les cellules et les tissus sont complexes. Par exemple Le TGF- β peut jouer des rôles opposés soit l'inhibition de la croissance cellulaire, soit la prolifération cellulaire ou encore augmenter la pluripotence de cellules souches versus favoriser la différenciation. Ces évènements contradictoires ne peuvent se produire que dans un contexte

ou l'action de TGF- β se produit dans un environnement qui implique plusieurs autres systèmes de signalisation interconnectés. Cette interrelation entre différentes voies de signalisation fait l'objet de nombreuses études et demeure encore mal comprise.

La signalisation par le TGF- β a été observée comme suppresseur de tumeur et comme un promoteur de tumeur. Le but de la présente étude était de déterminer le rôle du TGF- β dans la modulation du microenvironnement tumoral leucémique immunosuppresseur qui n'est pas encore bien compris.

2.1 La voie de signalisation du TGF- β

La famille du TGF- β est constituée d'environ 30 protéines parmi lesquelles on retrouve les trois formes TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, les Activines et les BMPs (Bone morphogenesis protein). Le TGF- β 1 est la forme la plus exprimée par les cellules tumorales. Comme les autres membres de la famille des TGF, le TGF- β 1 est synthétisé sous la forme d'un long précurseur constitué d'une portion N-terminale contenant une séquence signal de sécrétion, et un prodomaine appelé «latency-associated peptide» appelé (LAP). La portion C terminale de la protéine contient la portion d'acides aminés qui formera le TGF mature (Figure 2).

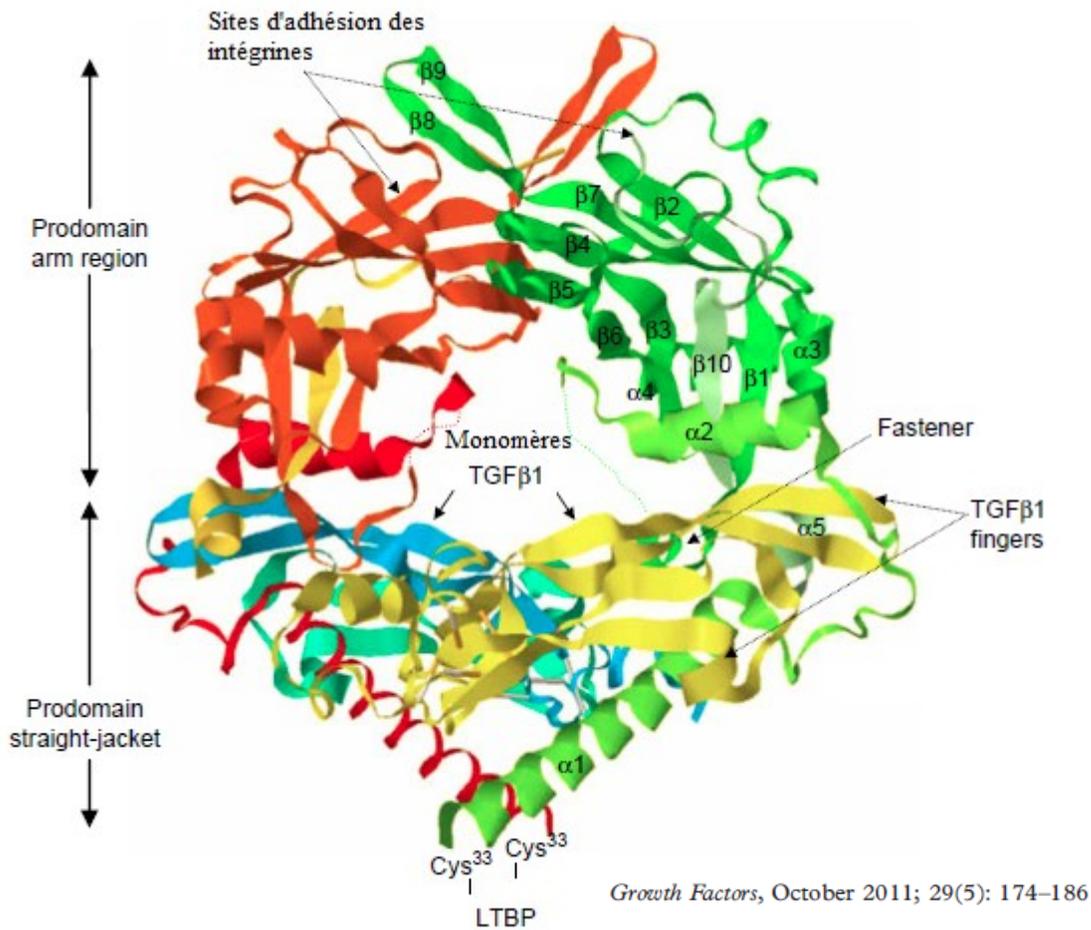
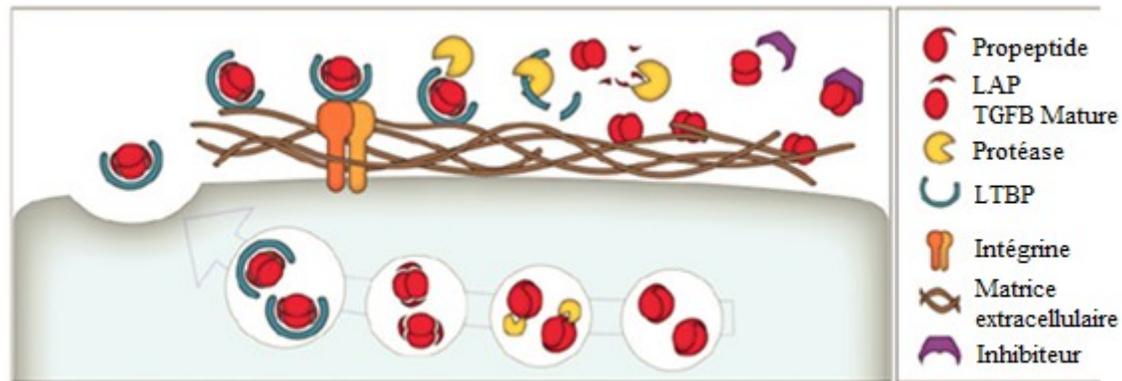


Figure 2 : Structure du pro-TGF-β.

Dans cette structure, les deux monomères matures de TGF-β1 sont représentés en bleu et en jaune alors que les pro-domaines (LAP) sont représentés en vert et en orange. Adapté de «Growth Factors, October 2011; 29(5) : 174-186».

Les séquences d'aa du LAP permettent au TGF-β de former une structure secondaire et tertiaire où deux monomères TGF-β sont reliés dans leur structure fonctionnelle. Au niveau du cytoplasme, le pro TGF-β1 est clivé par une protéase qui libère le TGF-β1 de LAP. Le LAP demeure attaché au TGF-β1 mature (structure en papillon) et le maintient sous une forme inactive. Des mutations au niveau de LAP peuvent entraîner des modifications jusqu'à la suppression de l'activation de TGF-β1. Le complexe TGF-β1-LAP se lie au LTBP dans les exosomes de la cellule pour être sécrété dans l'exoplasme (Figure 3). Sous cette forme le TGF-β1 est inactif et demeure lié à des protéines de la matrice extracellulaire. L'activation

du TGF- β 1 dans l'exoplasme nécessite l'action d'une protéase qui scinde le LTBP ce qui libère le TGF- β 1 qui peut alors se lier à ses récepteurs (Figure 3). Dans certaines situations, le TGF- β 1 peut demeurer une protéine associée à la membrane qui sera capable de déclencher une signalisation dans une cellule voisine par le biais du récepteur exprimé par cette dernière [34].



Modifié de Weiss et Attisano 2013 review

Figure 3 : Processus de production, de sécrétion et d'activation du TGF- β .

Le complexe TGF- β 1-LAP se lie au LTBP dans les exosomes de la cellule pour être sécrété dans l'exoplasme. L'activation du TGF- β 1 dans l'exoplasme nécessite l'action d'une protéase (plasmine ou MMP-2) qui scinde le LTBP ce qui libère le TGF- β 1 qui peut alors se lier à ses récepteurs [34, 35].

La cascade de signalisation par le TGF- β suit une voie assez simple. Dans une première étape, l'homodimère TGF- β se lie à un dimère de T β RII. Cette liaison induit le recrutement d'un dimère de T β RI et il y a formation d'un hétéro-tétramère T β RI - T β RII. Suite à la formation de l'hétéro-tétramère, la portion cytoplasmique du T β RII qui a une activité serine/thréonine kinase intrinsèque phosphoryle le domaine cytoplasmique de T β RI, ce qui active la cascade de signalisation cytoplasmique vers le noyau [36].

Le transport du message de signalisation du cytoplasme vers le noyau est assuré par une famille de protéines les Smads. Lorsque activé T β RI phosphoryle SMAD2 et SMAD3. Les protéines SMAD2 et SMAD3 phosphorylées se lient à SMAD4 (co-Smad) dans le cytoplasme pour ensuite former un complexe qui migre dans le noyau et devient un facteur de transcription en se liant directement à l'ADN pour moduler la transcription de gènes [37]. Plus

de 300 gènes peuvent être régulés par l'activation des cellules par le TGF- β dépendamment du type cellulaire. L'activation de l'expression est spécifique aux différents types cellulaires et dépend de différents cofacteurs (co-activateurs ou co-répresseurs) qui se lient à l'ADN et l'épigénétique des différents types cellulaires. Des nombreux gènes régulés par TGF- β , les 2/3 de ces gènes sont activés par le signal, alors que les autres sont réprimés. La fin de la réaction se produit par la déphosphorylation des SMAD [38] [39] [40]. Cette voie de signalisation du TGF- β peut être bloquée par SMAD7 et la MAP kinase Erk. SMAD7 se lie au récepteur du TGF- β mais ne peut pas être phosphorylé lorsque le TGF- β se lie à son récepteur [41]. Erk phosphoryle SMAD2 et SMAD3 (R-SMAD) qui forment un complexe avec SMAD4, mais empêche la migration du complexe dans le noyau [42]. Indépendamment de la signalisation SMAD, TGF- β peut également activer d'autres voies de signalisation tel que la voie PI3-Kinase, p38 kinase, RhoA, PKN et RhoA [2] (Figure 4).

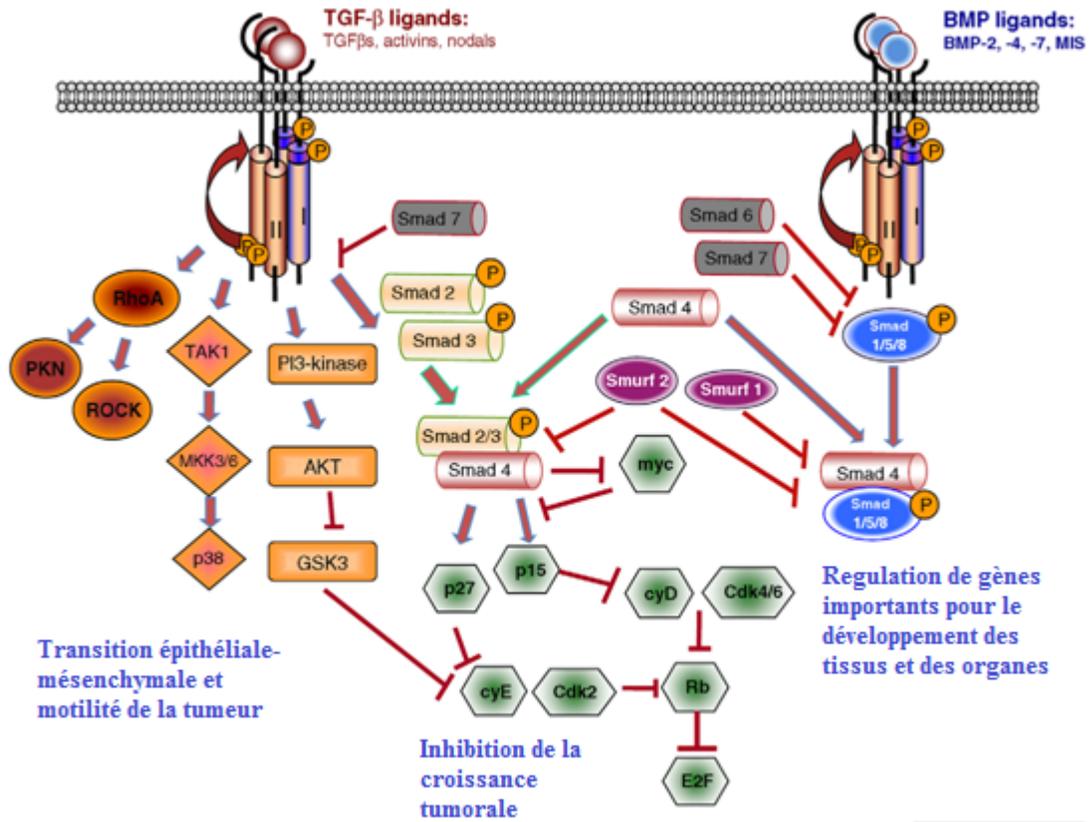


Figure 4 : Le TGF- β se lie au TGF- β R (Récepteur) de type I et de type II.

La cascade de signalisation commence par la phosphorylation de SMAD2 et SMAD3 qui vont ensuite se combiner à SMAD4 pour entrer dans le noyau et exercer leur effet inhibiteur de la croissance. TGF- β va également activer d'autres voies de signalisation tel que la voie PI3-Kinase, p38 kinase, RhoA, PKN et RhoA [2].

2.2 Rôle du TGF- β

Le TGF- β fait partie d'une grande famille de protéine de structure similaire qui, en se liant à ses récepteurs membranaires, contrôle une pléthore de réponse cellulaire comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'adhésion et la formation de la matrice extracellulaire.

Les membres de cette famille de protéine TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 jouent un rôle important dans la régulation des cellules du système immunitaire. La forme la plus abondante est TGF- β 1 et c'est de cette forme dont nous discuterons dans la suite de ce document. Malgré notre connaissance de la voie de signalisation impliquant les SMAD, beaucoup de questions demeurent toujours quant aux molécules impliquées dans la régulation de la fonction du TGF- β . Par exemple, le double rôle de promoteur et de suppresseur de tumeurs du TGF- β est encore bien mal compris. Les cellules tumorales doivent pourvoir contrer l'effet suppresseur de croissance qu'exerce le TGF- β , ce qui a pour conséquence de diminuer la réponse aux signaux du TGF- β au cours de la progression tumorale et souvent une augmentation de l'expression de TGF- β par les cellules tumorales [2].

2.1.1 Rôle du TGF- β dans l'organisme

Le TGF- β est d'une importance capitale pour l'organisme en raison de sa nature hautement pléiotropique. En effet, il joue un rôle majeur dans le développement des tissus, dans la réparation des tissus endommagés, la maintenance de la pluripotence des cellules souches, l'angiogénèse, l'hématopoïèse, le contrôle de la différenciation cellulaire. Il a aussi un rôle de suppresseur de tumeurs [43-45].

L'importance du TGF- β dans le développement embryonnaire a fait l'objet de plusieurs études. Par exemple, au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés au rôle du TGF- β dans la physiologie du système nerveux. Ces recherches montrent que la présence du TGF- β et de son récepteur dans le système nerveux en développement est nécessaire au bon développement du cerveau. Cette interprétation a été confirmée par une étude qui a montré qu'un «knockout» de TGF- β dans un modèle murin engendre de sévères défauts dans le développement du cerveau [46]. Dans le système nerveux

central, les trois isoformes de TGF- β sont produits par les cellules gliales et neuronales. TGF- β serait alors impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires et tissulaires essentielles comme le contrôle du cycle cellulaire, la régulation du développement et de la différenciation, et de la survie des cellules neuronales [47].

Dans l'hématopoïèse, le rôle de TGF- β varie en fonction du stade de différenciation et du contexte environnemental des cellules cibles. Il a un effet positif ou négatif sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Par exemple, la prolifération des cellules souches hématopoïétiques myéloïdes est augmentée par le TGF- β , alors que le TGF- β ralentit la prolifération des cellules souches hématopoïétique lymphoïdes [48] [49].

Les organes immuno-privilegiés, tel que les yeux, le cerveau et les gonades, sont des organes où les fonctions immunitaires sont restreintes. Cette tolérance du système immunitaire n'est pas fortuite et sert à protéger ces organes du système immunitaire. La production de TGF- β par les lymphocytes T régulateurs serait responsable de cette tolérance immunitaire. Bien que de nombreuses structures cellulaires (barrières sang-organes) et mécanismes moléculaires (MCP-1, testostérone, IL-6) puissent restreindre la surveillance du système immunitaire, le TGF- β représente un élément clé dans la régulation du système immunitaire dans ces organes [50] [51] [52].

Les fréquentes anomalies des récepteurs au TGF et de la protéine SMAD4 dans les cancers sont révélatrices de l'importance de l'effet suppresseur de tumeur du TGF- β . Malgré ce fait, l'inactivation seule du T β RII conduit rarement à la formation d'un cancer [53]. Par contre, les souris TGF- β 1 KO ou TGF- β RII KO meurent environ à trois semaines de vie de maladies auto-immunes fulminantes [54] [55].

2.1.2 Rôle du TGF- β dans la leucémie

Les mutations qui inactivent la voie de signalisation du TGF- β sont un peu plus rares dans la leucémie que dans les autres types de cancers comme le cancer de la peau, du pancréas et du colon [56]. Cependant, plusieurs cas de perte de réponse au TGF- β ont été rapportés. En effet, dans certains cas de leucémie myéloïde aiguë, une mutation de la protéine SMAD4 inhibe la voie de signalisation du TGF- β [57]. Des cas de leucémies lymphoïdes où une

mutation des récepteurs du TGF- β (T β RI et T β RII) inhibe la réponse au TGF- β ont aussi été rapportés [56].

La perte de réponse aux signaux du TGF- β est indirectement liée au rôle du TGF- β dans un contexte de leucémie. Bien que le TGF- β ait une fonction majeure de suppression tumorale, sa présence dans une situation où la voie de signalisation est bloquée va paradoxalement aider la croissance de la tumeur et ce particulièrement dans les phases avancées de la maladie. Ce phénomène est attribué en grande partie à la fonction immunosuppressive du TGF- β [49].

3. Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est primordial pour le développement et la survie des cellules cancéreuses. La tumeur est une masse complexe qui contient en majeure partie des cellules néoplasiques, mais aussi une grande variété de cellules saines telles que des cellules endothéliales, des péricytes, des fibroblastes et des cellules immunitaires (Figure 5). La capacité des cellules néoplasiques à détourner et à transformer un grand éventail de cellules saines est essentielle à la prolifération, à l'angiogénèse et à l'invasion. La sécrétion de facteurs de croissance, de molécules pro-angiogéniques et autres signaux moléculaires par le microenvironnement tumoral procure aux cellules tumorales un environnement idéal pour leur croissance [58] [59].

Le microenvironnement tumoral n'est pas un concept réservé aux tumeurs «solides». Les cellules leucémiques bénéficient aussi de l'aide de cellules saines qu'elles ont su asservir. C'est dans la moelle osseuse que les cellules leucémiques élaborent leur microenvironnement et c'est souvent dans ces niches que vont survivre les cellules leucémiques suite aux différentes thérapies. [58] Une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent la formation du microenvironnement tumoral et des interactions entre les cellules qui composent la tumeur permettra d'élaborer de meilleures stratégies thérapeutiques.

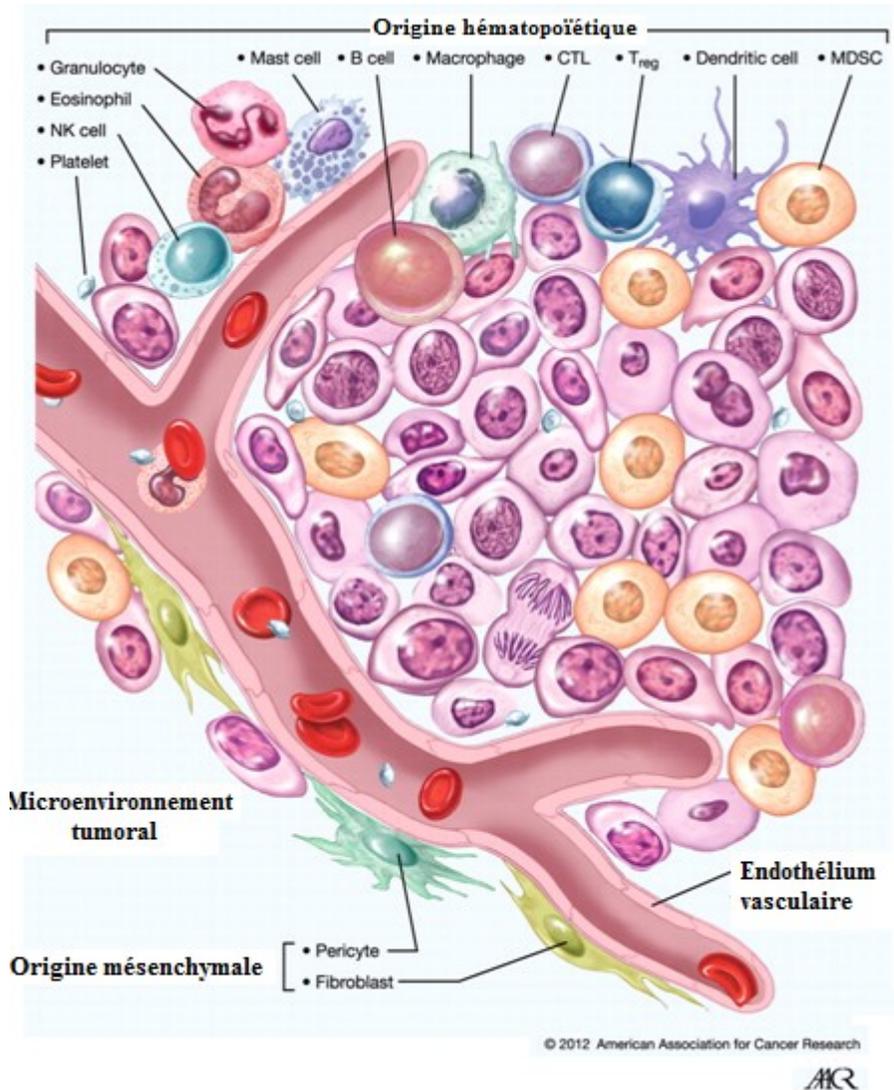


Figure 5 : Infiltration cellulaire du microenvironnement tumoral.

La tumeur se compose de cellules tumorales et d'autres cellules non néoplasiques recrutées par les cellules tumorales. Les cellules immunitaires infiltrantes sont des cellules du système immunitaire inné et acquis (MDSC, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, éosinophiles, neutrophiles, NK et lymphocytes). Ces cellules vont contribuer à former un milieu favorable à la croissance des cellules tumorales ainsi qu'à contrer la vigilance du système immunitaire par la production de cytokines, de chimiokines et par contact direct cellule-cellule. D'autres types cellulaires non issus du système immunitaire infiltrent la tumeur et contribuent à la croissance de la tumeur (cellules endothéliales, péricytes et fibroblastes). (Adapté de American Association for Cancer Research, 2012).

3.1 Les populations cellulaires infiltrantes

Les cellules non issues du système immunitaires sont une composante importante du microenvironnement tumoral. La sécrétion de différents facteurs par ces cellules procure aux cellules tumorales un environnement à l'abri du système immunitaire et ces facteurs fournissent les signaux nécessaires à leur survie et à leur prolifération.

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) sont les cellules les plus abondantes du microenvironnement tumoral [60]. Elles ont de multiples fonctions au sein de la tumeur tel que le remodelage de la matrice extracellulaire, la suppression de la réponse immune, la sécrétion de facteurs de croissances et la sécrétion de cytokines qui module la croissance tumorale, l'invasion, la différenciation, l'angiogénèse et l'inflammation dans le microenvironnement [61].

En temps normal, les fibroblastes sont dans un état de quiescence et baignent dans la matrice extracellulaire composée de collagène de type I, de laminine, de fibronectine et de protéoglycans, et jouent un rôle de suppression de la prolifération des cellules épithéliales qui ne prolifèrent pas normalement [62]. Une fois recrutés par les cellules tumorales, les fibroblastes activés produisent plusieurs composantes de la matrice extracellulaire tel que le collagène (types I, II et III), des intégrines, de la fibronectine, de la ténascine-C, de la laminine et de la thrombospondine [63]. Les fibroblastes activés vont également produire différentes protéases tel que les MMP (Métalloprotéinases matricielles), l'activateur du plasminogène de type urokinase, la FAP (protéine d'activation des fibroblastes). Ces protéines, surtout les MMP, vont influencer la progression des cellules néoplasiques en dégradant et remodelant la matrice extracellulaire de la tumeur [64] [61].

La vascularisation de la tumeur est un facteur important pour les cellules tumorales. Elle fournit les nutriments et l'oxygène nécessaire pour la survie des cellules. Les vaisseaux sanguins qui parcourent la tumeur sont composés de deux types de cellules, les cellules endothéliales et les péricytes. Alors que les cellules endothéliales forment les vaisseaux, les péricytes entourent les cellules endothéliales. Ils sont nécessaires à la survie des cellules endothéliales et par conséquent au maintien de la vascularisation de la tumeur [65].

3.2 Les populations infiltrantes issues du système immunitaire

Pour faire ombrage à l'efficacité du système immunitaire contre les pathogènes, les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral sont dérégées et mises en quelque sorte à la disposition des cellules tumorales. Les cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur sont des lymphocytes, des cellules NK, des macrophages, des cellules dendritiques (DC), des éosinophiles, des mastocytes et des MDSC (myeloid-derived suppressor cells). Leur sécrétion de cytokines, de chimiokines et d'autres molécules contribue à la progression de la tumeur et à la création d'un microenvironnement immunosuppresseur [59].

3.2.1 Les lymphocytes T régulateurs

La première observation d'une population de cellules T capables d'inhiber la réponse immunitaire a été réalisée il y a déjà plus de 30 ans. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont identifiables par leur expression des marqueurs membranaires CD4, CD25 et du facteur de transcription Foxp3 [59]. La majorité des cellules Treg sont produites dans le thymus et leur fonction dans l'organisme est l'immunorégulation. Les cellules Treg normales migrent vers les sites d'inflammation où elles maintiennent une certaine stabilité dans la réponse immune en inhibant les fonctions effectrices de certaines cellules, particulièrement les lymphocytes T helper (Th), mais aussi sur les autres populations cellulaires de l'immunité (CTL, cellules B, DC, macrophages et cellules NK) [66]. Le facteur de transcription Foxp3 est une protéine importante dans la génération et le maintien des Treg. Il a été démontré qu'une diminution ou une perte de la production de Foxp3 peut conduire à des maladies autoimmunes sévères, des maladies inflammatoires de l'intestin et à des allergies [67] [68].

Dans un contexte tumoral, les Treg contribuent au maintien d'un microenvironnement immunosuppresseur. La sécrétion de TGF- β et d'IL-10 (interleukine-10) fait partie des mécanismes qui servent à freiner les attaques du système immunitaire contre la tumeur [69]. Les Treg vont également exprimer à leur surface un récepteur de forte affinité pour l'IL-2 (interleukine-2) (IL-2R β ; CD25), entrant en compétition avec les autres cellules T pour l'IL-2. L'IL-2 est une cytokine très importante pour la survie, le développement et la fonction immunorégulatrice des Treg. Les Treg vont également exprimer de la thrombospondin, cette

protéine est capable de transformer le TGF- β latent en TGF- β actif et ainsi entraîner le déclenchement de la voie de signalisation impliquant les SMADs [70] [59].

3.2.2 Les MDSC: Myeloid-derived Suppressor Cells

Les MDSC sont reconnues par leur expression des marqueurs membranaires CD11b et Gr-1 (Ly6c/Ly6g). Cette population de cellules myéloïdes hétérogènes est arrêtée à un stade précoce de maturation et est connue pour ses fonctions immunosuppressives. Les deux sous-types majeurs de MDSC sont les MDSC granulocytiques caractérisées par le profil d'expression CD11b⁺Ly6c^{Med}Ly6g⁺, et les MDSC monocytiques caractérisées par le profil d'expression CD11b⁺Ly6g⁻Ly6c^{High} [71]. Un aspect important dans la fonction des MDSC est leur capacité à inhiber la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. Les mécanismes immunosuppresseurs connus utilisés par les MDSC sont multiples et consistent entre autre en: la production de NO, de peroxy-nitrites et de ROS [72, 73]. La production de haut niveau de MMP-9 fait également partie de l'arsenal des MDSC. Le rôle de ces différentes molécules sera discuté dans le prochain chapitre.

La protéine STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) occupe une place très importante dans plusieurs événements qui régulent la prolifération, la survie et l'invasion des cellules tumorales. L'activation de STAT3 dans les MDSC est particulièrement importante dans le processus d'immunosuppression qu'exercent les MDSC. L'inhibition de STAT3 dans les MDSC supprime leur action immunosuppressive. Les signaux de STAT3 conduisent à l'expression de Bcl-xL, de c-myc, de cycline D1 et de survivine, soit des facteurs anti-apoptotiques, qui augmentent la prolifération des MDSC et préviennent leur maturation. Plusieurs protéines peuvent activer STAT3, par exemple la surexpression de l'API6 (apoptosis inhibitor 6) cause l'activation de STAT3 dans les cellules myéloïdes et cause une prolifération systémique de MDSC. La production de ROS et de CXCL1 par les MDSC est directement dépendante de l'activation de STAT3.

La protéine STAT1 est activée par les signaux de l'IFN γ ou l'IL-1 β et est impliquée dans la régulation de l'iNOS (inducible nitric oxide synthase) et de l'arginase par les MDSC. L'inhibition de STAT1 dans les MDSC ou l'inhibition de la production d'IFN γ par les cellules T, bloque l'effet suppresseur des MDSC sur les cellules T.

3.2.3 Les macrophages

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée qui sont à la fois présentes au commencement de la réponse immunitaire et pendant la préparation de la réponse immunitaire adaptative. Lors de dommages tissulaires ou d'infections, les macrophages s'activent et augmentent leur production de cytokines, de chimiokines et d'autres médiateurs de l'inflammation. Ils jouent également un rôle important dans la réparation des tissus endommagés [74].

L'activation du macrophage par l'IFN- γ conduit à sa polarisation en macrophage 1 (M1) et à une réponse pro-inflammatoire. La production de ROS, de NO et de cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF, IL-6) des M1 est responsable de l'inhibition de la prolifération cellulaire et causes des dommages tissulaires [75] [74].

L'activation du macrophage par l'IL-4 ou l'IL-13 conduit à sa polarisation en macrophage 2 (M2). À l'opposé des M1, les M2 sont responsables de la réparation des tissus. Le TGF- β qu'ils produisent joue un rôle important dans le maintien des M2. Les M2 vont également activer les Th2, alors que les M1 vont activer les Th1 [75].

Dans un contexte tumoral, ce sont les M2 qui sont les macrophages les plus présents dans le microenvironnement. Ces M2 présents dans la tumeur vont produire de l'ornithine, de l'EGF, du VEGF et d'autres facteurs de croissances qui vont contribuer à la prolifération et à la survie des cellules tumorales. Le TGF- β produit par les cellules tumorales est en partie responsable du maintien des M2 et de l'inhibition des M1 [76].

4. Les médiateurs et protéines d'intérêts

Le TGF- β est un médiateur très important dans le processus d'immunotolérance de la tumeur. Par contre, ce n'est pas le seul médiateur, et c'est la synergie entre le TGF- β et les autres médiateurs qui, ultimement, conduira à un microenvironnement tumoral favorable au développement de la tumeur et complètement à l'abri du système immunitaire. Dans notre étude, nous n'avons pas couvert l'ensemble des médiateurs immunosuppresseurs et autres médiateurs associées au microenvironnement tumoral. Les médiateurs et protéines sur lesquelles nous avons dirigé notre attention sont iNOS, Arg1, Nrp1, CXCR4, IL-6, VEGF,

MMP9 et TGF- β . Notre choix à été fait en fonction de l'importance de ces molécules dans la littérature.

L'iNOS (inducible nitric oxide synthase) est responsable de la synthèse de NO (nitric oxide). Il existe trois isoformes de NOS (eNOS, nNOS et iNOS), l'eNOS et l'nNOS sont activées par le calcium et produisent de faibles quantités d'oxyde nitrique sur une courte période de temps [77]. L'isoforme iNOS est induit par des cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-1) et son activation n'est pas dépendante du calcium. L'iNOS est exprimé dans presque tous les types cellulaires et peut produire de grandes quantités de NO sur une longue période de temps [77] [78]. L'oxyde nitrique produit par iNOS joue plusieurs rôles dans le microenvironnement tumoral, pro- et anti-tumoral. Il a été montré que l'inhibition de NOS réduit la vascularisation de la tumeur sans affecter les tissus normaux [79]. Il a également été montré que la production de NO augmente la production de MMPs et de VEGF [80] [77] [81].

L'Arg1 (arginase-1) est responsable de la conversion de L-Arg (L-arginine) en urée et en L-ornithine [82]. L'Arg1 est induite par différentes cytokines (IL-4, IL-13, TGF- β , IL-10) et se retrouve surtout dans le cytosol des macrophages [83]. Son rôle est de limiter l'accès de l'L-Arg aux autres cellules, l'L-Arg est transporté dans la cellule pour être dégradée. L'L-Arg est nécessaire à l'expression de CD3 et de CD8 des lymphocytes T CD8⁺, sa déplétion par l'Arg1 inhibe la prolifération des cellules T, et plus particulièrement la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ [83, 84].

La Nrp1 (Neuropilin 1) est une protéine transmembranaire de haute affinité pour le VEGF-A. C'est un récepteur exprimé par les cellules endothéliales et certaines cellules tumorales, qui agit de concert avec le récepteur tyrosine kinase au VEGF (VEGFR2/KDR) [85]. C'est une protéine qui joue un rôle important dans le développement neuronal et cardiovasculaire [86]. Dans un contexte tumoral, son activation module la prolifération, la survie et la migration des cellules néoplasiques [86]. À la surface des cellules tumorales, Nrp1 agit comme co-récepteur du TGF- β et améliore la réponse au TGF- β en augmentant la signalisation Smad2/3 [87].

CXCR4 (chemokine receptor 4) est le récepteur de CXCL12 (chemokine ligand 12). Ce sont deux facteurs importants dans le dialogue qu'entretiennent les cellules tumorales avec

leur microenvironnement et qui ont un rôle important à jouer dans le processus de croissance tumorale, de métastase et d'angiogénèse [88]. La sécrétion de haut niveau de CXCL12 dans le microenvironnement tumoral attire les cellules CXCR4⁺ (cellules inflammatoires, vasculaires et stromales) qui vont éventuellement promouvoir la croissance de la tumeur en sécrétant divers facteurs de croissances, cytokines, chémokines et facteurs pro-angiogéniques [88, 89].

L'IL-6 (interleukine 6) est une cytokine pleïotropique impliquée dans plusieurs processus tel que l'hématopoïèse, le développement neural, l'inflammation, l'immunité, la reproduction et le métabolisme des os [90]. Dans la tumeur, l'IL-6 contribue à l'activation de STAT3, tel que mentionné précédemment l'activation de STAT3 est importante dans le processus d'immunosuppression et dans d'autres processus de progression de la tumeur. L'IL-6 va également augmenter la résistance à l'apoptose des cellules néoplasiques [91].

Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est essentiel dans la croissance, le développement et l'entretien de la vasculature. C'est une protéine qui est produite par la majorité des cellules, mais sa production est augmentée en situation d'hypoxie [92]. Dans un contexte tumoral, le VEGF est produit par les cellules tumorales en état d'hypoxie, par les cellules endothéliales et les cellules myéloïdes infiltrantes. Il peut se lier à trois différents récepteurs tyrosine kinase; VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3. La cascade de signalisation qui suit la liaison de VEGF à son récepteur implique une multitude d'intermédiaire (ERKs, Src, PI3K/Akt, FAK, Rho GTPases, NO, MAPK) [92]. L'action du VEGF est primordiale pour la croissance, la survie, la vascularisation, la perméabilité vasculaire et la métastase des tumeurs [93] [92].

MMP-9 (matrix metalloprotéinase-9) est une protéine extracellulaire qui module différentes composantes de la matrice extracellulaire (collagène de type IV, V et XI, laminin, etc.) [94]. Cette protéase est produite par plusieurs types cellulaires (myéloïdes et lymphoïdes) et son expression est augmentée par l'activation de CXCR4 et de CCR7 [95]. Dans la tumeur, MMP-9 joue un rôle important dans les processus de migration et d'invasion des cellules néoplasiques [95] [96]. MMP-9 joue également un rôle dans l'angiogénèse en régulant l'accès au VEGF présent dans la matrice extracellulaire [73].

5. Vue d'ensemble, hypothèse et objectifs

Les cellules leucémiques comme les cellules néoplasiques d'autres types de cancers exercent une forte pression immunosuppressive sur l'ensemble du système immunitaire. Ces cellules leucémiques vont recruter et transformer plusieurs types de cellules pour se construire un microenvironnement favorisant leur croissance et leur survie. Ces cellules saines de concert avec les cellules leucémiques vont exprimer un grand nombre de protéines (iNOS, Arg1, Nrp1, CXCR4, etc) et de médiateurs (TGF- β , IL-6, VEGF, MMP9, etc) qui sont responsables d'inhiber les attaques du système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Le TGF- β est une cytokine très importante dans le processus d'immunosuppression, mais son rôle sur la modulation du microenvironnement tumoral leucémique est encore bien mal défini. Notre hypothèse est que l'expression de TGF- β par les cellules (leucémiques et immunitaires) du microenvironnement tumoral module l'infiltration de ce microenvironnement par les cellules du système immunitaire.

Dans la présente étude, nous avons fixé comme objectif principal d'enrichir les connaissances disponibles sur le rôle du TGF- β dans la modulation du microenvironnement tumoral leucémique. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules de leucémie lymphoïde T d'origine murine qui produisent du TGF- β , les cellules EL4. Nous avons évalué et caractérisé l'infiltration de différents types de cellules immunitaires (Th, CTL, macrophages, MDSC) de tumeurs EL4, pour ensuite évaluer le rôle du TGF- β dans la modulation de ces caractéristiques cellulaires et moléculaires.

6. Matériel et méthodes

6.1 Génération de tumeurs dans un modèle murin

Les cellules tumorales utilisées pour cette étude sont les cellules EL4, des cellules de leucémie murine d'origine lymphoïde T et produisant du TGF- β [97]. Elles ont été cultivées in-vitro dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% FBS (Fœtal bovine serum), 1%-Pen-Strep à 37°C. Pour générer dans la souris des tumeurs matures après 21 jours, les cellules EL4 en culture ont été lavées deux fois dans du PBS (Phosphate buffered saline) et resuspendues à une concentration de 1×10^6 cellules/ml dans du PBS. 500 μ l de ce mélange (5×10^5 cellules/injection) ont été délivrés dans les souris B6.SJL ou B6.RAG par injection sous-cutanée dans le bas du dos (Figure 6). Après 21 jours, les souris ont été sacrifiées et nous avons récupéré la tumeur et la rate de ces souris. La rate d'une souris naïve (non manipulée) a également été récupérée pour être utilisée comme contrôle.



Figure 6 : Tumeur EL4 de 21 jours dans le bas du dos d'une souris B6.SJL

Pour la génération de tumeurs de 6 jours, une fois que les cellules EL4 aient été lavées deux fois dans du PBS, elles ont été resuspendues dans du PBS à une concentration de 2×10^6 cellules/ml pour être ensuite mélangées à 50% de Matrigel (BD Bioscience). Le Matrigel demeure en phase liquide à basse température (4°C) et passe sous forme de gel solide à 37°C, ce qui permet d'étudier l'infiltration précoce du milieu tumoral (avant qu'une tumeur visible se forme). Chaque souris B6.SJL recevait une injection de 500 μ l sous-cutanée dans le bas du dos, pour un total de 5×10^5 cellules/injection. Six jours après l'injection, les souris ont été sacrifiées et nous avons récupéré la «tumeur Matrigel» ainsi que la rate de ces souris. La rate d'une souris naïve (non-leucémique) a également été récupérée pour être utilisée comme contrôle, avec et sans matrigel.

6.2 Caractérisation des populations cellulaires infiltrantes

Les tumeurs et les rates extraites ont été broyées à l'aide d'une dissociation mécanique, puis lavées 3 fois avec du PBS 2%FBS (les rates ont subies une étape de lyse des globules rouges avant les lavages). Afin de récolter les cellules, une fois lavées, les tissus broyés ont été filtrés dans des tubes à cytométrie en flux munis d'un bouchon avec filtre intégré (BD Falcon 12x75 mm Tube with Cell Strainer Cap, 35 μ m nylon mesh). Les cellules ont ensuite été resuspendues à 1×10^6 cellules/ml pour être marquées et analysées par cytométrie en flux.

Pour quantifier l'infiltration des populations cellulaires, tous les échantillons ont été marqués avec un anticorps anti-CD45.1, les cellules EL4 étant CD45.2. Les cellules des souris B6.SJL étant CD45.1, le marquage anti-CD45.1 permettait de différencier les cellules tumorales (EL4 – CD45.2) des cellules immunes infiltrantes (cellules de l'hôte – CD45.1). L'analyse des populations infiltrantes a été faite en fonction de la quantité de cellules de ses différentes populations sur la quantité totale de cellules CD45.1 positives.

La détection des différentes populations myéloïdes a été réalisée en utilisant les anticorps suivants; anti-CD45.1 (BD Cat#558701), anti-CD11b (BD Cat#552850), anti-Ly6c (BD Cat#560594), anti-Ly6g (BD Cat#560600), anti-F4/80 (eBioscience Cat#45-4801-80). Pour l'analyse de ce marquage, les cellules CD45.1⁺ ont été sélectionnées puis de ces cellules ont été sélectionnées les cellules CD11b⁺ (cellules myéloïdes). Les cellules CD45.1⁺/CD11b⁺ ont ensuite été séparées en trois populations distinctes; CD45.1⁺/CD11b⁺/Ly6cHigh/Ly6g⁻ (monocytes), CD45.1⁺/CD11b⁺/Ly6cMed/Ly6g⁺ (granulocytes) et CD45.1⁺/CD11b⁺/F4.80⁺ (macrophages).

La détection des différentes populations lymphoïdes a été réalisée en utilisant les anticorps suivants; anti-CD45.1 (BD Cat#558701), anti-CD11b (BD Cat#552850), anti-CD4 (BD Cat#553049), anti-CD8 (BD Cat#557654), anti-TCR β (BD Cat#553173). Pour l'analyse de ce marquage, les cellules CD45.1⁺ ont été sélectionnées et de ces cellules les cellules CD11b⁻/TCR β ⁺ (lymphocytes T totaux) ont été sélectionnées. Les cellules CD45.1⁺/CD11b⁻/TCR β ⁺ ont ensuite été séparées selon leur expression des protéines CD4 (Th) et CD8 (CTL).

La mesure de l'activation des lymphocytes T a été réalisée en utilisant les anticorps suivants; anti-CD45.1 (BD #cat560520), anti-CD4 (BD #cat552775), anti-CD8 (BD #cat557654), anti-CD43aag (Biolegend #cat121206). Les cellules CD45.1⁺ ont été sélectionnées et de ces cellules les populations CD4⁺ et CD8⁺ ont été isolées. Ces populations, CD45.1⁺/CD4⁺ et CD45.1⁺/CD8⁺, ont ensuite été séparées en fonction de leur expression du marqueur d'activation CD43aag. Cette isoforme de CD43 reconnues par l'anticorps 1B11 est exprimée sur les lymphocytes T CD4 et CD8 effecteurs [98].

Les échantillons ont été incubés avec les anticorps à 4°C pendant 1h, lavés une fois avec 500 µl de PBS 2%FBS et analysés au cytomètre en flux (BD LSRII).

6.3 Caractérisation des populations Ly6c⁺ et Ly6g⁺

Les tumeurs et les rates ont été récupérées et les cellules préparées comme dans la section précédente. Les cellules ont été resuspendues à 1x10⁶ cellules/ml pour être marquées avec des anticorps couplés à différents fluorochromes; anti-CD45.1-APC (BD Cat#558701), anti-CD11b-Pe-Cy7 (BD Cat#552850), anti-Ly6c-V450 (BD Cat#560594), anti-Ly6g-APC-Cy7 (BD Cat#560600). Les cellules ont ensuite été séparées par tri en cytométrie en flux (BD Aria**) selon le patron d'expression suivant; CD45.1⁺/CD11b⁺/Ly6cHigh/Ly6g⁻ et CD45.1⁺/CD11b⁺/Ly6cMed/Ly6g⁺. Ces deux populations ont ensuite été déposées sur des lames à l'aide d'un cytopspin, fixées dans l'acétone à -20°C et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Pour chacun des échantillons un ratio du décompte des cellules polymorphonucléaires sur un décompte des cellules mononucléaires a été réalisé. Afin d'éviter de biaiser les résultats, l'identité des échantillons a été masquée pour que les décomptes soient faits par un hématologue de façon aveugle, à l'aide d'un microscope optique standard (Leitz Laborlux 9).

6.4 Caractérisation des populations CD11b⁺

6.4.1 Localisation des cellules CD11b⁺ infiltrant la tumeur

Une fois les tumeurs extraites, une fraction a été conservée pour être congelée à -80°C dans l'OCT (Optimal Cutting Temperature compound). L'OCT est utilisé pour congeler des échantillons de tissus avant la coupe au microtome-cryostat. Des cryosections de 5 µm ont été

déposées sur des lames et fixées dans un mélange 1 :1 Méthanol/Acétone à -20°C. Une fois fixées, les tumeurs ont été marquées avec un anticorps anti-CD11b couplé à un fluorochrome (FITC fluoresceine iso thio cyanate). Après deux heures d'incubation dans une chambre humide, les échantillons ont été lavés à trois reprises dans un bain de PBS et une goutte de DAPI pour colorer les noyaux a été ajoutée. Les lames ont été montées d'une lamelle et scellés avec du vernis à ongles. L'observation des lames a été faite avec un microscope à déconvolution (Zeiss Imager Z2). Pour fin de contrôle une coupe de tumeur non marquée à l'anticorps anti-CD11b et où seul le DAPI a été ajoutée, permettant de s'assurer que les cellules tumorales n'étaient pas auto-fluorescentes.

6.4.2 Évaluation de l'expression génique de TGF- β , VEGF et MMP9

Les cellules préparées comme décrit précédemment ont été marquées avec des anticorps couplés à différents fluorochromes; anti-CD45.1 et anti-CD11b. Les cellules CD45.1⁺/CD11b⁺ de rates et de tumeurs ont été triées en cytométrie en flux (BD Aria**). Ensuite, 1x10⁵ de ces cellules ont été resuspendues dans 200 μ l de PBS et 800 μ l de Trizol (Life technologie cat#15596018). L'ARN fût isolé, dosé par spectrophotométrie (NanoDrop TECAN Infinite M1000 PRO) et 0,2 μ g d'ARN (par réaction de 20 μ l) ont été utilisés pour être transcrit en ADN complémentaire à l'aide d'un kit de transcriptase inverse en suivant le protocole de la compagnie (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit Invitrogen). L'ADNc a été utilisé en qPCR pour évaluer l'expression des gènes suivants; TGF- β (Fw: 5'-TACGTCAGACATTCGGGAAGCA-3', Rv: 5'-GAAGTTGGCATGGTAGCCCTTG-3'), VEGF (Fw: 5'-TCCACCATGCCAAGTGGTC-3', Rv: 5'-CACTCCAGGGCTTCATCGTT-3'), MMP9 (Fw: 5'-GTCCAGACCAAGGGTACAGC-3', Rv: 5'-GTCCAGACCAAGGGTACAGC-3') et HPRT (Fw : 5'-CTCCTCAGACCGCTTTTTTGC-3', Rv: 5'-TAACCTGGTTCATCATCGCTAATC-3') a été utilisé comme gène rapporteur. L'amplification a été réalisée dans un volume total de 25 μ l (2 μ l d'ARN et 23 μ l de MasterMix (12.5 μ l de 2X BioRad iTaq Universal SYBR, 11.5 μ l Rnase-Free water, 0.5 μ l Amorces FW(1/200), 0.5 μ l Amorces Rv(1/200))) en triplicata dans des plaques de 96 puits. L'appareil utilisé pour l'amplification est un ABI 7500 d'Invitrogen.

6.4.3 Évaluation de l'effet anti-prolifératif des populations CD11b⁺ sur les populations de lymphocytes T

Alors qu'une fraction des cellules CD11b triées a été utilisée pour les manipulations de qPCR, l'autre fraction de ces cellules a été utilisée pour mesurer l'effet anti-prolifératif de ces cellules sur les populations de lymphocytes T. Pour ce faire, nous avons récupéré la rate et le fémur d'une souris B6.SJL naïve. Le fémur a été coupé en deux parties égales avec une paire de ciseaux, ces parties ont été placées dans un tube de 500µl troué (les extrémités coupées vers le fond du tube), ce tube a été placé dans un tube de 1.5ml contenant 200µl de milieu RPMI 10%FBS Pen-Strep et les tubes ont été centrifugés (10 secondes Quick Spin) nous permettant de récupérer la moelle dans le tube de 1.5ml. La rate a subi une première étape de lyse des globules rouges, puis les lymphocytes T ont été récupérés à l'aide d'une trousse d'enrichissement pour lymphocytes murins (EasySep™ Mouse T Cell Enrichment Kit). Le protocole utilisé pour l'enrichissement est celui fourni avec la trousse d'enrichissement. Pour analyser la capacité de prolifération, les lymphocytes T récupérés ont été marqués au CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) selon la méthode suivante; les cellules T ont été resuspendues à 1×10^7 cellules/ml dans un milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute Gibco life technologie ref#11875-093). 1µl de CFSE (5 mM) a été mélangé à 1ml de PBS et 1 ml de la suspension de cellules T y a été ajouté. Les cellules ont ensuite été incubées avec le CFSE pendant 10 minutes à 37°C. Le volume a par la suite été doublé avec du FBS et le mélange incubé sur glace pendant 5 minutes. Les cellules ont été lavées dans 10 ml de milieux RPMI, centrifugées et resuspendues dans 10 ml de milieux RPMI 10%FBS Pen-Strep. Les cellules ont par la suite été placées dans des plaques de culture et l'intensité du marquage évalué par cytométrie en flux après 72 heures. Puisque l'intensité du marqueur diminue de moitié à chaque division cellulaire, nous avons déterminé le nombre de divisions et la proportion de cellules ayant proliférées par cytométrie en flux. Pour tester l'effet anti-prolifératif des cellules CD11b⁺ sur les lymphocytes T, les lymphocytes T marqués ont été distribués à raison de 1×10^5 cellules par puits dans une plaque de 96 puits pré-enduite avec 50µl à 10µg/ml d'un anticorps anti-CD3 (BD #cat553057) pendant 1h à 37°C, à l'exception des puits réservés au contrôle négatif. Pour les contrôles, les conditions suivantes ont été appliquées aux cellules T : pour le contrôle négatif, rien ne fût ajouté dans le milieu de culture

des cellules T; pour le contrôle positif les anticorps Anti-CD3 et Anti-CD28 (BD #cat553294) ont été ajoutés aux cellules T; pour le contrôle de cellules de la moelle osseuses, les cellules T ont été mises en co-culture avec 2.5×10^4 ou 5×10^4 cellules de moelle de souris B6.SJL naïve; Dans la première condition expérimentale, les cellules T ont été mises en co-culture avec 2.5×10^4 ou 5×10^4 cellules CD11b⁺ de rate de souris B6.SJL porteuses de tumeurs; pour la seconde condition expérimentale, les cellules T ont été mises en co-culture avec 2.5×10^4 ou 5×10^4 cellules CD11b⁺ ayant infiltrées une tumeur EL4. (Les anticorps Anti-CD3 et Anti-CD28 ont été ajoutés à toutes les conditions à l'exception du contrôle négatif). L'évaluation de la prolifération a été fait selon la méthode de Gudmundsdottir et Turka [99].

6.4.4 Évaluation en microscopie de l'expression de TGF- β par les cellules CD11b⁺

Une fois les tumeurs extraites, une fraction a été conservée pour être congelée à -80°C dans l'OCT et des cryocoupes de $5\mu\text{m}$ ont été déposées sur des lames. Les échantillons ont ensuite été fixés dans un mélange 1 :1 Méthanol/Acétone à -20°C . Une fois fixées, les coupes de tumeurs ont été marquées avec un anticorps anti-CD11b couplé à un fluorochrome (FITC) et avec un anticorps Anti-LAP (Biolegend Cat#141306) couplé à un fluorochrome différent (PE). LAP (latency-associated peptide) est la protéine qui maintient le TGF- β sous sa forme latente. Après deux heures dans une chambre humide, les échantillons ont été lavés à trois reprises dans un bain de PBS, une goutte de DAPI a été ajoutée. Les lames sont par la suite montées d'une lamelle et scellées avec du vernis à ongles. L'observation des lames a été faite avec un microscope à déconvolution (Zeiss Imager Z2). Le contrôle utilisé a été une coupe de tumeur marquée avec un anticorps Anti-IgG1 Kappa (contrôle isotypique PE Biolegend Cat#400111) en plus du DAPI, ce qui permettait de s'assurer que l'anticorps Anti-LAP était spécifique et que les cellules tumorales n'étaient pas auto-fluorescentes.

6.5 Transformation des cellules EL4

La transformation des cellules EL4 shLuc et shTGF- β a été réalisée en utilisant le vecteur pSIREN contenant le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) et le shLuc ou le shTGF- β , les vecteurs pSIREN ont été délivrés dans les cellules EL4 par un adénovirus

conformément au protocole « Cloning into RNAi-Ready pSIREN Vectors » fournit par la compagnie Clontech avec le produit « Knockout™ Adenoviral RNAi System 1 » (Cat# 631528). L'efficacité de la transformation fût vérifiée par qPCR en utilisant le même protocole ayant été décrit précédemment et en utilisant la même paire d'amorces TGF- β (Fw: 5'-TACGTCAGACATTCGGGAAGCA-3', Rv: 5'-GAAGTTGGCATGGTAGCCCTTG-3'). L'expérience a été réalisée sur les deux populations cellulaires transformées, EL4 shLuc et EL4 shTGF- β , à des fins d'analyses comparatives. L'efficacité de la transformation fût également vérifiée par « Western Blot » où 3×10^6 cellules de chacune des conditions (EL4 shLuc et EL4 shTGF- β) ont été centrifugées, resuspendues dans 20 μ l de tampon de lyse. Le lysat a été centrifugé, le surnageant a été récupéré et, 5 μ l et 10 μ l du surnageant utilisés pour la migration. Après la migration, les gels ont été bloqués pendant 1 heure, lavés puis marqués avec un anticorps primaire anti-LAP (1/500) (Biolegend Cat#141306) pour une nuit. Les gels sont lavés dans du TBST, puis marqués avec un anticorps secondaire Anti-mouse-HRP (1/5000) (Biorad Cat#170-6516). L'étape de révélation se fait à l'aide des produits Immuno-Star WesternC kit (Biorad #170-5070) et les photographies ont été prises avec l'appareil fuji image reader LAS4000. L'analyse des photographies a été effectuée avec le programme ImageJ.

6.6 Caractérisation des populations infiltrant la tumeur EL4 transformée dans un modèle de souris B6.RAG1 et B6.SJL

Le processus de caractérisation des populations infiltrantes utilisant les cellules EL4 transformées est sensiblement le même que celui précédemment décrit utilisant les cellules EL4 non transformées. Dans le cas du modèle murin B6.SJL, la seule différence est que pour la caractérisation des tumeurs de 6 jours, les injections du mélange matrigel/cellules EL4(shLuc ou shTGF- β) ont été faites dans la même souris, ce qui veut dire que chaque souris recevait dans le flanc droit une injection Matrigel/cellules EL4 shTGF- β et dans le flanc gauche une injection Matrigel/cellules EL4 shLuc. Dans le cas du modèle murin B6.RAG, la différence se situe au niveau des marquages où l'anticorps Anti-CD45.1 fût remplacé par un anticorps Anti-CD45.2 étant donné le fait que les souris B6.RAG sont CD45.2⁺ contrairement aux souris B6.SJL qui sont CD45.1⁺. Dans ce même modèle, les marquages servant à

l'identification des populations lymphoïdes ont été éliminés puisque les populations lymphoïdes T et B, à l'exception des cellules NK, sont complètement absentes de ces souris due à l'absence de la protéine RAG.

6.7 Évaluation de la croissance des tumeurs EL4 transformées dans un modèle de souris B6.RAG1 et B6.SJL

Pour évaluer la croissance des tumeurs, les tumeurs ont été mesurées à différents temps suivant l'injection des cellules EL4 transformées. Les tumeurs ont été mesurées en largeur et en épaisseur à l'aide d'une règle aux jours 8, 11, 13, 15 et 18. Au jour 21, les souris ont été sacrifiées, les tumeurs ont été extraites puis mesurées en largeur, longueur et épaisseur pour obtenir une mesure plus précise du volume en mm³ des tumeurs.

6.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel Prism GraphPad. Les données ont été comparées par un test de Student où les différences significatives sont montrées par * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

7. Résultats

7.1 Caractérisation des leucocytes infiltrant l'environnement leucémique

Les cellules tumorales n'opèrent pas seules et leur capacité à exprimer une grande variété de cytokines, dont le TGF- β , et des chimiokines pourraient leur permettre d'éviter leur élimination par le système immunitaire. En effet, il a été proposé que la sécrétion de TGF- β entraînerait le recrutement et la reprogrammation de plusieurs sous-populations cellulaires lymphoïdes et myéloïdes saines ce qui permettrait aux cellules tumorales d'échapper à la vigilance du système immunitaire [100] [2]. Dans le but d'étudier le rôle du TGF- β dans la modulation du microenvironnement tumoral, nous avons utilisé les cellules EL4 de leucémie murine qui forment des tumeurs lorsque injectées sous-cutanées dans le dos de la souris

B6.SJL. Les cellules EL4 sont connues pour leur production de TGF- β [2]. Afin de caractériser les tumeurs formées par les cellules EL4, nous avons analysé les populations cellulaires qui infiltrèrent précocement (Jour 6) et tardivement (Jour 21) les tumeurs formées par les cellules EL4. La rate étant un organe lymphoïde important, nous l'avons prélevée et analysée afin d'évaluer l'effet systémique de la tumeur EL4. La manipulation de tumeurs permet difficilement de quantifier l'infiltration cellulaire totale à cause de l'hétérogénéité des préparations de tumeurs, mais plusieurs informations qualitatives peuvent toutefois être obtenues.

Dans un premier temps, les cellules de la rate des souris B6.SJL naïves ont été analysées. Nous avons isolé et quantifié les différentes populations myéloïdes (Figure 7) par cytométrie en flux. Les cellules des échantillons analysés ont par la suite été sélectionnées positivement si elles exprimaient le marqueur CD45.1. À partir des cellules CD45.1⁺, les populations myéloïdes et lymphoïdes ont été analysées. Les populations myéloïdes ont été divisées selon les profils d'expression suivants : CD45.1⁺/CD11b⁺/Ly6c^{High}, CD45.1⁺/CD11b⁺/Ly6c^{Med}/Ly6g⁺ et CD45.1⁺/CD11b⁺/F4/80⁺ qui sont respectivement rapportées dans la littérature comme étant des populations myéloïdes monocytaires, granulocytaires [72] et de macrophages [101].

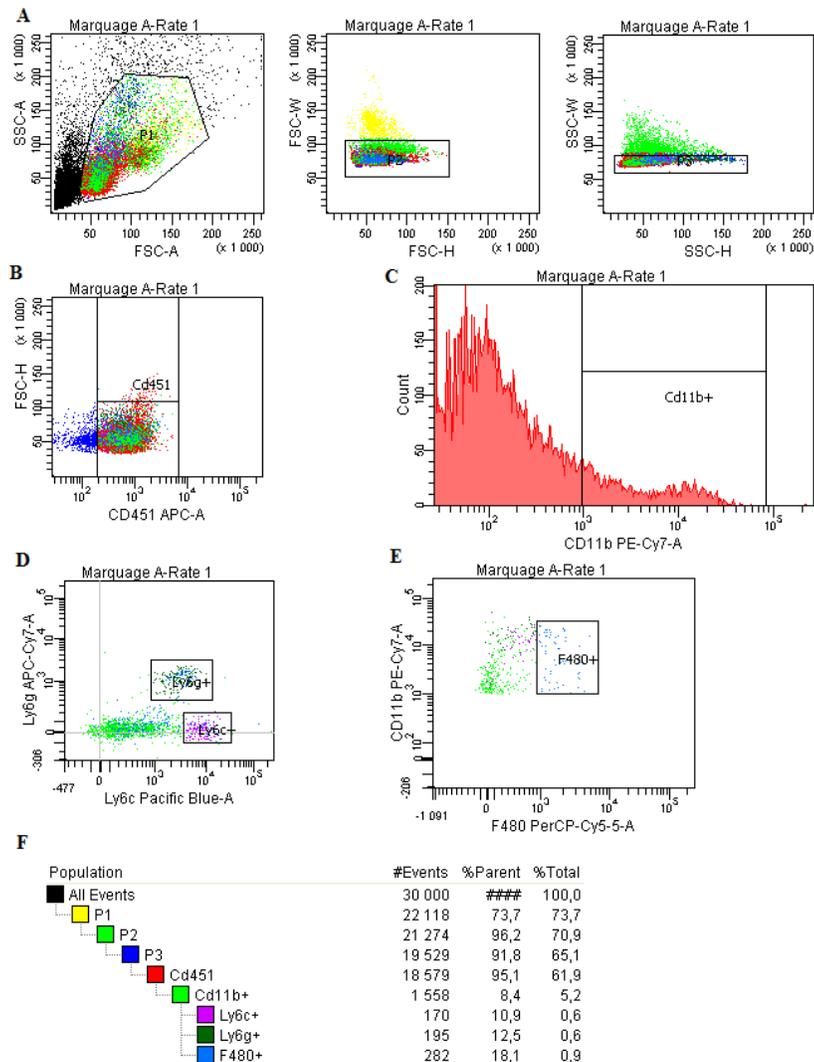


Figure 7 : Résultat type lors de l'isolation des populations myéloïdes d'une rate de souris par cytométrie en flux.

(A) Élimination des débris et élimination des doublets par la taille (FSC) et la granularité (SSC). (B) Sélection des cellules positives pour le marqueur de différenciation CD45.1. (C) À partir des cellules CD45.1⁺, sélections des cellules positives pour le marqueur de cellules myéloïdes (CD11b). (D) À partir des cellules CD11b⁺, sélection des cellules Ly6c^{High} (Monocytes) et des cellules Ly6c^{Med}/Ly6g⁺ (Granulocytes). (E) À partir des cellules CD11b⁺, sélection des cellules F4/80⁺ (Macrophages). (F) Résumé du processus de collecte des populations myéloïdes. Le même processus de sélection est utilisé pour la caractérisation des populations qui infiltrent la tumeur.

7.1.1 Caractérisation des populations myéloïdes de la tumeur au jour 6

Nous avons analysé les populations qui avaient infiltrées la tumeur 6 jours après l'injection. Nous avons observé que les cellules myéloïdes ($CD11b^+$) représentent un fort pourcentage du total des cellules infiltrantes ($CD45.1^+$). Il n'y a aucune différence significative entre le pourcentage d'infiltration des différentes sous-populations que nous avons examinées (Figure 8). Il est important de noter qu'il a été impossible de récupérer et d'analyser le contrôle de matrigel seul (sans cellules EL4) car le matrigel était complètement digéré après 6 jours.

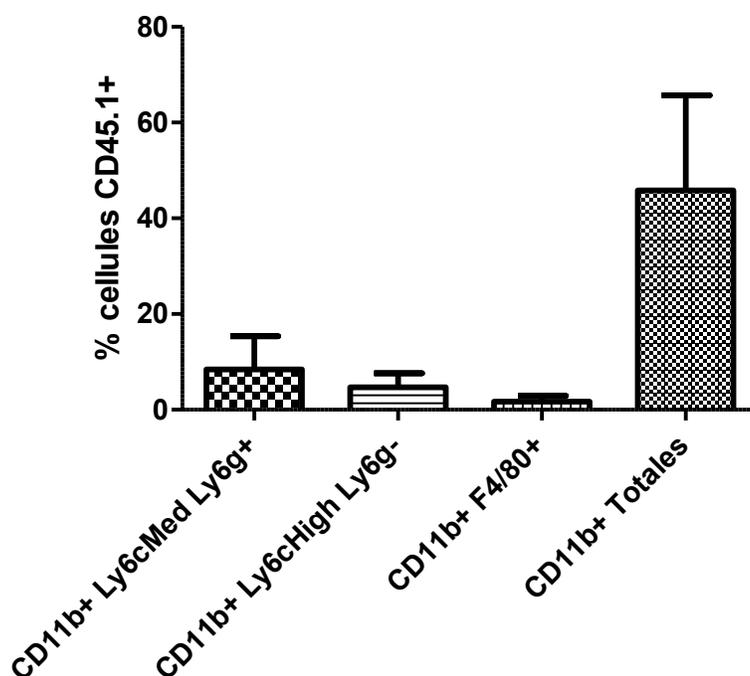


Figure 8 : Caractérisation des populations myéloïdes de la tumeur au jour 6.

L'ensemble des populations myéloïdes dans les tumeurs de 6 jours représente environ 50% du total des cellules infiltrantes ($CD45.1^+$). Il n'y a aucune différence significative entre le pourcentage d'infiltration des différentes sous-populations d'intérêt ($Ly6g^+$, $Ly6c^+$ et $F4/80^+$).

N=4

7.1.2 Caractérisation des populations myéloïdes de la tumeur au jour 21

Nous avons caractérisé l'infiltration de tumeurs EL4 par les populations cellulaires myéloïdes au jour 21 et comparé cette infiltration avec l'analyse de la tumeur au jour 6. Bien que nous ayons tendance à retrouver un plus faible pourcentage de cellules CD11b⁺ dans les tumeurs de 6 jours, nous n'avons observé aucune différence significative entre l'ampleur de l'infiltration myéloïde du jour 6 et du jour 21. Nous avons observé que le pourcentage de cellules Ly6c⁺ au jour 21 était significativement plus élevé que celui des populations Ly6g⁺ et F4/80⁺ (Figure 9).

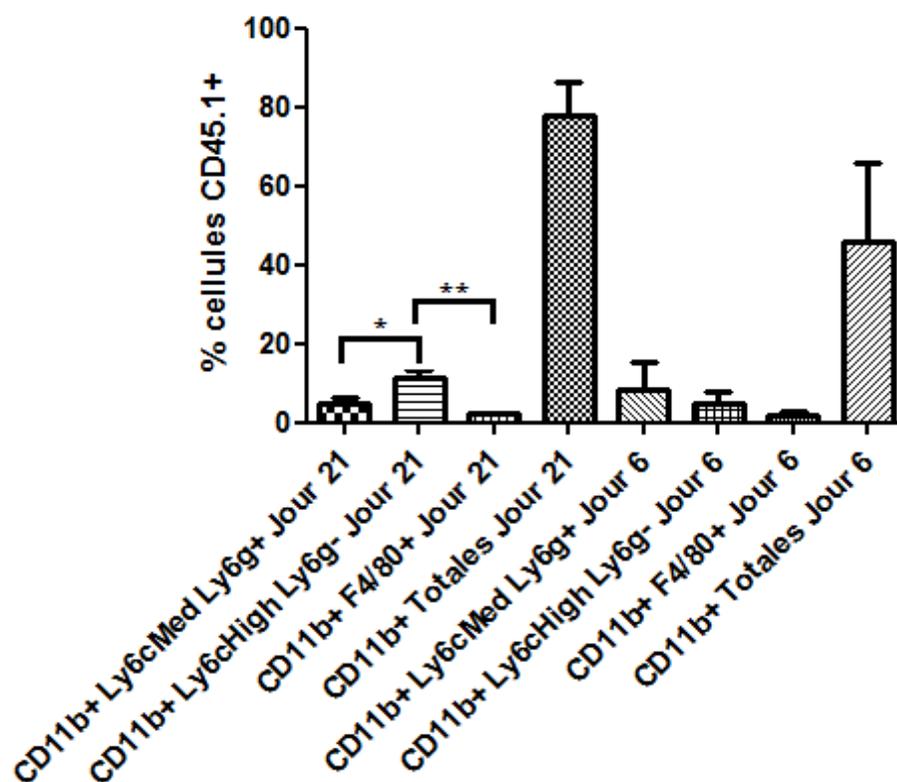


Figure 9 : Caractérisation des populations myéloïdes de la tumeur au jour 21.

Au jour 21, il y a significativement plus de cellules Ly6c⁺ que de cellules Ly6g⁺ et F4/80⁺. Il n'y a aucune différence significative entre les populations des jours 6 et 21. N=4. *p<0.05 **p<0.01 Student T-Test.

7.1.3 Caractérisation des populations myéloïdes de la rate de souris porteuses de tumeurs au jour 6

Nous avons analysé les populations myéloïdes de rates de souris ayant portées une tumeur EL4 pendant 6 jours. Nous avons observé que l'ensemble des cellules myéloïdes ($CD11b^+$) représente environ 25% des cellules de rates de souris porteuses de tumeurs et de la rate d'une souris naïve, et que les populations de phénotype MDSC ainsi que les macrophages sont très faiblement présentes. Il n'y a aucune différence significative entre les différentes populations de MDSC (Figure 10). Ces résultats suggèrent que 6 jours ne suffisent pas à modifier la composition cellulaire de la rate d'une souris porteuse de tumeur.

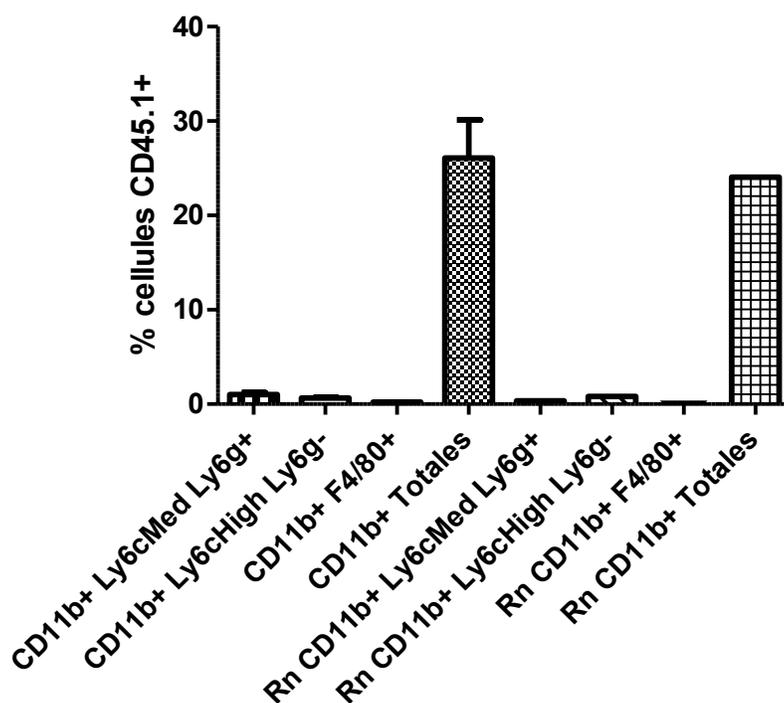


Figure 10 : Caractérisation des populations myéloïdes de rates de souris porteuses de tumeurs de 6 jours.

Les cellules myéloïdes ($CD11b^+$) de rates de souris porteuses de tumeurs de 6 jours et d'une rate de souris naïve représentent environ 25% des cellules $CD45.1^+$. Les populations de MDSC ($Ly6g^+$, $Ly6c^+$ et $F4/80^+$) sont très peu nombreuses dans les rates de souris porteuses

de tumeurs de 6 jours et dans la rate de souris naïve (Rn). N=4 rates de souris porteuses de tumeurs.

7.1.4 Caractérisation des populations myéloïdes de la rate de souris porteuses de tumeurs au jour 21

Nous avons caractérisé les populations myéloïdes présentes dans la rate de souris ayant portées une tumeur EL4 pendant 21 jours et comparé les résultats avec ceux du jour 6. Nous avons observé une augmentation significative du pourcentage des populations Ly6g⁺ et Ly6c⁺ au jour 21 par rapport au jour 6 tandis que le pourcentage de cellules CD11b⁺ totales et de cellules F4/80⁺ demeure constant. Nous avons également observé que le pourcentage de cellules Ly6g⁺ est significativement plus élevé que le pourcentage de cellules Ly6c⁺ et F4/80, et que le pourcentage de cellules Ly6c⁺ est significativement plus élevé que le pourcentage de cellules F4/80 (Figure 11). Ces résultats montrent que la progression tumorale favorise l'accumulation de cellules de phénotype MDSC au niveau systémique.

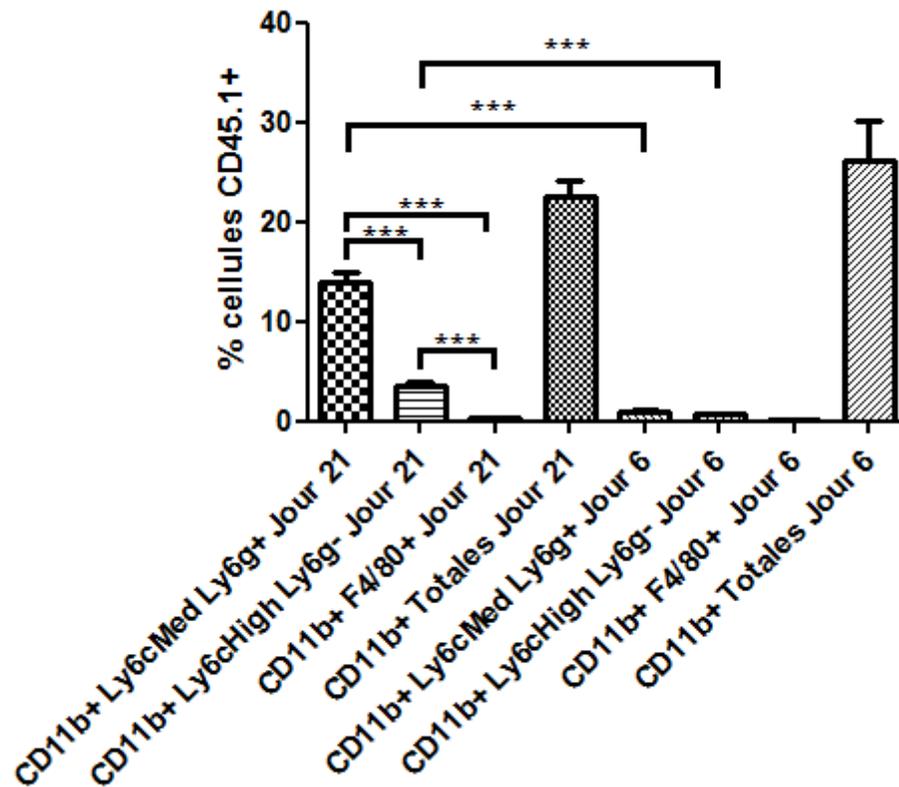


Figure 11 : Caractérisation des populations myéloïdes de la rate de souris porteuses de tumeurs au jour 21.

Le pourcentage de cellules Ly6g⁺ et de cellules Ly6c⁺ au jour 21 est significativement plus élevé qu'au jour 6. Il n'y a aucune différence significative au niveau du pourcentage de cellules CD11b⁺ totales et de cellules F4/80⁺ des jours 6 et 21. Au jour 21, il y a significativement plus de cellules Ly6g⁺ que de cellules Ly6c⁺ et F4/80⁺, et significativement plus de cellules Ly6c⁺ que de cellules F4/80⁺. N=4.***p<0.001 Student T-Test.

La caractérisation de l'infiltration myéloïde dans les masses tumorales EL4 démontre que l'infiltration est précoce et ne s'accroît pas dans le temps par rapport aux autres leucocytes infiltrants et que parmi trois populations myéloïdes pertinentes (les MDSC monocytaires, granulocytaires ainsi que les macrophages), les tumeurs au jour 21 contiennent surtout des cellules d'immunophénotype MDSC monocytaires. Aussi, nos données démontrent que la présence de tumeur dans le flanc amène une accumulation de cellules de phénotype

MDSC majoritairement granulocytaire dans la rate (qui par ailleurs ne contient pas de cellules leucémique - CD45.2⁺, donnée non montrée).

7.1.5 Caractérisation des populations lymphoïdes T CD4⁺ et CD8⁺ de la rate de souris porteuses de tumeurs et de tumeurs EL4 au jour 6 et 21

Les populations lymphoïdes ont été divisées selon les profils d'expression suivants : CD45.1⁺/TCRβ⁺/CD4⁺ et CD45.1⁺/TCRβ⁺/CD8⁺ qui sont respectivement rapportées dans la littérature comme étant des populations de lymphocytes T helper et T cytotoxiques [102] (Figure 12).

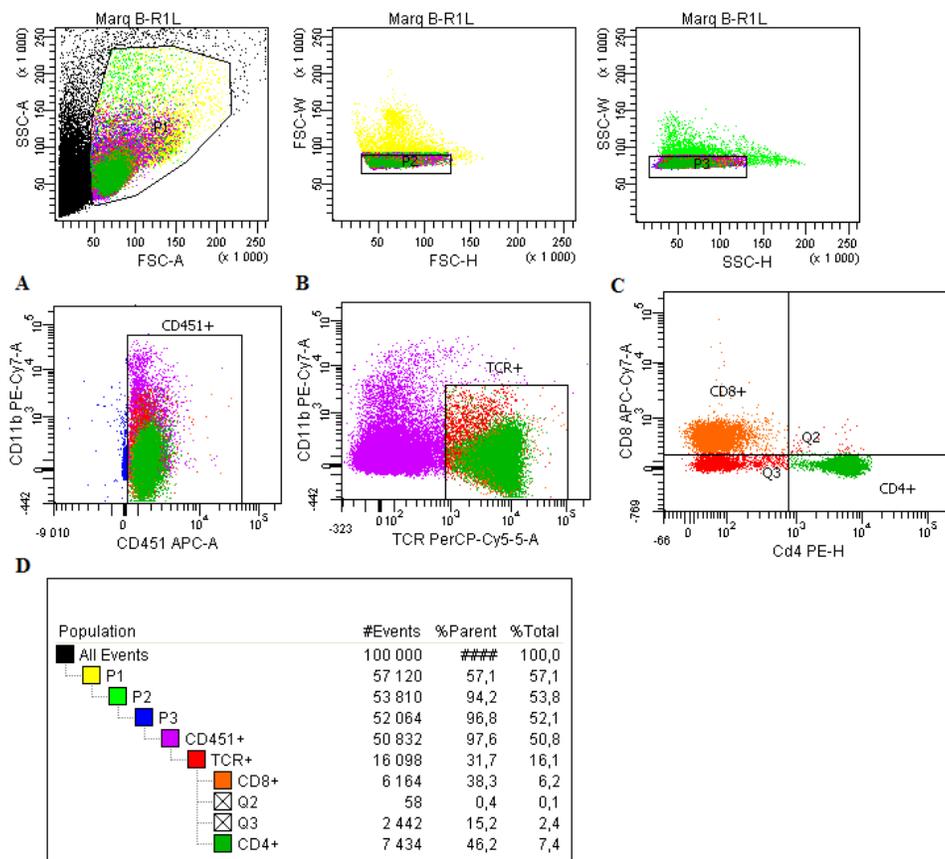


Figure 12 : Résultat type lors de l'isolation des populations lymphoïdes d'une rate de souris par cytométrie en flux.

Les premières étapes de sélection sont les mêmes que celles de la sélection des populations lymphoïdes (A) incluant la sélection des cellules CD45.1 positives. (B) À partir des cellules CD45.1⁺, sélection des cellules exprimant le marqueur de lymphocytes T (TCR β chain). (C)

À partir des cellules TCR β^+ , sélection des populations Th (CD4) et CTL (CD8). **(D)** Résumé du processus de sélection des populations lymphoïdes ici représenté à partir d'une rate de souris CD45.1 $^+$.

Nous avons analysé l'infiltration des populations lymphoïdes CD4 $^+$ (Th) et CD8 $^+$ (CTL) dans les tumeurs et dans les rates de souris porteuses de tumeur au jour 6 et au jour 21. Nous avons observé que le pourcentage de cellules CD4 $^+$ et de cellules CD8 $^+$ est significativement plus élevé au jour 21 qu'au jour 6, les pourcentages passent d'environ 8% à 20% et de 1% à 15% respectivement dans les tumeurs (Figure 13). Nous n'avons observé aucune différence significative entre les pourcentages de CD4 $^+$ et de CD8 $^+$ dans les rates de souris porteuses de tumeurs au jour 6 et au jour 21.

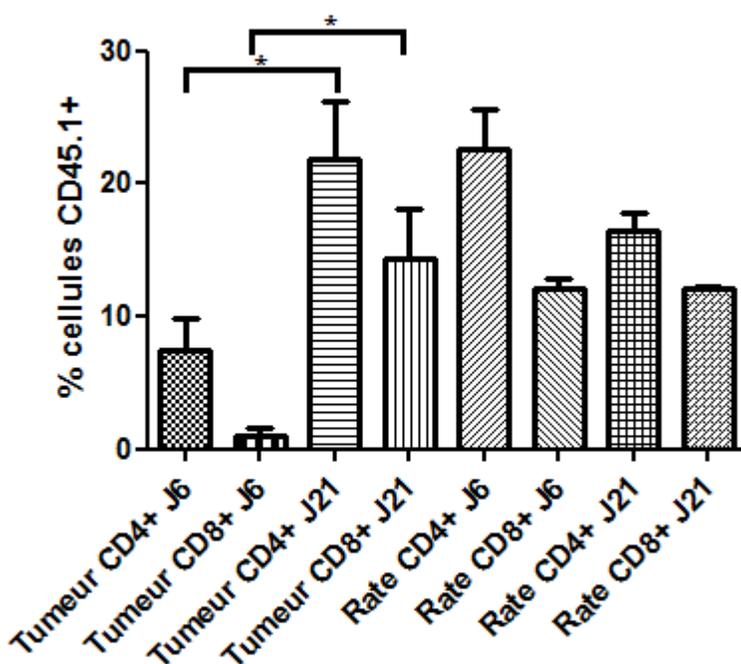


Figure 13 : Caractérisation des populations lymphoïdes de la rate de souris porteuses de tumeurs et de tumeurs EL4 au jour 6 et 21.

Augmentation significative des cellules CD4 $^+$ et des CD8 $^+$ au jour 21 par rapport au jour 6 dans les tumeurs EL4. Aucune différence significative au niveau de la rate. N=3. *p<0.05 Student T-Test.

7.2 Mesure de l'accumulation de lymphocytes T activés dans les rates de souris porteuses de tumeurs et de tumeurs EL4

Les lymphocytes T sont les principaux effecteurs anti-tumoraux et des cellules susceptibles d'être modulées de façon TGF- β dépendante [103]. Nous avons voulu vérifier si la tumeur EL4 recrutait des cellules T et si elle recrutait des cellules activées. Pour ce faire nous avons utilisé un marquage de surface reconnaissant une glyco-isoforme de CD43 (CD43aag) présente que sur les effecteurs et absente sur les cellules naïves et mémoires [98]. Nous avons mesuré les pourcentages de lymphocytes T dans notre modèle de tumeur EL4 et dans la rate de souris ayant portées une tumeur pendant 6 jours et 21 jours. Nous avons comparé les proportions de cellules exprimant le CD43aag: des populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Figure 15), des populations de lymphocytes T CD4⁺ du jour 6 versus celles du jour 21 (Figure 16) et des populations de lymphocytes T CD8⁺ du jour 6 versus celles du jour 21 (Figure 17).

7.2.1 Comparaison de l'activation entre les populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de rates et de tumeurs EL4

Nous avons observé plusieurs différences significatives entre les populations CD4⁺ et CD8⁺ dans les rates et dans les tumeurs. En effet, au jour 6 et au jour 21 après injection des cellules EL4, la proportion de lymphocytes CD4⁺ de la rate exprimant CD43aag est significativement plus élevée que la proportion chez les lymphocytes CD8⁺. Cependant cette proportion semble peu différente de ce qu'on retrouve chez une souris non-leucémique. Au jour 6, la proportion de lymphocytes CD4⁺ activés dans les tumeurs est plus élevée que celle les lymphocytes CD8⁺ (Figure 14). Après 21 jours, la différence entre les populations des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ dans les tumeurs n'est pas significative. Alors que la proportion de cellules effectrices est basse dans la rate, la tumeur recrute une grande proportion de cellules T activées. La proportion de cellules CD8⁺ activées infiltrant la tumeur semble progresser à mesure que la tumeur évolue. Il est aussi possible que les cellules soient activées au niveau de la tumeur.

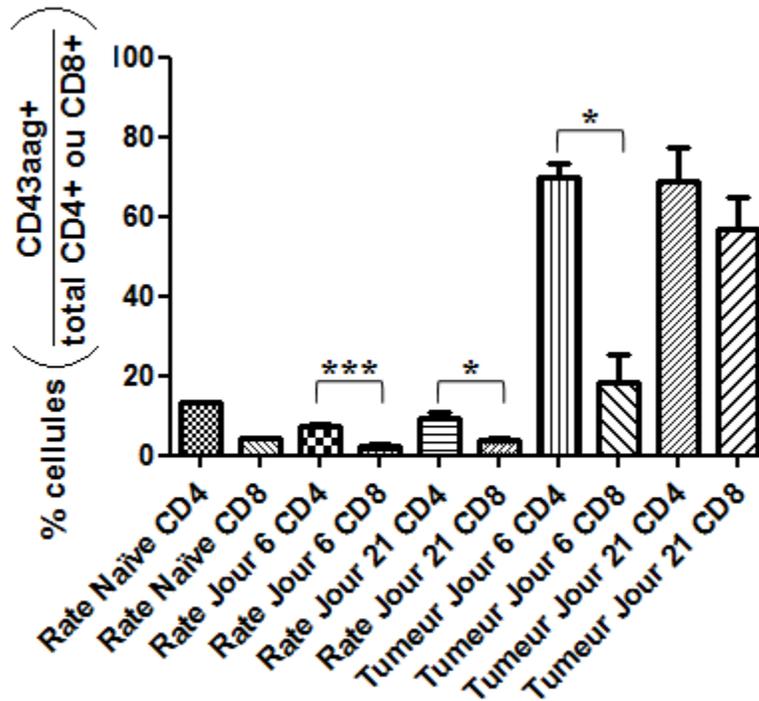


Figure 14 : Comparaison du niveau d'activation entre les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺.

Comparaison des proportions de lymphocytes T activés dans les rates et les tumeurs EL4 aux jours J6 et J21 N=4, Tumeurs J6 N=2, Tumeurs J21 N=4. *p<0.05.***p<0.001 Student T-Test.

7.2.2 Accumulation de Th (CD4) effecteurs de rates et de tumeurs EL4

Les lymphocytes Th (CD4) jouent un rôle très important dans la réponse anti-tumorale [1]. Nous avons donc évalué leur niveau d'activation dans la rate de souris porteuses de tumeur et dans la tumeur EL4 au jour 6 et au jour 21. Nous avons comparé leur activation en fonction du temps (jour 6 versus jour 21) et en fonction de leur provenance (rate ou tumeur). Nos résultats montrent qu'il n'y a aucune différence significative entre la proportion de cellules activées CD4⁺ entre les jours 6 et 21. Par contre, leur activation est beaucoup élevée au niveau de la tumeur que de la rate que ce soit au jour 6 ou au jour 21 (Figure 15). Ce qui confirme qu'il est possible que les cellules soient activées au niveau de la tumeur.

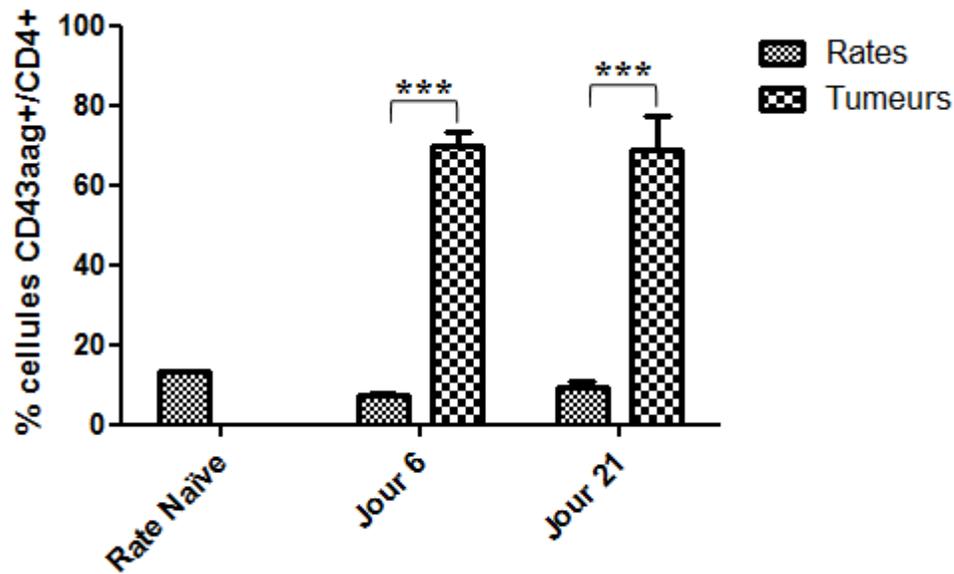


Figure 15 : Mesure de l'activation des Th (CD4) de rates et de tumeurs EL4 au jour 6 et 21

Il n'y a aucune différence significative dans la proportion de lymphocytes CD4⁺ activés entre les jours 6 et 21. La proportion de lymphocytes T CD4⁺ activés est plus élevée dans la tumeur que dans la rate que ce soit au jour 6 ou au jour 21. Rate naïve N=1, Rates J6 et J21 N=4, Tumeurs J6 N=2, Tumeurs J21 N=4. ***p<0.001. Student T-Test

7.2.3 Accumulation de CTL (CD8) activés de rates et de tumeurs EL4

Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8) occupent également un rôle très important dans la réponse anti-tumorale [1], nous avons donc évalué leur niveau d'activation dans la rate de souris porteuses de tumeur et dans la tumeur EL4 au jour 6 et au jour 21. Nous avons comparé leur état d'activation en fonction du temps (jour 6 versus jour 21) et en fonction de leur provenance (rate ou tumeur). Alors qu'il n'y a pas de différence entre la proportion des CD8/CD43aag⁺ dans les rates de souris, nous avons observé que les cellules CD8⁺ de tumeur au jour 21 sont proportionnellement plus activées qu'au jour 6. De plus, nous avons observé que ces cellules sont significativement plus activées dans les tumeurs EL4 que dans les rates de souris ayant portées ces tumeurs (Figure 16).

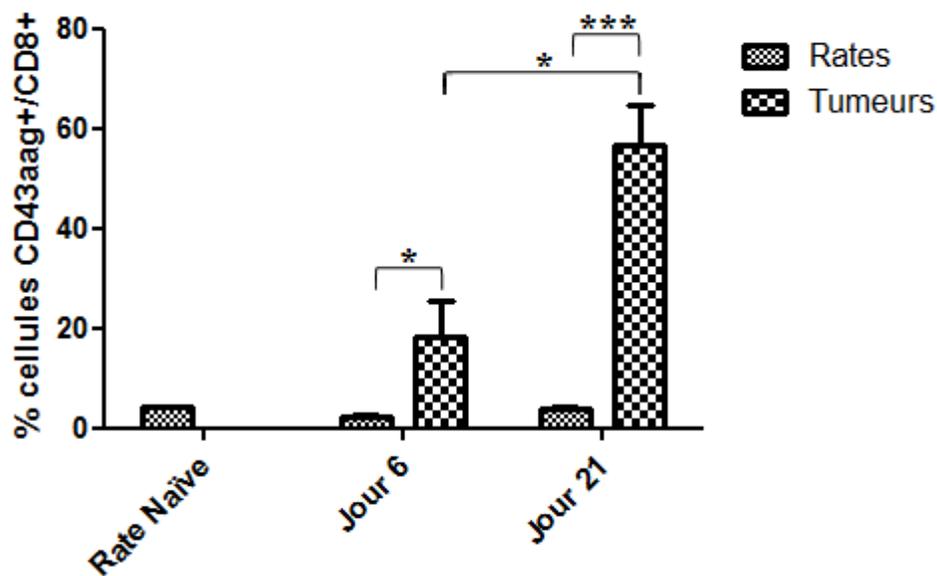


Figure 16 : Mesure de l'activation des CTL (CD8) de rates et de tumeurs EL4 au jour 6 et 21.

La proportion de cellules CD8⁺ activées de tumeurs augmente significativement au jour 21 par rapport au jour 6. La proportion de cellules CD8⁺ activées dans les tumeurs EL4 est significativement plus élevée que dans les rates de souris ayant portées ces tumeurs. Rate naïve N=1, Rates J6 et J21 N=4, Tumeurs J6 N=2, Tumeurs J21 N=4. *p<0.05.***p<0.001 Student T-Test.

Notre étude de l'infiltration tumorale par les lymphocytes T CD4 et CD8 montre que les tumeurs induisent l'accumulation de cellules T effectrices. Cette mobilisation n'est pas systémique, contrairement à ce que l'on voit pour les cellules myéloïdes.

7.3 Caractérisation par microscopie des populations myéloïdes Ly6c et Ly6g de rates et de tumeurs EL4

La forte présence de cellules myéloïdes n'a jamais été rapportée dans le modèle de leucémie EL4. Nous avons donc entrepris d'examiner de plus près ces cellules. Les populations cellulaires exprimant les marqueurs $CD11b^+/Ly6g^-/Ly6c^{High}$ et $CD11b^+/Ly6c^{Med}/Ly6g^+$ ont été décrites précédemment comme étant respectivement des populations de monocytes et de granulocytes. [72] Afin de déterminer si nos cellules possédaient les mêmes caractéristiques, les cellules ont été analysées par microscopie optique. Les cellules $CD11b^+/Ly6g^-/Ly6c^{High}$ et $CD11b^+/Ly6c^{Med}/Ly6g^+$ ont été triées de rates et de tumeurs EL4 et comptées en microscopie en fonction de leur morphologie (Figure 7). Un ratio des cellules polymorphonucléaires sur les cellules monocytaires a été effectué pour évaluer la proportion de chaque population. Nous avons montré que les cellules $Ly6c^+$ de rates et les cellules $Ly6g^+$ de rates et de tumeurs sont majoritairement polymorphonucléaires et que les cellules $Ly6c^+$ de tumeurs sont majoritairement mononucléaires. Il n'y a aucune différence significative entre les populations $Ly6c^+$ de rates et de tumeurs, et entre les populations $Ly6g^+$ de rates et de tumeurs (Figure 17). Nous avons conclu que l'analyse morphologique confirme que les cellules $Ly6c^{high}$ sont majoritairement des monocytes et que les cellules $Ly6g^+$ sont surtout des granulocytes.

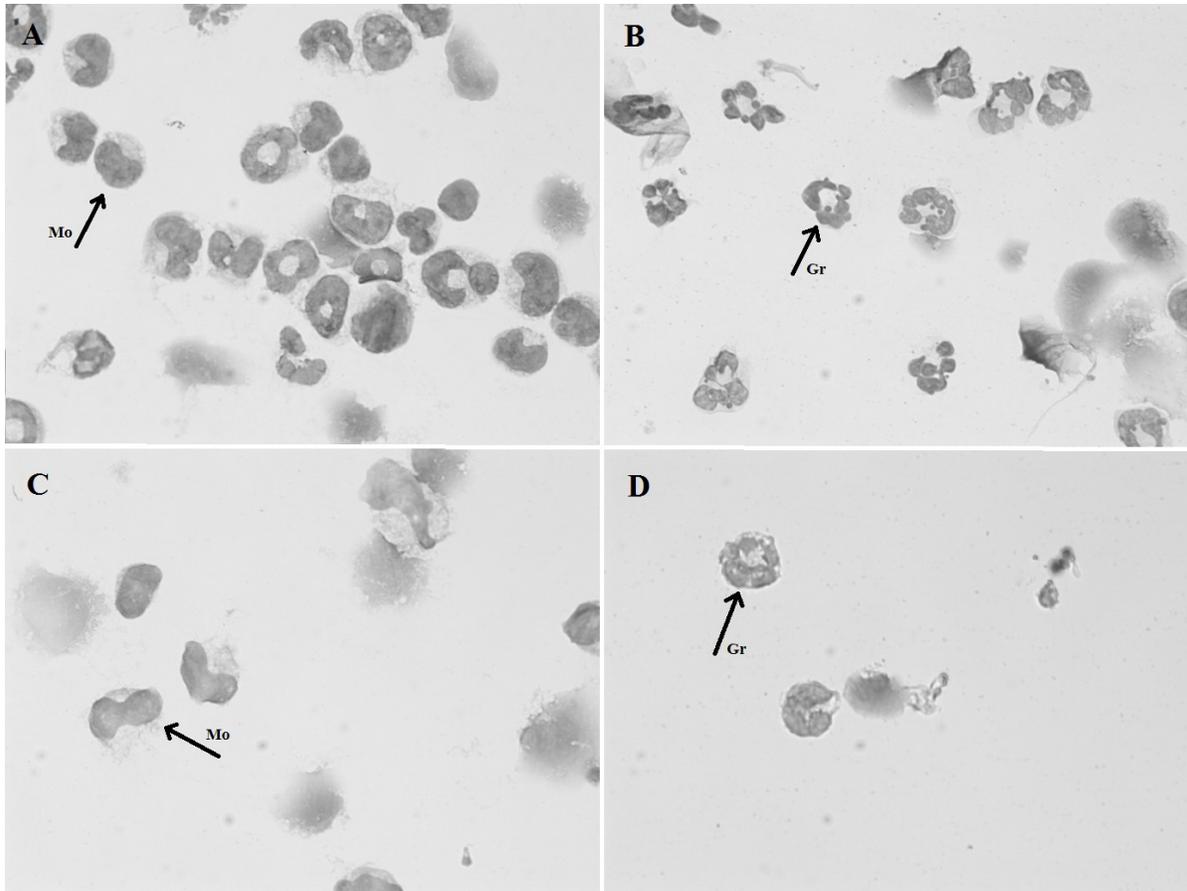


Figure 17 : Caractérisation microscopique des populations $CD11b^+/Ly6c^{High}$ et $CD11b^+/Ly6c^{Med}/Ly6g^+$ de rates et de tumeurs EL4.

(A) Photographie représentative de la population $CD11b^+/Ly6c^{High}$ issue de la rate d'une souris porteuse de tumeur. (B) Photographie représentative de la population $CD11b^+/Ly6c^{Med}/Ly6g^+$ issue de la rate d'une souris porteuse de tumeur. (C) Photographie représentative de la population $CD11b^+/Ly6c^{High}$ issue d'une tumeur EL4. (D) Photographie représentative de la population $CD11b^+/Ly6c^{Med}/Ly6g^+$ issue d'une tumeur EL4.

7.4 Localisation des cellules myéloïdes (CD11b⁺) dans la tumeur EL4

Nous avons montré que les populations cellulaires myéloïdes (CD11b⁺) représentent un fort pourcentage des cellules infiltrant nos tumeurs EL4. Nous avons voulu analyser par immunofluorescence la localisation de ces cellules dans nos tumeurs. Des cryocoupes de tumeurs ont été marquées avec le DAPI (localisation des noyaux) et un anti-CD11b-FITC pour mettre en évidence les cellules myéloïdes. Nos résultats montrent que les cellules myéloïdes infiltrantes étaient significativement en plus forte concentration en périphérie de la tumeur (Figure 18.D). Par contre, nous avons également observé une forte densité de ces cellules à proximité des structures vasculaires présentes au cœur de la tumeur (Figure 18.C).

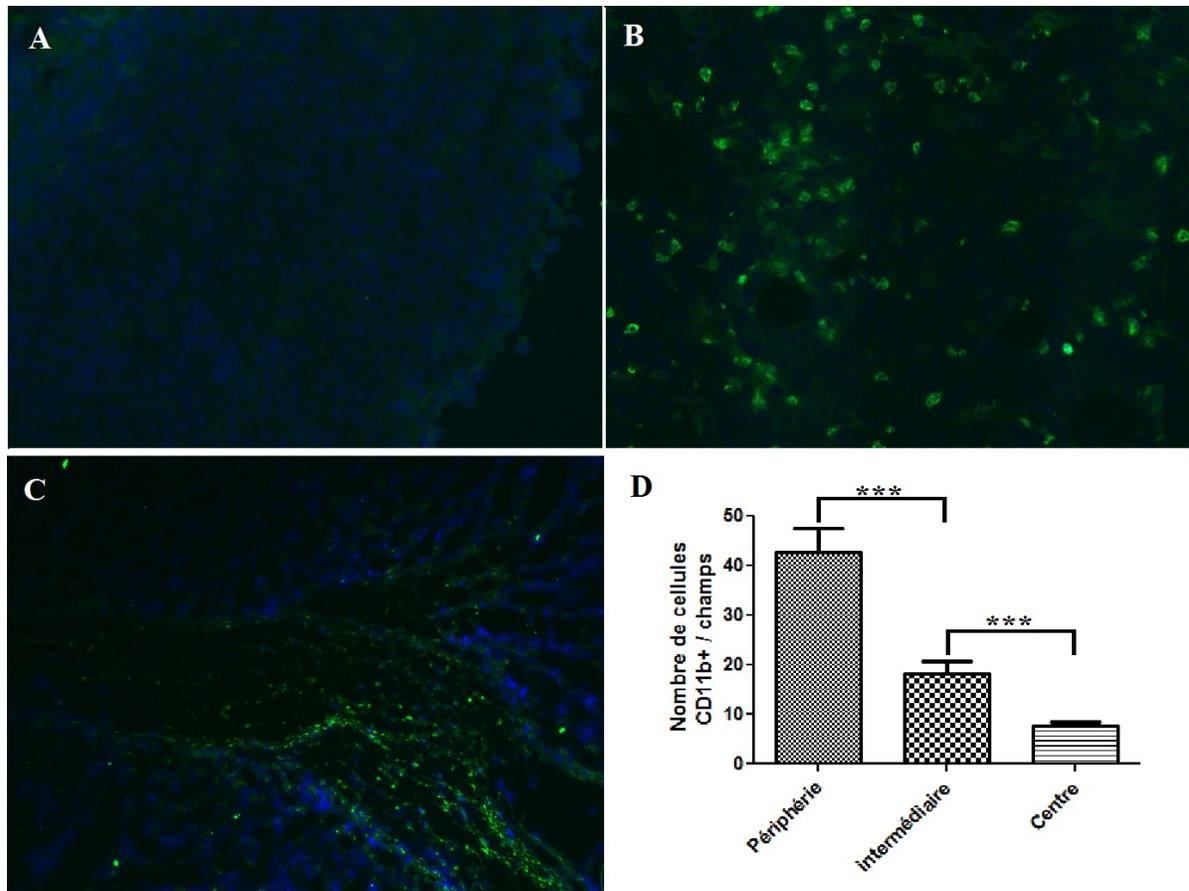


Figure 14 : Localisation des cellules myéloïdes (CD11b⁺) dans la tumeur EL4.

(A) Photographie représentative du contrôle, DAPI seul, utilisé pour évaluer l'auto fluorescence des échantillons de tumeur. (B) Photographie représentative de la périphérie d'une tumeur EL4 suite au marquage anti-CD11b-FITC et DAPI. (C) Photographie représentative d'un vaisseau à l'intérieur d'une tumeur EL4 suite au marquage anti-CD11b-FITC et DAPI où l'on peut observer une forte densité de cellules CD11b⁺. (D) Les cellules myéloïdes infiltrantes sont significativement plus fortement concentrées en périphérie de la tumeur. N=4 tumeurs. ***p<0.001. Student T-Test

7.5 Mesure de l'expression génique de gènes d'intérêts par les cellules CD11b⁺ de rates et de tumeurs EL4

Pour poursuivre la caractérisation des cellules myéloïdes (CD11b⁺) de rates de souris porteuses de tumeurs et des tumeurs EL4, nous avons évalué l'expression par ces cellules de différents gènes connus pour leurs rôles dans la modulation du microenvironnement tumoral soit TGF- β , VEGF et MMP9 [2, 95]. L'expression est toujours présentée par la relation entre l'expression de ces gènes par les cellules myéloïdes des tumeurs sur l'expression de ces gènes par les cellules CD11b⁺ de la rate d'une souris naïve, non leucémique (calibrateur). La valeur 1 représente l'expression du calibrateur. $RQ = \text{Relative quantification} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. Notre hypothèse était que par rapport à la rate, les cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs exprimeraient plus fortement ces trois gènes et ainsi auraient témoigné en faveur d'une identité MDSC et d'un potentiel immunosupresseur. D'autres essais ont été faits avec les gènes CXCR4, Nr1p1, iNOS et arginase afin d'étendre cette caractérisation, mais à ce stade, des difficultés techniques limitent l'interprétation de nos résultats pour ces gènes.

7.5.1 Expression de TGF- β

Le TGF- β étant une cytokine avec des propriétés immunosuppressives qui est sécrétée par plusieurs types de cellules myéloïdes dites suppressives, nous avons voulu déterminer s'il était exprimé par les cellules CD11b⁺ de rates de souris porteuses de tumeurs ou de tumeurs EL4. Nous n'avons observé aucune différence significative entre l'expression de TGF- β par les cellules CD11b⁺ de rates ou de tumeurs, notamment à cause d'une très grande hétérogénéité entre les répliques expérimentaux. Par contre, nous avons noté que l'expression de TGF- β par les cellules CD11b⁺ de rates ou de tumeurs tend à être inférieure à celle des cellules CD11b⁺ de la rate de souris naïves (arbitrairement à 1 sur l'axe des y de la Figure 19). Ce qui montre que la présence de cellules tumorales diminue l'expression de TGF- β par les cellules CD11b⁺.

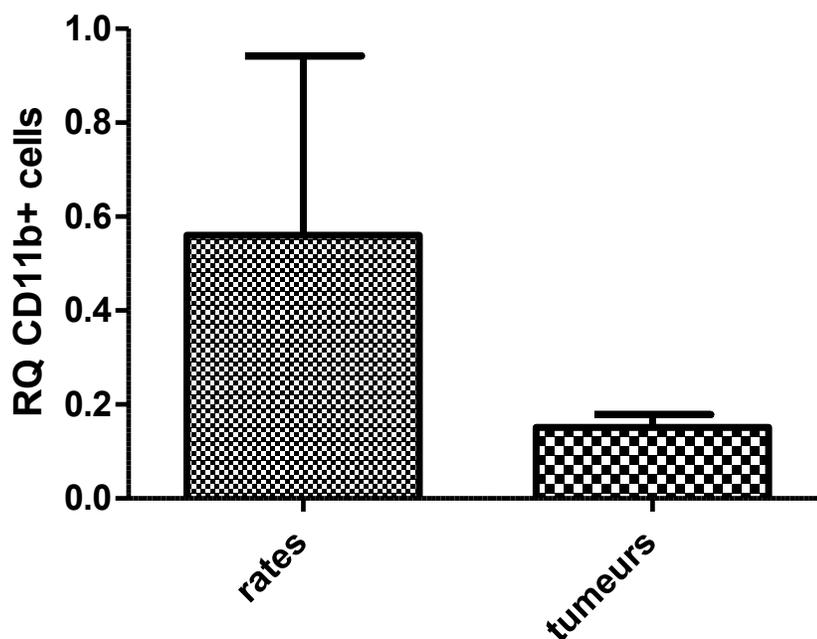


Figure 15 : Expression de TGF- β (ARN m) par les cellules CD11b⁺ de rates et de tumeurs EL4.

Il n'y a aucune différence significative entre l'expression de TGF- β par les cellules CD11b⁺ de rates ou de tumeurs, mais l'expression est inférieure à celle des cellules CD11b⁺ de la rate d'une souris naïve. Rates N=4. Tumeurs N=5.

7.5.2 Expression de VEGF

Le VEGF (Vascular endothelial growth factor) est une protéine importante dans le processus d'angiogenèse tumoral et d'immunosuppression [95]. Dans le but de poursuivre notre caractérisation des cellules CD11b⁺, nous avons mesuré l'expression du VEGF par les cellules myéloïdes de rates et de tumeurs EL4. Nous avons observé une augmentation de l'expression du VEGF dans les cellules CD11b⁺ provenant de rates et de tumeurs par rapport aux cellules CD11b⁺ d'une rate de souris naïve. De plus, une différence significative a été observée entre l'expression du VEGF entre les cellules de rates et de tumeurs (Figure 20). En effet, l'expression du VEGF est plus élevée dans les cellules CD11b⁺ de la rate que dans les cellules présentes dans les tumeurs.

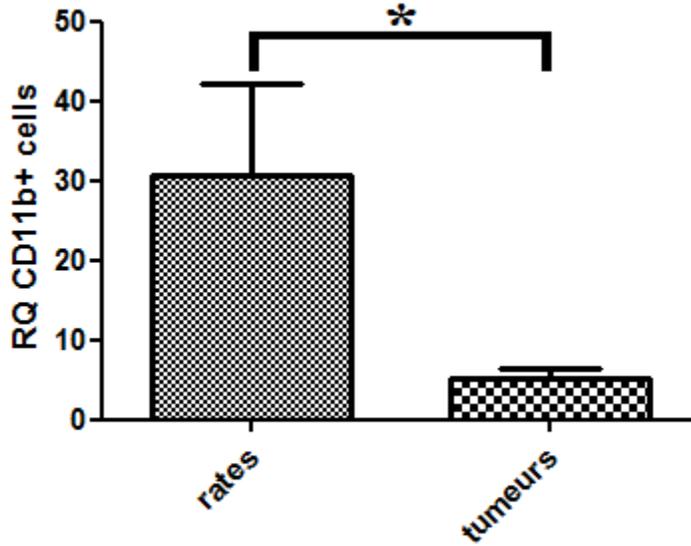


Figure 16 : Expression de VEGF (ARNm) par les cellules CD11b⁺ de rates et de tumeurs EL4.

Augmentation de l'expression de VEGF dans les cellules CD11b⁺ provenant de rates et de tumeurs par rapport aux cellules CD11b⁺ d'une rate de souris naïve. Différence significative de l'expression de VEGF entre les cellules de rates et de tumeurs. Rates N=3. Tumeurs N=5. *p<0.05. Student T-Test.

7.5.3 Expression de MMP9

La protéase MMP9 (Matrix metalloproteinase-9) joue un rôle important dans le remodelage du microenvironnement tumoral et dans le processus d'invasion des cellules tumorales [95]. Dans le but de poursuivre notre caractérisation des cellules CD11b⁺, nous avons mesuré l'expression de la MMP9 par les cellules myéloïdes de rates de souris porteuses de tumeurs EL4. Nous avons observé une très forte augmentation de l'expression de MMP9 par les cellules CD11b⁺ de rates de souris porteuses de tumeurs par rapport aux cellules CD11b⁺ de la rate d'une souris naïve. Nous avons également observé une différence significative entre l'expression du MMP9 par les cellules CD11b⁺ de rates et les cellules CD11b⁺ de tumeurs (Figure 21), l'expression dans les cellules de la rate étant plus importante.

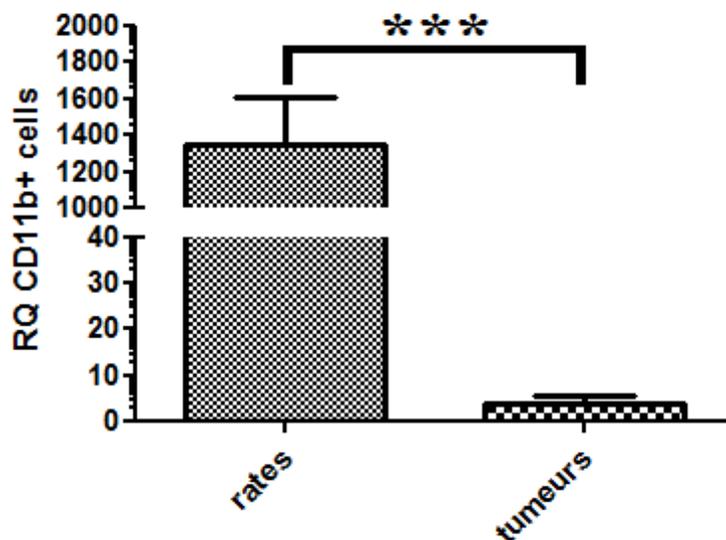


Figure 17 : Expression de MMP9 (ARNm) par les cellules CD11b⁺ de rates et de tumeurs EL4.

Très forte augmentation de l'expression de MMP9 par les cellules CD11b⁺ de rates de souris porteuses de tumeurs par rapport aux cellules CD11b⁺ de la rate d'une souris naïve. Différence significative entre l'expression de MMP9 par les cellules CD11b⁺ de rates et les cellules CD11b⁺ de tumeurs. Rates N=3. Tumeurs N=5. ***p<0.001 Student T-Test.

Contrairement à notre hypothèse de départ, les cellules CD11b⁺ de tumeurs EL4 n'expriment pas plus d'ARNm de TGF-β, de VEGF et de MMP9. Par contre, l'expression de ces ARNm par les CD11b⁺ de tumeurs et de rates par rapport à leur expression par les CD11b⁺ de rates de souris naïves est substantiellement supérieure. Ces résultats démontrent que la leucémie a vraisemblablement un effet sur la biologie des cellules myéloïdes.

Notre évaluation des transcrits de trois gènes pertinents à la fonction des MDSC nous suggère que contrairement à ce que nous pensions, l'expression de TGF-β n'est pas augmentée dans les cellules myéloïdes infiltrantes et chez les cellules s'accumulant dans la rate de souris leucémiques. Par contre, il semble clair que les transcrits de MMP9 et VEGF soient plus élevés dans les populations myéloïdes de souris leucémiques. Les différences entre

les populations spléniques et tumorales demeurent toutefois plus difficiles à expliquer. Une possibilité est que le processus d'extraction des cellules à partir de tumeur, suivi du tri, endommage davantage les cellules infiltrant la tumeur.

7.6 Mesure de l'effet anti-prolifératif des cellules CD11b de rates et de tumeurs sur les lymphocytes T

Les MDSCs (Myeloid-derived Suppressor Cells) sont connues pour leurs caractéristiques immunosuppressives [72]. Elles correspondent aux CD11b⁺ (Ly6c⁺ et Ly6g⁺) et font partie des populations myéloïdes CD11b⁺. Dans la présente étude, nous voulions étudier l'impact de ces cellules sur la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de rates de souris naïves. En raison du nombre relativement faible des CD11b⁺ (Ly6c⁺ et Ly6g⁺) et à l'impossibilité de trier suffisamment de ces cellules, nous avons utilisé l'ensemble de la population CD11b⁺ triées à partir de suspensions cellulaires de tumeur et de rate de souris leucémiques pour procéder à l'étude. Notre contrôle était des cellules myéloïdes obtenues à partir de la moelle osseuse d'une souris saine. La moyenne R (Rate of responder pool cells that actually responded) correspond au pourcentage de cellules T CD4 et CD8 qui se sont divisées au moins une fois (Figure 22A et Figure 23A). Cette variable permet de savoir si un stimulus donné a un impact sur le nombre de cellules T qui atteignent le seuil d'activation critique pour amorcer leur réponse proliférative. La moyenne Td (Doubling time) correspond au temps moyen nécessaire par division, par rapport au contrôle positif (Figure 22B et Figure 23B). Cette variable mesure une autre propriété que le R en estimant la cinétique de prolifération. Le contrôle positif (cellules T cultivées seules avec stimulus mitogénique CD3ε et CD28) est 100% pour la moyenne R et pour la moyenne Td. Une moyenne R inférieure à 100% signifie qu'il y a eu une baisse de la réponse proliférative et une moyenne Td supérieure à 100% signifie une accélération du processus de division cellulaire.

Nous avons observé un effet anti-prolifératif (R) des cellules de moelles osseuses totales sur les cellules CD4⁺ et CD8⁺, mais les cellules de moelles osseuses n'ont eu aucun effet sur le temps de dédoublement des cellules CD4⁺ et CD8⁺ qui se sont divisées. Nous n'avons observé aucun effet des cellules CD11b⁺ de rates provenant des souris porteuses de tumeurs et de tumeurs sur les cellules CD4⁺ (Figure 22). Par contre, une augmentation de la

moyenne R des cellules CD8⁺ misent en culture avec les cellules CD11b⁺ de rates de souris porteuses de tumeurs et une augmentation significative de la moyenne R des cellules CD8⁺ misent en culture avec les cellules CD11b⁺ de tumeurs EL4 a été observé (Figure 23).

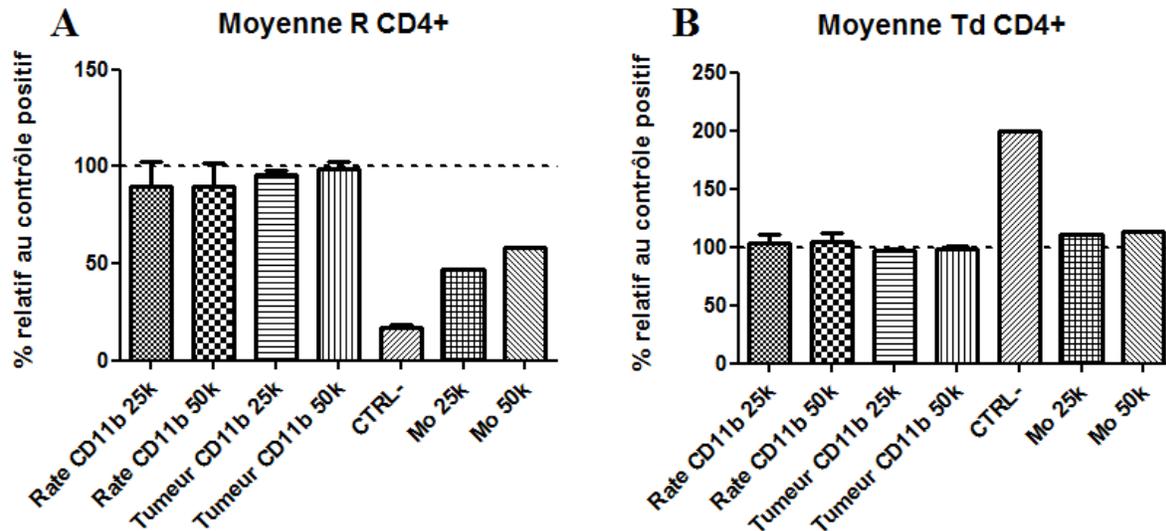


Figure 18 : Mesure de l'effet anti-prolifératif des cellules CD11b⁺ sur les lymphocytes T CD4⁺.

(A) Les cellules CD11b⁺ de rates et de tumeurs EL4 n'ont aucun effet sur la prolifération des cellules CD4⁺ de souris B6.SJL naïve, par contre les cellules contrôles (cellules de moelle osseuse) ont diminué la capacité des cellules CD4⁺ à proliférer. (B) Les cellules CD11b⁺ de rates, de tumeur et de moelle osseuse n'ont eut aucun effet sur le temps de dédoublement des cellules CD4⁺. Dans chacun des cas, 1×10^5 cellules CD4⁺ sont exposées à 2.5×10^4 ou 5×10^4 cellules des différentes conditions. Rates et tumeurs N=3. Ctrl- (cellules T cultivées dans stimulus mitogénique) N=2. Moelle osseuse N=1.

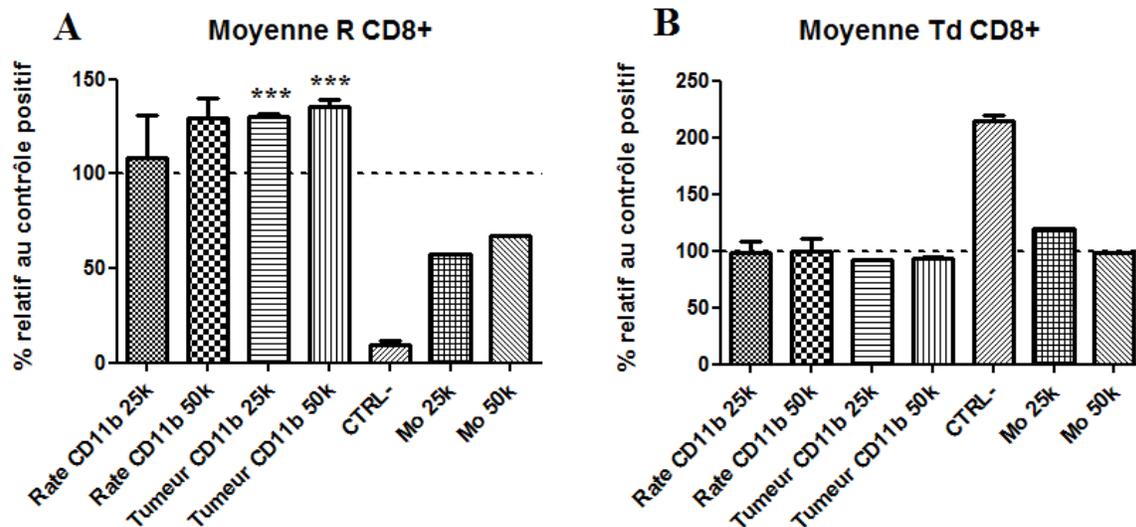


Figure 19 : Mesure de l'effet anti-prolifératif des cellules CD11b⁺ sur les lymphocytes T CD8⁺.

(A) Les cellules CD11b⁺ de rates de souris porteuses de tumeur ont tendance à augmenter la prolifération des cellules CD8⁺ alors que les cellules de moelles osseuses diminuent leur prolifération et les cellules CD11b⁺ de tumeurs EL4 augmentent significativement leur prolifération. (B) Les cellules CD11b⁺ de rates, de tumeur et de moelle osseuse n'ont eu aucun effet sur le temps de dédoublement des cellules CD8⁺. Dans chacun des cas, 1×10^5 cellules CD8⁺ sont exposées à 2.5×10^4 ou 5×10^4 cellules des différentes conditions. Rates et tumeurs N=3. Ctrl- N=2 (cellules T cultivées dans stimulus mitogénique). Moelle osseuse N=1. ***p<0.001 Student T-Test.

Le microenvironnement tumoral est parsemé de cellules myéloïdes, leur gradient diminue de l'extérieur vers l'intérieur et elles sont présentes en grand nombre en périphérie des vaisseaux sanguins. Les cellules myéloïdes de phénotype MDSC s'accumulent dans la tumeur et de façon systémique. Par contre, il nous a été impossible de démontrer leurs effets suppresseurs sur la prolifération des lymphocytes T.

7.7 Évaluation qualitative en microscopie de l'expression de TGF par les cellules CD11b de tumeurs EL4

Pour confirmer les résultats obtenus en qPCR, nous avons analysé des cryo-coupes de tumeurs EL4 marquées avec différents anticorps par immunofluorescence. Les coupes ont été marquées avec un anticorps anti-LAP-PE (LAP conserve le TGF- β sous sa forme latente) et avec un anticorps anti-CD11b-FITC. La spécificité de l'anticorps anti-LAP-PE a été vérifiée à l'aide d'un contrôle isotypique anti-IgG1 utilisé sur une coupe de testicule (Figure 24.A) et sur une coupe de tumeur EL4 (Figure 24.C). Le testicule a été utilisé comme contrôle puisqu'il est un organe immuno-privilegié qui produit du TGF- β [104] et que par conséquent il contient la protéine LAP (Figure 24.B Rouge). Nous avons observé que LAP ne semble pas présent dans les cellules CD11b⁺, mais plutôt sur les cellules tumorales elles-mêmes (Figure 24.D).

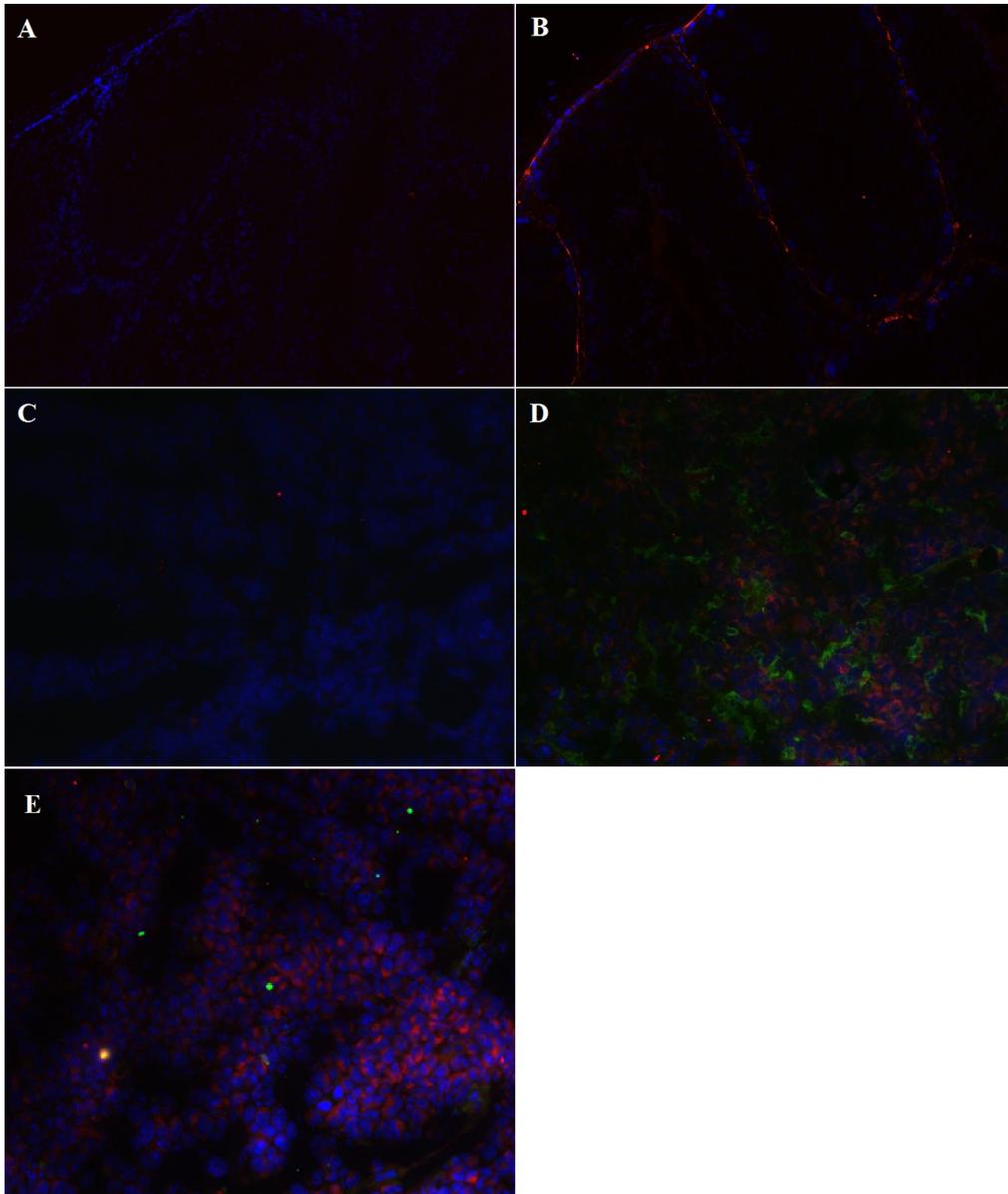


Figure 20 : Évaluation qualitative en microscopie de l'expression de TGF par les cellules CD11b de tumeurs EL4.

(A) Contrôle négatif de testicule DAPI (Bleu) et ctrl isotypique anti-IgG1-PE murin. (B) Contrôle positif de testicule; DAPI (Bleu) et anti-LAP-PE (Rouge). (C) Contrôle négatif de tumeur EL4; DAPI (Bleu) et ctrl isotypique anti-IgG1-PE murin. (D) Tumeur EL4 marqué avec DAPI, anti-LAP-PE (Rouge) et anti-CD11b-FITC (Vert). Très peu de colocalisation entre les cellules CD11b⁺ et la protéine LAP dans la tumeur EL4. (E) Cellules tumorales exprimant LAP (Rouge). N=4 tumeurs.

7.8 Caractérisation des populations infiltrantes suivant le « knockdown » de TGF- β des cellules EL4

Précédemment, nous avons déterminé que les cellules tumorales produisent du TGF- β . Dans le but d'élucider le rôle du TGF- β provenant des cellules leucémiques dans la modulation du microenvironnement tumoral nous avons transformé des cellules EL4. Afin de diminuer la production de TGF- β , un shTGF- β +GFP a été introduit dans le génome de cellules EL4. Un shLuc+GFP a été introduit dans le génome de cellules EL4 à des fins de contrôle. L'efficacité du shTGF- β a été vérifiée par qPCR et par Western Blot chez des cellules EL4 en culture. Par qPCR, nous avons observé une diminution de l'expression de TGF- β d'environ 60% dans les cellules EL4 transformées (Figure 25.A). Par Western Blot, nous avons observé une diminution de TGF- β latent d'environ 40% dans les cellules EL4 transformées (Figure 25.B).

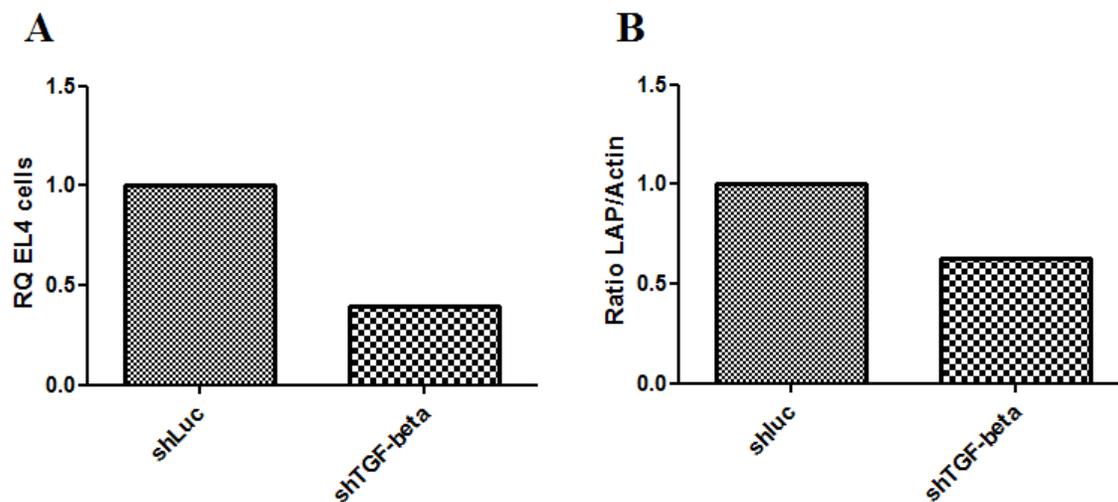


Figure 21 : Vérification par qPCR et par Western Blot de l'efficacité du «Knockdown» de TGF- β dans les cellules EL4.

(A) Diminution d'environ 60% de la quantité d'ARNm codant pour TGF- β dans les cellules EL4 transformées. (B) Diminution d'environ 40% de la quantité de TGF- β latent dans les cellules EL4 transformées. N=1

7.8.1 Caractérisation des populations de la tumeur au jour 6 dans le modèle murin B6.SJL

Nous avons analysé et comparé l'infiltration des populations myéloïdes et lymphoïdes au jour 6 dans des tumeurs EL4 shLuc et des tumeurs EL4 shTGF- β . Nous avons observé un pourcentage significativement plus élevé de cellules Ly6g⁺ que de cellules Ly6c⁺ et F4/80⁺ dans les deux modèles de tumeurs EL4 (shLuc et shTGF- β), et un pourcentage de cellules CD4⁺ significativement plus élevé que le pourcentage de cellules CD8⁺ dans les tumeurs EL4 shTGF- β . La dominance des cellules Ly6g⁺ est compatible avec nos observations précédentes chez des cellules EL4 non transformées. Malheureusement, nous n'avons observé aucune différence significative entre les populations infiltrantes la tumeur EL4 shLuc et la tumeur EL4 shTGF- β au jour 6 (Figure 26).

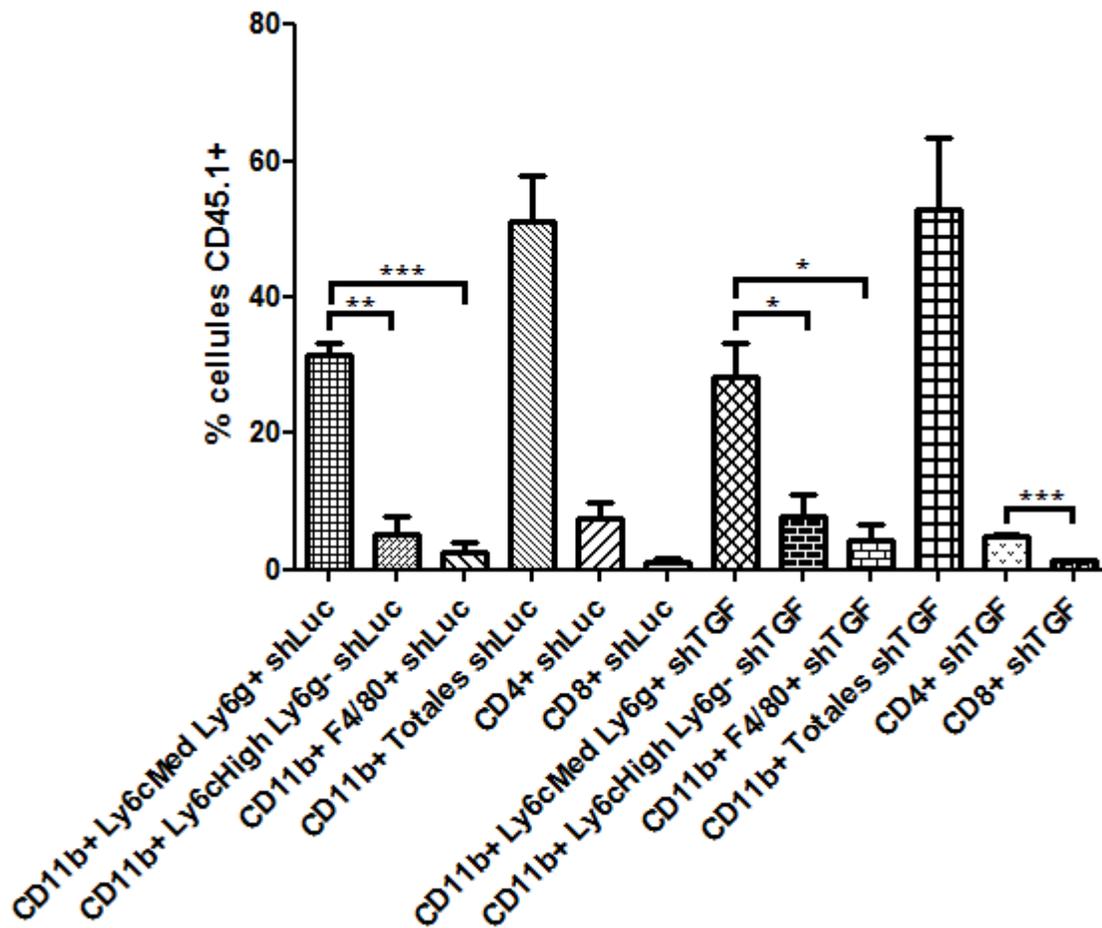


Figure 22 : Caractérisation des populations de la tumeur au jour 6 dans le modèle murin B6.SJL.

Il y a significativement plus de cellules Ly6g⁺ que de cellules Ly6c⁺ et F4/80⁺ dans les deux modèles de tumeurs EL4 transformées (shLuc et shTGF-β). Dans la tumeur EL4 shTGF-β, il y a significativement plus de cellules CD4⁺ que de cellules CD8⁺. Il n'y a aucune différence significative entre les populations qui infiltrent la tumeur EL4 shLuc et celles qui infiltrent la tumeur EL4 shTGF-β. N=3. *p<0.05. ***p<0.001. Student T-Test.

7.8.2 Caractérisation des populations de la tumeur EL4 shLuc et EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin B6.SJL

Nous avons analysé les différentes populations myéloïdes et lymphoïdes qui infiltrent les tumeurs EL4 shLuc et shTGF- β dans des souris B6.SJL au jour 21 suivant l'injection. Nous avons observé une différence significative au niveau du pourcentage de cellules CD11b⁺ totales qui infiltrent la tumeur. En effet, il y a une diminution du ratio de cellules CD11b⁺ sur le total de cellules infiltrantes (CD45.1⁺) dans les tumeurs EL4 shTGF- β par rapport au même ratio dans les tumeurs EL4 shLuc. Nous n'avons observé aucune différence dans les proportions des autres sous types cellulaires (Figure 27).

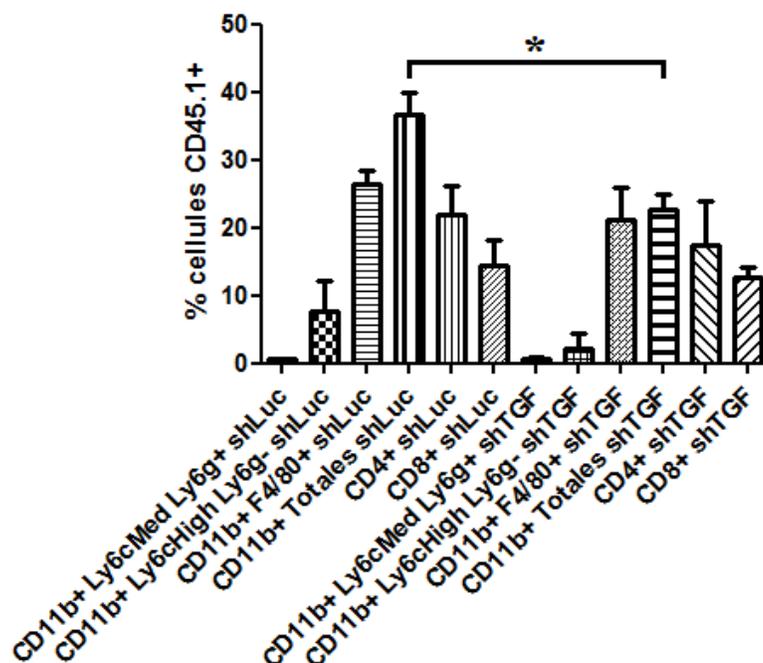


Figure 23 : Caractérisation des populations de la tumeur EL4 shLuc et EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin B6.SJL

Il y a une diminution du ratio de cellules CD11b⁺ sur le total de cellules infiltrantes (CD45.1⁺) dans les tumeurs EL4 shTGF- β par rapport au même ratio dans les tumeurs EL4 shLuc. Aucune différence dans les proportions des autres sous types cellulaires n'a été observée. N=3.

*p<0.05 Student T-Test.

7.8.3 Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et shTGF- β au jour 6 dans le modèle murin B6.SJL

Nous avons caractérisé les populations myéloïdes et lymphoïdes de rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et shTGF- β au jour 6 pour pouvoir comparer la composition cellulaire de la rate au jour 6 avec celle du jour 21 après l'injection de cellules EL4 transformées. Nous avons observé, tel que précédemment, qu'il y avait plus de cellules CD4⁺ que de cellules CD8⁺ dans la rate de souris porteuses de tumeurs au jour 6 (Figure 28). Nous n'avons pas fait de comparatif entre les rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et les rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shTGF- β parce que l'expérience était faite dans la même souris (pour des raisons économiques et éthiques), dans un flanc étaient injectées les cellules EL4 shLuc et dans l'autre flanc étaient injectées les cellules EL4 shTGF- β .

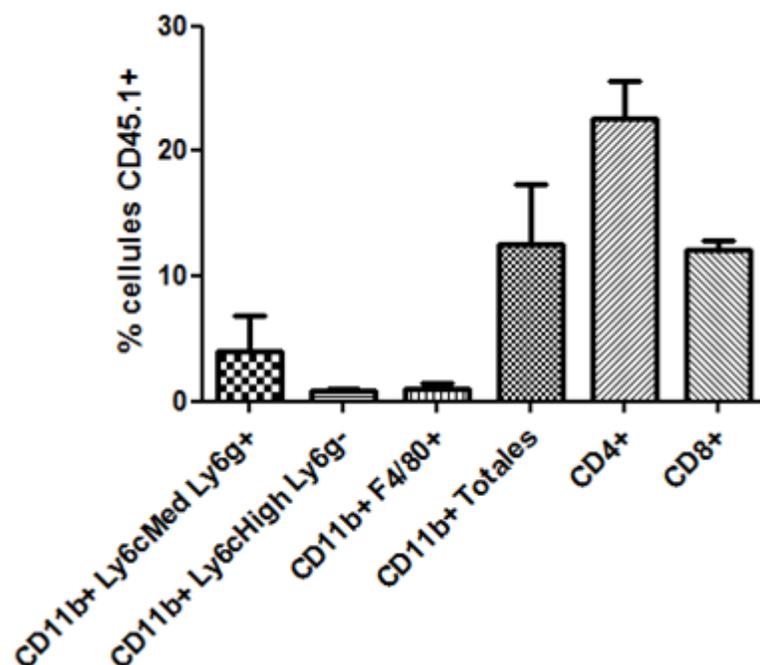


Figure 24 : Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et shTGF- β au jour 6 dans le modèle murin B6.SJL.

Il y a environ 15% de cellules CD11b⁺, 25% de cellules CD4⁺ et 10% de cellules CD8⁺. N=3. Student T-Test.

7.8.4 Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 au jour 21 dans le modèle murin B6.SJL

Nous avons analysé les différentes populations myéloïdes et lymphoïdes présentes dans la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 au jour 21 suivant l'injection sous-cutanée de cellules EL4 transformées shLuc et shTGF- β dans des souris B6.SJL. L'analyse des résultats n'a révélé aucune différence significative entre les populations de cellules des rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et les rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shTGF- β (Figure 29).

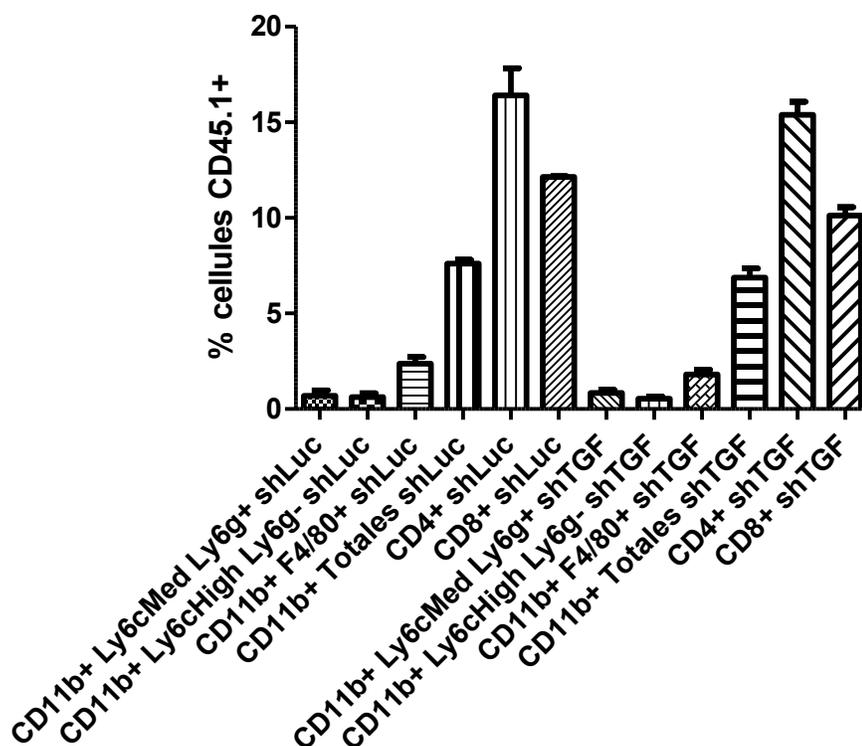


Figure 25 : Caractérisation des populations de cellules de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin B6.SJL.

Il n'y a aucune différence significative entre les populations des rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et des rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shTGF- β . Tumeur EL4 shLuc N=3. Tumeur EL4 shTGF- β N=4.

Globalement, nos expériences avec des cellules EL4 dont la production de TGF- β est réduite nous montrent que peu de changements dans l'infiltration cellulaire. Cette série d'expériences montre quelques résultats discordants par rapport aux études précédentes quant à la dominance des cellules CD11b⁺ dans l'infiltrat leucocytaire des tumeurs EL4 et la quantité de cellules F4/80⁺ témoignant de la difficulté d'extraire des cellules hématopoïétiques de tissus tumoraux. Ces études bien contrôlées permettent toutefois de suggérer que la quantité de TGF- β produites par les cellules cancéreuses a un impact sur l'infiltration par les cellules myéloïdes (Figure 27).

Nous savons que les cellules CD11b⁺ infiltrantes ne produisent pas beaucoup de TGF- β et que la réduction de la production de TGF- β par les cellules tumorales aurait un impact léger sur l'infiltration des cellules myéloïdes. Une autre source potentielle de TGF- β serait les lymphocytes T qui infiltrent aussi la tumeur [105]. Dans ce contexte, il est possible que le TGF- β produits par les lymphocytes T dans les tumeurs EL4-shLuc ou EL4-shTGF compensent en partie en produisant du TGF- β . Nous avons éliminé cette variable et examiné lors d'une expérience exploratoire comment se comportaient les cellules myéloïdes dans des souris RAG.B6.

7.8.5 Caractérisation des populations de la tumeur EL4 shLuc et EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin RAG.B6

Nous avons utilisé ce modèle murin RAG.B6 pour évaluer l'importance des lymphocytes dans la modulation du microenvironnement tumoral leucémique EL4 et évaluer l'effet, sur ce même microenvironnement, du «knockdown» de TGF- β dans nos cellules EL4. Nous avons observé une augmentation significative dans le pourcentage de cellules CD11b⁺/Ly6c^{Med}/Ly6g⁺ lors du «knockdown» du TGF- β . Nous n'avons observé aucune différence significative dans l'analyse des autres populations cellulaires (Figure 30). Les résultats obtenus dans les tumeurs ne correspondent pas à ce que nous avons obtenu dans la rate où les cellules Ly6g⁺ demeuraient dans les mêmes proportions alors que les proportions des populations Ly6c⁺ et F4/80⁺ variaient significativement.

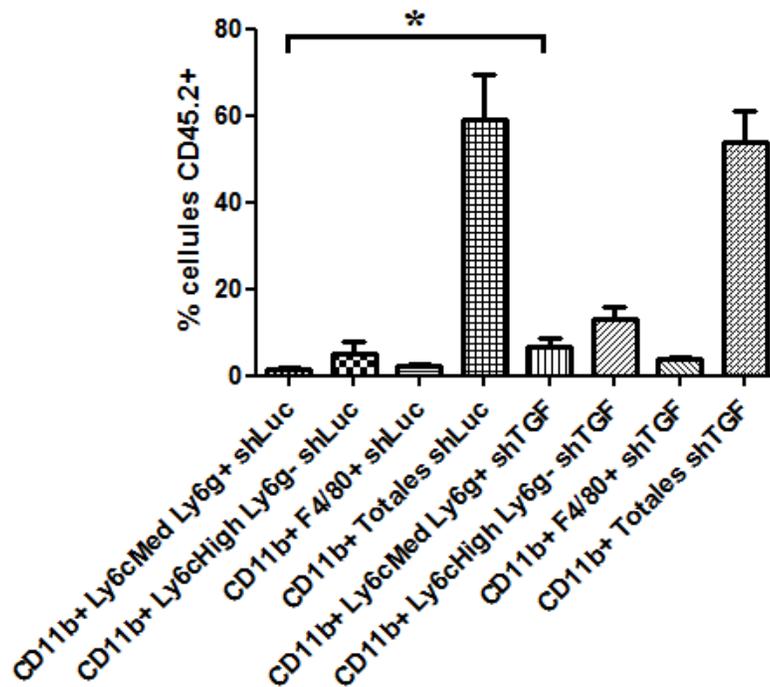


Figure 26 : Caractérisation des populations de la tumeur EL4 shLuc et EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin RAG.B6.

Augmentation significative dans le pourcentage de cellules CD11b⁺/Ly6c^{Med}/Ly6g⁺ lors du «knockdown» du TGF- β . Tumeur EL4 shLuc N=6. Tumeur EL4 shTGF- β N=8. *p<0.05 Student T-Test.

7.8.6 Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin RAG.B6

Afin de mieux comprendre si le TGF- β venant de la tumeur avait un impact sur le recrutement des différentes cellules myéloïdes, nous avons utilisé un modèle où les lymphocytes sont absents, parce que les lymphocytes font parties des cellules qui peuvent sécréter du TGF- β et d'autres médiateurs pouvant attirer les cellules myéloïdes.

La souris RAG.B6 est incapable de produire des lymphocytes, nous avons utilisé ce modèle murin pour évaluer l'importance des lymphocytes dans la régulation des populations myéloïdes présentes dans la rate des souris porteuses de tumeurs EL4 et évaluer l'effet, sur ces

populations, du «knockdown» de TGF- β dans nos cellules EL4. L'analyse a été faite sur le total de cellules CD45.2⁺ car les souris RAG.B6 sont CD45.2⁺, contrairement aux souris B6.SJL qui sont CD45.1⁺. Nous avons observé une baisse significative des populations CD11b⁺/Ly6C^{High} et CD11b⁺/F4/80⁺ dans les rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shTGF- β par rapport à ces mêmes populations dans les rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc. Nous n'avons observé aucune différence significative dans l'analyse des autres populations cellulaires (Figure 31).

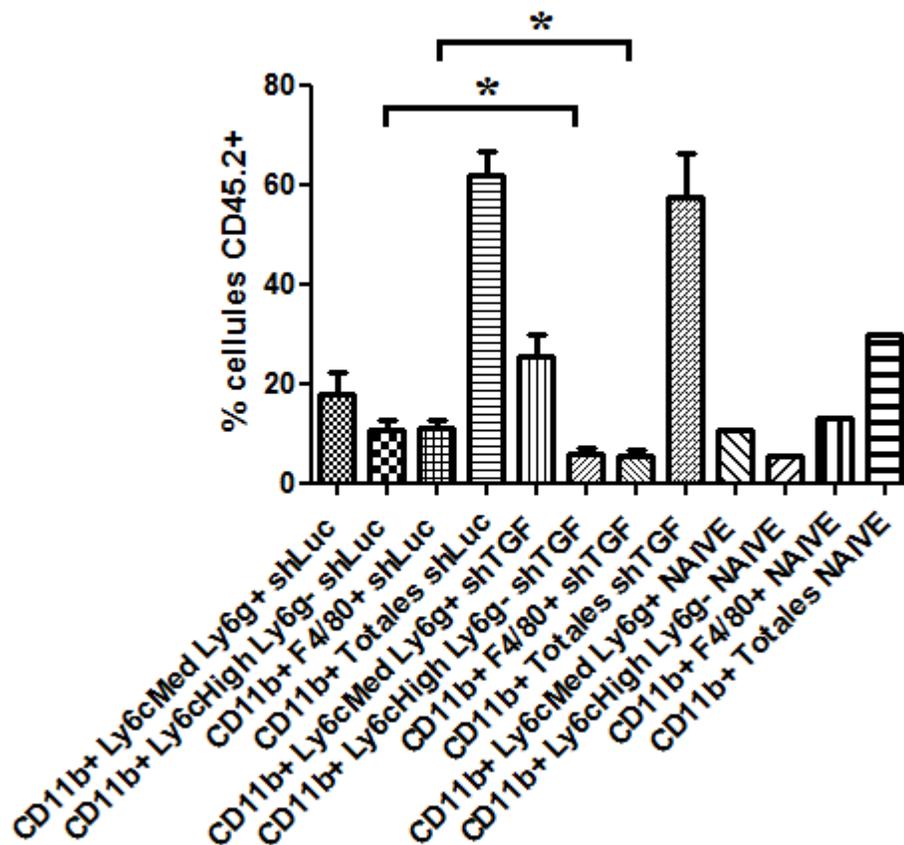


Figure 27 : Caractérisation des populations de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc et EL4 shTGF- β au jour 21 dans le modèle murin RAG.B6.

Baisse significative des populations CD11b⁺/Ly6C^{High} et CD11b⁺/F4/80⁺ dans les rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shTGF- β par rapport à ces mêmes populations dans les rates de souris porteuses de tumeurs EL4 shLuc. Tumeur EL4 shLuc N=6. Tumeur EL4 shTGF- β N=8. *p<0.05 Student T-Test.

Dans la souris B6.RAG, nos résultats indiquent que l'absence de lymphocytes T n'affecte pas l'infiltration par les cellules CD11b⁺ en général, mais influe sur les pourcentages de quelques types de cellules myéloïdes dans les tumeurs et les rates. Ces changements sont statistiquement significatifs, mais demeurent modestes.

7.9 Évaluation de la croissance des tumeurs

Dans cette portion de l'étude, afin de faire le lien entre la production de TGF- β par les cellules tumorales et la croissance de la tumeur nous avons mesuré la croissance des tumeurs EL4 shLuc et shTGF β évoluant dans nos deux modèles murins, B6.SJL et RAG.B6. Plus précisément, le but était de déterminer si le faible niveau d'expression TGF- β par les cellules EL4 shTGF- β avait un effet sur la croissance tumorale. Nous avons mesuré à différents temps le volume des tumeurs, dans chacune des conditions, au jour 8, 11, 13, 15 et 18. Une dernière mesure a été prise au jour 21 une fois les tumeurs retirées. Notre hypothèse était que la production de TGF- β faciliterait la croissance tumorale. La cinétique de croissance des tumeurs montre que les tumeurs ont tendance à croître plus rapidement lorsque la production de TGF- β par les cellules EL4 est réduite. L'absence de lymphocytes augmente également la capacité des cellules EL4 à croître plus rapidement (Figure 32). En effet, nous avons observé une différence significative dans le volume des tumeurs au jour 21 entre les tumeurs EL4 évoluant dans les souris B6.SJL et les tumeurs EL4 évoluant dans les souris RAG.B6 (Figure 33). Contrairement à notre hypothèse de départ, nous avons observé que les tumeurs avaient tendance à croître plus rapidement lorsque la production de TGF- β par les cellules EL4 était diminuée.

Contrairement à ce que nous avons proposé comme hypothèse, nous avons donc constaté que la réduction de la production de TGF- β n'altère pas l'infiltration et de façon toute aussi surprenante, elle semble accélérer la croissance tumorale.

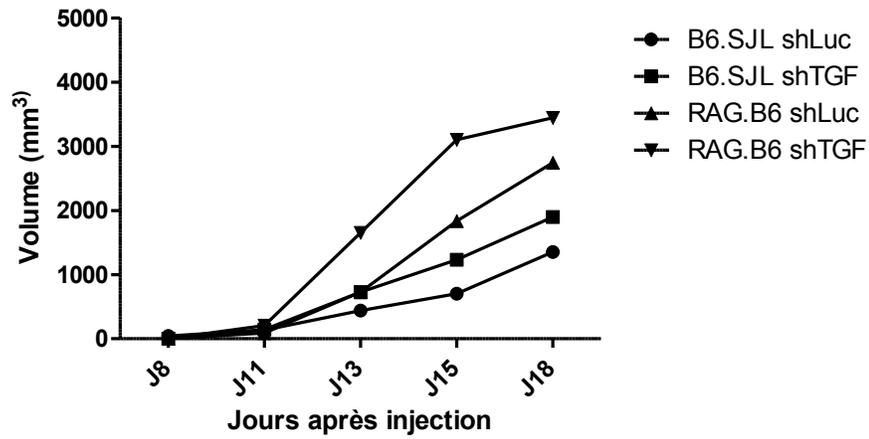


Figure 28 : Cinétique de croissance des tumeurs EL4 shLuc et shTGF- β dans les modèles murins B6.SJL et RAG.B6.

Les tumeurs ont tendance à croître plus rapidement lorsque la production de TGF- β des cellules EL4 est réduite et l'absence de lymphocytes augmente également la capacité des cellules EL4 à croître plus rapidement. N=2-4

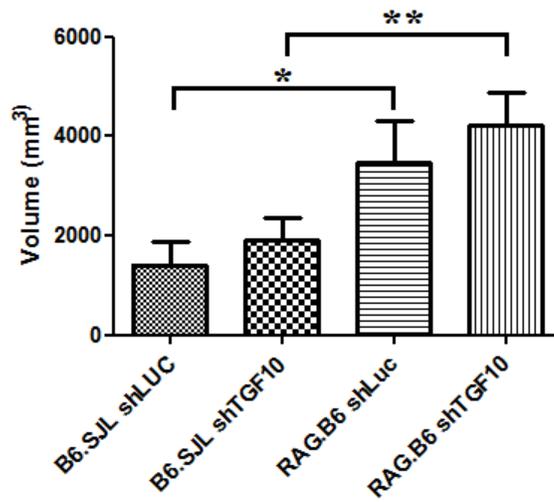


Figure 29 : Volume final au jour 21 des tumeurs EL4 shLuc et shTGF- β dans les modèles murins B6.SJL et RAG.B6.

Augmentation significative du volume des tumeurs EL4 shLuc RAG.B6 par rapport aux tumeurs EL4 shLuc B6.SJL et augmentation significative du volume des tumeurs EL4 shTGF- β RAG.B6 par rapport aux tumeurs EL4 shTGF- β B6.SJL. N=6 à 9. *p<0.05. **p<0.01 Student T-Test.

8. Discussion

Le microenvironnement tumoral leucémique est composé d'un ensemble complexe de cellules qui contribuent toutes par la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines qui crée un milieu propice à la croissance et à la prolifération des cellules néoplasiques. La caractérisation du microenvironnement est importante dans des contextes d'immunothérapies; le nombre de cellules infiltrantes, leurs fonctions, les médiateurs (TGF) qui contrôlent cette écologie et l'impact éventuel d'un blocage du TGF- β sur l'efficacité d'immunothérapies sont des primordiales données à acquérir [106].

L'importance du TGF- β dans la modulation du microenvironnement tumoral a déjà été démontré dans plusieurs modèles de cancers (poumon, intestin, etc) [107] [108] [109]. Les mécanismes par lesquels le TGF- β contribue à la prolifération des cellules tumorales sont multiples et influencent le devenir de plusieurs types cellulaires. Bien que son rôle est étudié depuis trois décennies dans un grand nombre de modèles tumoraux, son implication dans un contexte leucémique est encore peu caractérisé. La présente étude avait donc comme principal objectif de mieux comprendre l'influence de TGF- β dans le développement de tumeurs et plus spécifiquement dans un modèle de leucémie lymphoïde T [2].

Dans la première partie de l'étude, nous avons procédé à la caractérisation du modèle de leucémie lymphoïde T murine que nous voulions utiliser. Nos premières analyses ont révélé une dominance de l'infiltration de cellules myéloïdes (CD11b⁺) dans la phase précoce de la formation de tumeurs EL4 (tumeur 6 jours). Initialement, nous pensions devoir nous concentrer sur les populations lymphoïdes T qui dans plusieurs contextes semblent avoir été les principaux acteurs de la réponse anti-EL4 [97]. Bien que nos données en souris B6.RAG nous suggèrent qu'en effet, les lymphocytes T retardent la croissance tumorale, nous avons décidé de mieux définir l'infiltration par les cellules myéloïdes, le principal type de leucocytes qui envahit les masses tumorales EL4 au jour 21. La présence de cellules myéloïdes peut s'expliquer par le fait que nous avons introduit, dans nos souris, des cellules tumorales qui pouvaient engendrer une réponse immunitaire de l'hôte. En effet, dans ce contexte, puisque les (CD11b⁺), cellules myéloïdes de l'immunité innée représentent le premier type cellulaire du système immunitaire qui détecte les anomalies dans l'organisme, il nous apparaît normal de

les retrouver dans le microenvironnement précoce [29]. À cet effet, le fait d'avoir un modèle injectable implique nécessairement un traumatisme lors de l'inoculation. Ceci aurait pu amener un biais et un recrutement précoce de cellules myéloïdes détectant des signaux de danger [29]. Cependant, nous avons également observé que la proportion de cellules myéloïdes semble augmenter dans les tumeurs matures (tumeurs de 21 jours). Les tumeurs EL4 de 6 jours contiennent des cellules myéloïdes de phénotype MDSC (Ly6c⁺ et Ly6g⁺) et de macrophages et la proportion de ces types cellulaires est inchangée entre le microenvironnement de tumeurs précoces et celui de tumeurs matures. Les MDSC et les macrophages (particulièrement les M2) sont des cellules qui jouent un rôle dans l'immunosuppression et la réparation des tissus endommagés. Les résultats obtenus dans la présente étude suggèrent qu'un équilibre s'établit au cours du développement de la tumeur et que, après une certaine période de croissance, l'accumulation de ces cellules myéloïdes immunorégulatrices n'est plus nécessaire pour la division et à la survie des cellules tumorales [110]. Ce que nous suggérons c'est que lorsque l'immunosuppression est complète, donc que la tumeur devient invisible aux yeux du système immunitaire, le recrutement de cellules de phénotype MDSC devient inutile et est arrêté ou ralenti. Cet équilibre pourrait être la conséquence de la production par les MDSC et les M2 déjà présents, de cytokines et de chimiokines qui seraient suffisantes pour maintenir la croissance et la survie des cellules tumorales dans les tumeurs matures. Nous avons également observé une dominance significative de la proportion des cellules MDSC (Ly6c⁺) par rapport aux cellules MDSC (Ly6g⁺) et F4/80⁺ (M2) dans les tumeurs de 21 jours. Dans d'autres modèles de tumeurs, il a été démontré que ces deux sous-populations de MDSC utilisent des mécanismes suppressifs différents, les MDSC Ly6c⁺ (monocytiques) vont exprimer de hauts niveaux de NO et de bas niveaux de ROS, alors que les MDSC Ly6g⁺ (granulocytiques) vont exprimer de bas niveaux de NO et de hauts niveaux de ROS [111]. Ces deux populations vont être en mesure d'inhiber la prolifération des cellules T avec la même efficacité [111].

Les MDSC et les M2 contribuent à la prolifération cellulaire en produisant des cytokines et des facteurs de croissance dans d'autres modèles tumoraux. Les MDSC exercent une forte pression immunosuppressive sur les lymphocytes T alors que les M2 (qui sont aussi une fonction immunosuppressive) présents dans la tumeur vont produire de l'ornithine, de

l'EGF, du VEGF qui contribuent à la prolifération et à la survie des cellules tumorales [76] [72, 73]. TGF- β joue un rôle important dans le maintien et la survie de ces populations cellulaires. Il est raisonnable de croire qu'ils pourraient jouer le même rôle dans notre modèle de leucémie [76] [59]. L'analyse par microscopie à fluorescence nous a permis de montrer que les cellules myéloïdes CD11b⁺ se localisent majoritairement en périphérie de la tumeur et en périphérie de ce que nous croyons être des vaisseaux sanguins (visualisés en microscopie, à confirmer avec un marquage de CD31) qui irriguent la tumeur. Ce résultat suggère que dans notre modèle ces cellules se retrouveraient aux endroits les plus susceptibles de servir de porte d'entrée pour les cellules de l'immunité qui auraient pour rôle de cibler les cellules tumorales. Le rayon d'action des cellules myéloïdes immunosuppressives serait donc restreint (action paracrine, autocrine ou par contact cellule-cellule). Cette hypothèse est supporté par d'autres études qui ont montrées l'action paracrine et autocrine des médiateurs immunosuppresseurs des MDSC [112, 113].

L'analyse des populations myéloïdes des rates de souris ayant porté des tumeurs pendant 6 et 21 jours a permis d'évaluer l'effet systémique des tumeurs sur les populations myéloïdes. L'analyse des cellules présentes dans les rates de souris porteuses de tumeurs précoces n'a montré aucune différence significative avec les résultats obtenus suite à l'étude des rates de souris naïve (sans tumeur). Par contre, lorsque nous avons comparée les rates de souris porteuses de tumeurs précoces avec celles de souris porteuses de tumeurs matures, nous avons observé une augmentation significative dans la proportion de granulocytes Ly6g⁺ et Ly6c⁺ avec une dominance de cellules Ly6g⁺. Ces résultats suggèrent que la tumeur a un impact systémique sur les populations myéloïdes régulatrices [114]. Ces cellules sont reconnues pour produire un grand nombre de facteurs immunosuppresseurs, leur présence dans la rate, un organe lymphoïde important, suggère que l'immunosuppression n'est plus restreinte au microenvironnement tumoral, mais qu'elle deviendrait plutôt systémique. Ces facteurs devront être considérés lors d'élaboration d'immunothérapies.

Les lymphocytes T jouant un rôle important dans la réponse anti-tumorale, nous avons procédé à la caractérisation de l'infiltration des populations de lymphocytes Th (CD4⁺) et CTL (CD8⁺) dans les tumeurs. Nous avons observé une proportion importante de Th (~8%) et une faible proportion de CTL (~1%) dans les tumeurs précoces. Contrairement aux cellules

myéloïdes infiltrantes qui conservent leur proportion dans le temps, les proportions des $CD4^+$ et $CD8^+$ augmentent significativement dans les tumeurs matures (~20% et ~13% respectivement). Puisque nous n'avons pas fait de cinétique d'infiltration, il nous n'est pas possible de déterminer si les populations lymphoïdes, ainsi que les populations myéloïdes, atteignent un niveau de saturation dans les tumeurs matures. Au niveau de la rate de souris porteuses de tumeurs EL4, nous n'avons observé aucune différence significative dans la proportion de Th et de CTL. De plus, l'analyse du niveau d'infiltration par des lymphocytes T effecteurs (antigen-experienced) des lymphocytes (expression de CD43aag), nous a permis de montrer qu'autant au niveau des Th que des CTL, la proportion de cellules $CD43aag^+$ était beaucoup plus importante dans les tumeurs que dans les rates. Les CTL présents dans les tumeurs matures étaient significativement plus activées ($CD43aag^+$) que les CTL présents dans les tumeurs précoces. Les Th et les CTL activés ont comme fonction d'induire l'apoptose des cellules tumorales [115]. Cependant, il nous reste à déterminer si l'environnement tumoral n'affecte pas la fonction de ces cellules effectrices en induisant ou bien de l'anergie ou des déficits de sécrétion de cytokines ou de cytotoxicité. Nos résultats indiquent que, bien qu'un grand pourcentage de cellules Th et les CTL soient activées dans la tumeur, l'effet est insuffisant pour contrer la croissance des cellules leucémiques. Il serait intéressant de faire une cinétique de l'activation des cellules T dans ce modèle de leucémie afin de déterminer si la proportion et l'activation des Th et des CTL se stabilise dans le temps ou si elle atteint un maximum puis diminue (analyse des tumeurs à différents temps entre les jours 6 et 21). Les résultats de cette expérience pourraient nous permettre de déterminer si l'activation des Th et des CTL pourrait être en lien avec la progression de la tumeur. De plus, il reste à déterminer leurs rôles, car nous ignorons si ces cellules sont dans un état d'anergie ou de dysfonction.

La production de VEGF et de MMP9 par les cellules $CD11b^+$ de souris porteuses de tumeurs a déjà été observée dans un modèle de tumeur du poumon [116] [92] [117] [118] [119]. Nous avons analysé par qPCR l'expression de TGF- β , de VEGF et de MMP9 par les cellules $CD11b^+$ totales isolées de tumeurs EL4 et de rates de souris porteuses de tumeurs. Nous avons observé une faible expression de TGF- β dans la rate et dans la tumeur, une expression égale ou inférieure à celle de cellules $CD11b^+$ d'une rate de souris naïve. Ce résultat indique que ce ne sont pas ces cellules qui sont responsable de la production de TGF- β

dans ce modèle de leucémie. Nous avons confirmé ce résultat en microscopie à fluorescence où nous avons marqué des coupes de tumeurs avec un anticorps anti-LAP (TGF- β latent) et un anticorps anti-CD11b. Nous n'avons observé aucune colocalisation entre LAP et les cellules CD11b⁺. Par contre, nous avons observé une production importante de VEGF et de MMP9 par les cellules CD11b⁺ de rates de souris porteuses de tumeurs (~30 fois et ~1400 fois supérieure à la production des cellules CD11b⁺ de rate naïve, respectivement). La production de VEGF et de MMP9 des cellules CD11b⁺ de tumeurs EL4 était, quant à elle, moins marquée (~5 fois et ~4 fois supérieure à la production des cellules CD11b⁺ de rate naïve, respectivement). Nous appréhendons que la forte production de VEGF et de MMP9 provienne des cellules CD11b⁺ infiltrants la tumeur, il est possible que d'autres signaux provenant de la tumeur limitent l'expression de VEGF et de MMP9 par les cellules CD11b⁺ qui infiltrent la tumeur. Une autre hypothèse pour expliquer cette différence est d'ordre technique, il est difficile de déterminer la qualité des cellules post extraction et tri. Nous avons également tenté, sans succès, d'évaluer l'expression d'autres gènes d'intérêts (Arg1, iNOS, Nrp1, CXCR4).

Nous avons évalué les fonctions immunorégulatrices des cellules CD11b⁺ de rates de souris porteuses de tumeurs et de tumeurs EL4. Cette analyse portait sur la capacité de ces cellules à inhiber la prolifération des lymphocytes Th (CD4⁺) et CTL (CD8⁺) en culture. Nous n'avons observé aucun effet anti-prolifératif de ces cellules sur les populations de Th et de CTL. Il est probable que les cellules CD11b⁺ aient besoin de signaux d'autres cellules (tumoraux ou autres) pour exercer leurs fonctions immunorégulatrices, signaux qui seraient disponibles dans un microenvironnement tumoral «naturel» mais qui n'ont pas été produits ou ajoutés dans notre modèle expérimental. Nous avons mesuré qu'un seul paramètre et nous avons négligé d'autres facteurs tel que le relargage d'IFN γ et déterminer leur capacité à inhiber une réaction lymphoïde mixte auraient pu être fait [120].

Dans le but de mieux comprendre le rôle du TGF- β issu des cellules EL4 dans notre modèle de leucémie, nous avons transduit les cellules EL4 afin qu'elles produisent un shRNA-TGF- β . Cette transformation a entraîné une diminution de la production de TGF- β d'environ 50%. L'analyse comparative des populations lymphoïdes et myéloïdes infiltrants des tumeurs EL4 shTGF- β et des tumeurs EL4 shLuc (contrôle cellules EL4 transformées) de 6 jours n'a révélé aucune différence significative. Le même résultat a été observé dans les rates des souris

porteuses de ces tumeurs. Par contre, lors de l'analyse des tumeurs EL4 shLuc et EL4 shTGF- β matures (J+21), nous avons observé une différence significative dans la proportion de cellules CD11b⁺ totales ayant infiltré les tumeurs. Nos résultats permettent donc de suggérer que, dans notre système tumoral, le TGF- β a un rôle à jouer dans le recrutement, la rétention ou la survie des cellules CD11b⁺. TGF- β joue un rôle dans la transformation des cellules myéloïdes en cellules myéloïdes régulatrices (CD11b⁺), la diminution de l'expression de TGF- β a probablement diminuer la proportion de cellules myéloïdes régulatrices au profit des cellules myéloïdes effectrices. La manipulation de l'expression de TGF- β chez les cellules tumorales semble influencer la proportion de cellules myéloïdes infiltrantes, mais n'influe pas sur le pourcentage des sous populations CD11b⁺Ly6c^{med}Ly6g⁺, CD11b⁺Ly6c^{hi}Ly6g⁻ et CD11b⁺F4/80⁺. Comme la proportion de lymphocytes T reste inchangée, nous ne savons pas (dans le contexte de shRNA-TGF- β) quels autres types cellulaires sont responsables de la diminution de la proportion de cellules CD11b⁺ recrutées, il est probable qu'elles aient été remplacées par des cellules myéloïdes CD11b⁻.

Nous avons répété cette expérience dans un modèle de souris RAG.B6 (souris sans lymphocytes) pour avoir une idée globale du rôle des lymphocytes dans l'infiltration des populations myéloïdes. L'analyse des tumeurs EL4 shLuc et shTGF- β matures et des rates de ces souris porteuses de tumeurs a révélé une différence significative entre les proportions de MDSC (Ly6c⁺ et Ly6g⁺) dans les rates de souris porteuses de tumeurs et dans les tumeurs. En effet, nous avons observé une augmentation de la proportion de cellules Ly6g⁺ dans les tumeurs shTGF- β et une diminution de la proportion de cellules Ly6c⁺ et Ly6g⁺ dans les rates de souris porteuses de tumeurs shTGF- β . Ces résultats consolident l'idée proposée précédemment que TGF- β provenant de la tumeur a un rôle à jouer dans la régulation de l'infiltration des cellules myéloïdes au niveau de la tumeur et au niveau systémique [112]. Ce qui pourrait expliquer la tendance qu'ont les tumeurs à être plus volumineuses lorsque nous avons diminué la production de TGF- β , c'est-à-dire qu'il est possible qu'un plus grand nombre de cellules effectrices aient eu accès à la tumeur d'où sa plus grande taille.

Nous avons également comparé la vitesse de croissance des tumeurs shLuc et shTGF- β dans les modèles murins B6.SJL et RAG.B6. Comme nous l'avions anticipé, la croissance tumorale en absence de lymphocytes (souris RAG.B6) a été plus rapide que dans le modèle de

souris B6.SJL. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse présentée plus haut que les lymphocytes ralentissent la croissance tumorale sans être capable de l'éliminer. Cependant, contrairement à notre hypothèse qui stipulait que les tumeurs devraient croître plus lentement lors d'une diminution de la production de TGF- β puisque TGF- β est une cytokine immunosuppressive, nous avons observé que les tumeurs EL4 shTGF- β ont tendance à croître plus rapidement dans les deux modèles murins [121]. Il est possible que le TGF- β produit par les tumeurs agisse de façon autocrine comme suppresseur de tumeur ce qui pourrait expliquer la croissance plus rapide des tumeurs EL4 shTGF- β . Par contre, cet effet n'est pas visible en culture puisque les cellules EL4 shTGF- β vont croître à la même vitesse que les cellules EL4 shLuc (données antérieures à mon arrivée dans le laboratoire), cette différence pourrait être le résultat de l'interaction entre les cellules EL4 et les cellules du microenvironnement tumoral. Il est également possible que le «knockdown» de 50% ne soit pas suffisant pour voir le phénotype attendu.

9. Conclusion

Nos travaux sur la modulation du microenvironnement tumoral leucémique par la cytokine immunosuppressive TGF- β nous ont permis de caractériser son effet sur l'infiltration des populations lymphoïde et myéloïde dans un modèle de leucémie lymphoïde T, ainsi qu'au niveau systémique. Nous avons montré que la diminution de la production de TGF- β par les cellules leucémiques influence l'infiltration des cellules myéloïdes dans la tumeur. Nous avons aussi amélioré notre compréhension du modèle de leucémie EL4 en caractérisant les cellules qui infiltrent les tumeurs et l'activité de ces cellules. Ce modèle tumoral leucémique est utilisé par d'autres groupes de recherche qui travaillent sur le rôle de TGF- β dans la leucémie parce que les cellules EL4 produisent du TGF- β [2]. Il serait intéressant de poursuivre l'étude du rôle du TGF- β dans les tumeurs leucémiques en utilisant un autre modèle de cellules de leucémies T qui ne produisent pas ou peu de TGF- β . Cette comparaison pourrait permettre de mettre en évidence les caractéristiques des populations de cellules infiltrantes qui seraient dépendantes de la quantité de TGF- β produit par les cellules tumorales. Ces résultats sont en accord avec le fait qu'une thérapie anti-TGF- β n'est pas suffisante pour contrer la progression tumorale [122], car en diminuant la production de TGF- β nous avons modifié l'infiltration

cellulaire et non sa progression. Par contre, une thérapie de combinaison avec un anti-TGF- β et la chimiothérapie ou une immunothérapie pourrait améliorer les chances d'éliminer l'ensemble des cellules tumorales. Il a déjà été démontré qu'un traitement combinant la radiothérapie et l'anticorps anti-TGF- β améliore les chances de survie dans un modèle de cancer du sein murin [122, 123]. Il est raisonnable de croire que la combinaison de l'anti-TGF- β avec d'autres thérapies puisse également contribuer à éradiquer les cellules néoplasiques.

Nous avons déployé beaucoup d'efforts pour caractériser les populations myéloïdes (CD11b⁺) qui infiltraient les tumeurs et celles que l'on retrouvait dans la rate des souris porteuses de tumeur. Nous avons établi que, dans la tumeur, la majorité de ces cellules se retrouvaient en périphérie de la tumeur et en périphérie des vaisseaux sanguins. Pour poursuivre cette étude, il serait intéressant d'analyser les différents profils d'expression génique en fonction de la localisation de ces cellules myéloïdes. L'analyse microscopique des tumeurs ne nous a pas permis de différencier les différentes sous-populations myéloïdes infiltrantes. Cependant, la poursuite d'études par microscopie devrait permettre de localiser de façon spécifique les différents types cellulaires myéloïdes dans la tumeur et selon leur localisation il serait possible de mieux comprendre leurs fonctions.

Nous avons montré qu'il y a une différence importante dans les niveaux de transcrits de VEGF et de MMP9 entre les cellules myéloïdes qui infiltrent la tumeur et celles que l'on retrouve dans la rate des souris porteuses de tumeur. Nous avons également montré que dans les deux cas les niveaux de transcrits de VEGF et de MMP9 sont plus élevés que ceux des cellules myéloïdes de la rate d'une souris naïve. Il serait intéressant de découvrir le ou les processus par lesquels la tumeur induit la production de ces facteurs par les cellules myéloïdes au niveau systémique et, aussi, de déterminer l'impact sur la tumeur de cette surproduction de VEGF et de MMP9 au niveau systémique.

Bibliographie

1. Whiteside, T.L., *The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth*. *Oncogene*, 2008. **27**(45): p. 5904-12.
2. Yang, L., Y. Pang, and H.L. Moses, *TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression*. *Trends Immunol*, 2010. **31**(6): p. 220-7.
3. Mukherjee, S., *The emperor of all maladies : a biography of cancer*. Large print ed2010, Waterville, Me.: Thorndike Press.
4. Snyder, R., *Leukemia and benzene*. *Int J Environ Res Public Health*, 2012. **9**(8): p. 2875-93.
5. Wiemels, J., *Perspectives on the causes of childhood leukemia*. *Chem Biol Interact*, 2012. **196**(3): p. 59-67.
6. Mintzer, D.M., S.N. Billet, and L. Chmielewski, *Drug-induced hematologic syndromes*. *Adv Hematol*, 2009. **2009**: p. 495863.
7. Puumala, S.E., et al., *Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(5): p. 728-33.
8. Abdel-Wahab, O. and R.L. Levine, *Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2013. **121**(18): p. 3563-72.
9. Ferrara, F. and C.A. Schiffer, *Acute myeloid leukaemia in adults*. *Lancet*, 2013. **381**(9865): p. 484-95.
10. Bacher, U., S. Schnittger, and T. Haferlach, *Molecular genetics in acute myeloid leukemia*. *Curr Opin Oncol*, 2010. **22**(6): p. 646-55.
11. Chen, Y., et al., *Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia*. *Protein Cell*, 2010. **1**(2): p. 124-32.
12. Nowell, P.C. and D.A. Hungerford, *Chromosome studies in human leukemia. IV. Myeloproliferative syndrome and other atypical myeloid disorders*. *J Natl Cancer Inst*, 1962. **29**: p. 911-31.
13. Van Vlierberghe, P. and A. Ferrando, *The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(10): p. 3398-406.
14. Pui, C.H., L.L. Robison, and A.T. Look, *Acute lymphoblastic leukaemia*. *Lancet*, 2008. **371**(9617): p. 1030-43.
15. Mullighan, C.G., *Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(10): p. 3407-15.

16. Zhou, Y., et al., *Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia*. Hum Pathol, 2012. **43**(9): p. 1347-62.
17. Chiorazzi, N., K.R. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 804-15.
18. Rozman, C. and E. Montserrat, *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 1995. **333**(16): p. 1052-7.
19. Parmar, S., M. Fernandez-Vina, and M. de Lima, *Novel transplant strategies for generating graft-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia*. Curr Opin Hematol, 2011. **18**(2): p. 98-104.
20. Jabbour, E. and H. Kantarjian, *Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management*. Am J Hematol, 2012. **87**(11): p. 1037-45.
21. Mathisen, M.S., et al., *Acute lymphoblastic leukemia in adults: encouraging developments on the way to higher cure rates*. Leuk Lymphoma, 2013.
22. Portell, C.A. and J.W. Sweetenham, *Adult lymphoblastic lymphoma*. Cancer J, 2012. **18**(5): p. 432-8.
23. Oliansky, D.M., et al., *The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia: update of the 2006 evidence-based review*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(1): p. 16-7.
24. Sutton, L., et al., *Allogeneic bone marrow transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: factors predictive of transplant-related mortality and influence of total body irradiation modalities*. Bone Marrow Transplant, 1993. **12**(6): p. 583-9.
25. Woods, W.G., et al., *Bone marrow transplantation for acute lymphocytic leukemia utilizing total body irradiation followed by high doses of cytosine arabinoside: lack of superiority over cyclophosphamide-containing conditioning regimens*. Bone Marrow Transplant, 1990. **6**(1): p. 9-16.
26. Hallek, M., et al., *Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet, 2010. **376**(9747): p. 1164-74.
27. Rodriguez-Vicente, A.E., M.G. Diaz, and J.M. Hernandez-Rivas, *Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease*. Cancer Genet, 2013. **206**(3): p. 49-62.
28. Portell, C.A. and A.S. Advani, *Novel targeted therapies in acute lymphoblastic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2013.
29. Kindt, T.J., et al., *Kuby immunology*. 6th ed2007, New York: W.H. Freeman. xxii, 574, A-31, G-12, AN-27, I-27 p.
30. Kaymaz, B.T., et al., *Methylprednisolone induces apoptosis by interacting with the JAK/STAT pathway in HL-60 and K-562 leukemic cells*. Hematology, 2012. **17**(2): p. 93-9.

31. Anzano, M.A., et al., *Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells*. *Cancer Res*, 1982. **42**(11): p. 4776-8.
32. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues*. *Fed Proc*, 1983. **42**(9): p. 2621-6.
33. Sporn, M.B., *The early history of TGF-beta, and a brief glimpse of its future*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. **17**(1-2): p. 3-7.
34. Weiss, A. and L. Attisano, *The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2013. **2**(1): p. 47-63.
35. Harrison, C.A., S.L. Al-Musawi, and K.L. Walton, *Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-beta superfamily ligands*. *Growth Factors*, 2011. **29**(5): p. 174-86.
36. Vilar, J.M., R. Jansen, and C. Sander, *Signal processing in the TGF-beta superfamily ligand-receptor network*. *PLoS Comput Biol*, 2006. **2**(1): p. e3.
37. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. *Nature*, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
38. Shi, Y., et al., *A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4*. *Nature*, 1997. **388**(6637): p. 87-93.
39. Huse, M., et al., *Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12*. *Cell*, 1999. **96**(3): p. 425-36.
40. Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Smad transcription factors*. *Genes Dev*, 2005. **19**(23): p. 2783-810.
41. Nakao, A., et al., *Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling*. *Nature*, 1997. **389**(6651): p. 631-5.
42. Miyazono, K., *Positive and negative regulation of TGF-beta signaling*. *J Cell Sci*, 2000. **113** (Pt 7): p. 1101-9.
43. Rodriguez-Martinez, G. and I. Velasco, *Activin and TGF-beta effects on brain development and neural stem cells*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012. **11**(7): p. 844-55.
44. Lee, Y.S., et al., *Wound healing in development*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2012. **96**(3): p. 213-22.
45. Beyer, T.A., et al., *The TGFbeta superfamily in stem cell biology and early mammalian embryonic development*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1830**(2): p. 2268-79.
46. Brionne, T.C., et al., *Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain*. *Neuron*, 2003. **40**(6): p. 1133-45.
47. Gomes, F.C., O. Sousa Vde, and L. Romao, *Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development*. *Int J Dev Neurosci*, 2005. **23**(5): p. 413-24.

48. Challen, G.A., et al, *Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(3): p. 265-78.
49. Blank, U. and S. Karlsson, *The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematology*. Leukemia, 2011. **25**(9): p. 1379-88.
50. Wahl, S.M., J. Wen, and N. Moutsopoulos, *TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege*. Immunol Rev, 2006. **213**: p. 213-27.
51. Fijak, M. and A. Meinhart, *The testis in immune privilege*. Immunol Rev, 2006. **213**: p. 66-81.
52. Ziv, Y., et al, *Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood*. Nat Neurosci, 2006. **9**(2): p. 268-75.
53. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
54. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 264-75.
55. Ishigame, H., et al, *Truncated form of TGF-betaRII, but not its absence, induces memory CD8+ T cell expansion and lymphoproliferative disorder in mice*. J Immunol, 2013. **190**(12): p. 6340-50.
56. Schiemann, W.P., et al., *A deletion in the gene for transforming growth factor beta type I receptor abolishes growth regulation by transforming growth factor beta in a cutaneous T-cell lymphoma*. Blood, 1999. **94**(8): p. 2854-61.
57. Imai, Y., et al, *Mutations of the Smad4 gene in acute myelogenous leukemia and their functional implications in leukemogenesis*. Oncogene, 2001. **20**(1): p. 88-96.
58. Zhou, J., et al., *The role of the tumor microenvironment in hematological malignancies and implication for therapy*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 1581-96.
59. Kerkar, S.P. and N.P. Restifo, *Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment*. Cancer Res, 2012. **72**(13): p. 3125-30.
60. Murti, K.G., et al., *Molecular interactions between human B-cell progenitors and the bone marrow microenvironment*. Exp Cell Res, 1996. **226**(1): p. 47-58.
61. Zhang, J. and J. Liu, *Tumor stroma as targets for cancer therapy*. Pharmacol Ther, 2013. **137**(2): p. 200-15.
62. Schauer, I.G., et al., *Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer*. Neoplasia, 2011. **13**(5): p. 393-405.
63. 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.
64. Augsten, M., et al., *A digest on the role of the tumor microenvironment in gastrointestinal cancers*. Cancer Microenviron, 2010. **3**(1): p. 167-76.

65. Dvorak, H.F., et al., *Tumor microenvironment and progression*. J Surg Oncol, 2011. **103**(6): p. 468-74.
66. Antunes, I. and G. Kassiotis, *Suppression of innate immune pathology by regulatory T cells during Influenza A virus infection of immunodeficient mice*. J Virol, 2010. **84**(24): p. 12564-75.
67. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
68. Ohkura, N., Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi, *Development and maintenance of regulatory T cells*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 414-23.
69. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, *Natural versus adaptive regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 253-7.
70. Fehervari, Z. and S. Sakaguchi, *CD4+ Tregs and immune control*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1209-17.
71. Lechner, M.G., D.J. Liebertz, and A.L. Epstein, *Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2273-84.
72. Centuori, S.M., et al., *Myeloid-derived suppressor cells from tumor-bearing mice impair TGF-beta-induced differentiation of CD4+CD25+FoxP3+ Tregs from CD4+CD25-FoxP3- T cells*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(5): p. 987-97.
73. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(3): p. 237-45.
74. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-83.
75. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
76. Mills, C.D., *M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(6): p. 463-88.
77. Singh, S. and A.K. Gupta, *Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **67**(6): p. 1211-24.
78. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J, 1994. **298 (Pt 2)**: p. 249-58.
79. Tozer, G.M., V.E. Prise, and D.J. Chaplin, *Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective reduction in tumor blood flow that is reversible with L-arginine*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 948-55.

80. Ishii, Y., et al., *Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines*. Int J Cancer, 2003. **103**(2): p. 161-8.
81. Tanese, K., E.A. Grimm, and S. Ekmekcioglu, *The role of melanoma tumor-derived nitric oxide in the tumor inflammatory microenvironment: its impact on the chemokine expression profile, including suppression of CXCL10*. Int J Cancer, 2012. **131**(4): p. 891-901.
82. Talmadge, J.E., *Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(18 Pt 1): p. 5243-8.
83. Bronte, V., et al., *L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 302-6.
84. Ochoa, J.B., et al., *Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2001. **25**(1): p. 23-9.
85. Soker, S., et al., *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell, 1998. **92**(6): p. 735-45.
86. Pellet-Many, C., et al., *Neuropilins: structure, function and role in disease*. Biochem J, 2008. **411**(2): p. 211-26.
87. Glinka, Y., et al., *Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta*. Carcinogenesis, 2011. **32**(4): p. 613-21.
88. Domanska, U.M., et al., *A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide*. Eur J Cancer, 2013. **49**(1): p. 219-30.
89. 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.
90. Scheller, J. and S. Rose-John, *Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside*. Med Microbiol Immunol, 2006. **195**(4): p. 173-83.
91. Weidle, U.H., et al., *Interleukin 6/interleukin 6 receptor interaction and its role as a therapeutic target for treatment of cachexia and cancer*. Cancer Genomics Proteomics, 2010. **7**(6): p. 287-302.
92. Claesson-Welsh, L. and M. Welsh, *VEGFA and tumour angiogenesis*. J Intern Med, 2013. **273**(2): p. 114-27.
93. Saif, M.W., *Is there a benefit from addiction to anti-VEGF therapy in patients with colorectal cancer?* Anticancer Res, 2013. **33**(6): p. 2377-80.
94. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.

95. Xia, Y., R.N. Lu, and J. Li, *Angiogenic factors in chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Res*, 2012. **36**(10): p. 1211-7.
96. Kamiguti, A.S., et al., *The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2004. **125**(2): p. 128-40.
97. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells*. *Nat Med*, 2001. **7**(10): p. 1118-22.
98. Delisle, J.S., et al., *Graft-versus-host disease causes failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis in interferon-gamma receptor-deficient hosts*. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 2111-9.
99. Gudmundsdottir, H., A.D. Wells, and L.A. Turka, *Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity*. *J Immunol*, 1999. **162**(9): p. 5212-23.
100. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
101. Rodriguez, D., et al., *Tumor microenvironment profoundly modifies functional status of macrophages: Peritoneal and tumor-associated macrophages are two very different subpopulations*. *Cell Immunol*, 2013. **283**(1-2): p. 51-60.
102. Liao, W., J.X. Lin, and W.J. Leonard, *Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy*. *Immunity*, 2013. **38**(1): p. 13-25.
103. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta in T-cell biology*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(1): p. 46-53.
104. Itman, C., et al., *All in the family: TGF-beta family action in testis development*. *Reproduction*, 2006. **132**(2): p. 233-46.
105. Li, M.O. and R.A. Flavell, *TGF-beta: a master of all T cell trades*. *Cell*, 2008. **134**(3): p. 392-404.
106. Sanjabi, S. and R.A. Flavell, *Overcoming the hurdles in using mouse genetic models that block TGF-beta signaling*. *J Immunol Methods*, 2010. **353**(1-2): p. 111-4.
107. Fernandez, I.E. and O. Eickelberg, *The impact of TGF-beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers*. *Proc Am Thorac Soc*, 2012. **9**(3): p. 111-6.
108. Drabsch, Y. and P. ten Dijke, *TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2012. **31**(3-4): p. 553-68.
109. Mishra, L., et al., *The role of TGF-beta and Wnt signaling in gastrointestinal stem cells and cancer*. *Oncogene*, 2005. **24**(37): p. 5775-89.
110. Swann, J.B. and M.J. Smyth, *Immune surveillance of tumors*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(5): p. 1137-46.
111. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 162-74.

112. Sevko, A. and V. Umansky, *Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: thick as thieves.* J Cancer, 2013. **4**(1): p. 3-11.
113. Majka, M., et al., *Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner.* Blood, 2001. **97**(10): p. 3075-85.
114. Lengagne, R., et al., *T cells contribute to tumor progression by favoring pro-tumoral properties of intra-tumoral myeloid cells in a mouse model for spontaneous melanoma.* PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20235.
115. Weigelin, B., M. Krause, and P. Friedl, *Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment.* Immunol Lett, 2011. **138**(1): p. 19-21.
116. Yan, H.H., et al., *Gr-1+CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung.* Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6139-49.
117. Tartour, E., et al., *Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy.* Cancer Metastasis Rev, 2011. **30**(1): p. 83-95.
118. Finke, J., et al., *MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy.* Int Immunopharmacol, 2011. **11**(7): p. 856-61.
119. Galdiero, M.R., et al., *Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer.* Immunobiology, 2013. **218**(11): p. 1402-10.
120. Mundy-Bosse, B.L., et al., *Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice.* Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5101-10.
121. Gaspar, N.J., et al., *Inhibition of transforming growth factor beta signaling reduces pancreatic adenocarcinoma growth and invasiveness.* Mol Pharmacol, 2007. **72**(1): p. 152-61.
122. Connolly, E.C., J. Freimuth, and R.J. Akhurst, *Complexities of TGF-beta targeted cancer therapy.* Int J Biol Sci, 2012. **8**(7): p. 964-78.
123. Zhang, M., et al., *Blockade of TGF-beta signaling by the TGFbetaR-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma.* Cancer Res, 2011. **71**(23): p. 7155-67.