

Rôle du TLR7 dans la progression tumorale et le développement des métastases du Cancer du Poumon

Cristina Iribarren Osinaga

▶ **To cite this version:**

Cristina Iribarren Osinaga. Rôle du TLR7 dans la progression tumorale et le développement des métastases du Cancer du Poumon . Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01472979

HAL Id: hal-01472979
https://ephe.hal.science/hal-01472979

Submitted on 21 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté

Par

Cristina Iribarren Osinaga

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE :

Rôle du TLR7 dans la progression tumorale et le développement des métastases du Cancer du Poumon

Soutenu le 11 mars 2016 devant le jury suivant :

Sophie Thenet – Président

Magali Terme – Rapporteur

Catherine Sautes-Fridman – Examinateur

Marie Wislez– Examinateur

Sophie Gad-Lapiteau – Tuteur pédagogique

Isabelle Cremer – Tuteur scientifique

Mémoire préparé sous la direction de :
Isabelle CREMER
Laboratoire : Centre de Recherches des Cordeliers, UMRS 1138
Directeurs : Isabelle CREMER et Jean-Luc TEILLAUD

Et de :
Sophie GAD-LAPITEAU
Laboratoire : Génétique Oncologique EPHE
Directeur : Stéphane RICHARD

Remerciements

Je voulais tout d'abord remercier les Professeurs Hervé FRIDMAN et Catherine FRIDMAN de m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherche des Cordeliers, et permis d'effectuer mon Diplôme de l'EPHE au sein de leur unité dans des conditions idéales.

Je remercie le Dr Jean-Luc TEILLAUD et le Pr Isabelle CREMER de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 13. Isabelle, merci de m'avoir acceptée comme étudiante dans le projet « TLR7 et Cancer du Poumon ». Merci pour ta confiance et patience au cours de ces années au laboratoire, mais surtout au début de ce diplôme lors de mes difficultés expérimentales.

Je veux également remercier Sophie GAD-LAPITEAU d'avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique tout au long de mes études. Merci pour votre exigence lors de la correction de ce mémoire pour qu'il soit quasi-parfait et pour votre aide avec toutes les démarches administratives que j'ai dû faire durant ces quatre années.

Aux filles du bureau, Hanane, Samantha et Mélanie. Hanane merci d'avoir répondu à tous mes appels au secours et messages de panique indépendamment de l'heure ou jour de la semaine, pour ces voyages européens et de m'avoir tranquillisée ces derniers mois avec un « on est large Kris… ». Sam, merci de ne pas me faire sentir la seule désorganisée et tête en l'air du bureau et pour ton aide et gentillesse tout ce temps qu'on a été voisines. Mélanie, « maitia », merci pour tout le temps que tu as mis dans ce mémoire pour qu'il soit compréhensible pour les autres, ainsi que pour les corrections de mes devoirs. Les petits déjeuners sans toi vont être très difficiles. Merci boîte de mouchoirs du monoprix pour ton soutien dans les moments les plus critiques de ce diplôme.

Marion, « petit Grinch », merci pour ton amitié, pour ton soutien au laboratoire et dehors de notre deuxième chez nous. Pour ces discussions scientifiques et de m'avoir appris autant de choses, comme, par exemple, que les souris pouvaient voler même si elles n'ont pas d'ailes. Grâce à ta folie et ta bonne humeur les grosses journées ont été moins difficiles. Merci de m'avoir montré la recette pour l'énergie illimitée : Cappuccino + Kiwi. On a une phrase en espagnol « todo se pega menos la hermosura » (on prend tout de l'autre sauf la beauté) et je dois dire que jusqu'à ce que je te rencontre ma santé mentale n'était pas si grave.

Je veux aussi remercier Nathalie JUPITER pour son aide avec les lames et ses cafés du matin. D'avoir été toujours si adorable. Bénédicte, Tictic, merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Grâce à toi j'ai un vocabulaire de mode française, et qui sait, peut-être un jour je deviendrai une « vrai fille ».

Aux garçons, Benoît, Rémi et Nicolas. A Benoît de s'être occupé si bien d'Ulysse pendant que j'étais en manipe et de son aide technique. Rémi merci de t'être occupé de mes petites folles pendant que j'étais en cours et d'avoir supporté ma méchanceté toujours avec un sourire. Bonne chance pour ton diplôme! Nicolas, piolin, merci pour ton aide avec les logiciels, ton soutien quand les manipes marchaient pas et pour ta bonne humeur de tous les jours.

Merci à Pauline, Jérôme, Laetitia, Claire et à tous les membres des équipes 10, 13 et 15 pour votre aide et gentillesse au cours de ces années au laboratoire.

Un grand merci à Guido KROEMER, Laurence ZITVOGEL et le petit Ulysse de m'avoir donné une si grande opportunité, de m'avoir fait sentir pas loin de chez moi et pour tous ces discussions et conseils scientifiques.

Je tiens enfin à remercier ma famille et mes amis de m'avoir toujours soutenue et de m'avoir encouragée à continuer mes études. Merci Aita pour ta théorie de Flemming pour me remonter le moral dans les moments les plus difficiles.

Sommaire

Liste des figures **11**
Liste des tableaux **12**
1. INTRODUCTION **13**
1.1. Le cancer du poumon *13*
1.1.1. Les poumons 13
1.1.2. Epidémiologie et étiologie du cancer pulmonaire 14
1.1.3. Classification des cancers du poumon 15
1.1.4. Traitements du cancer du poumon 18
1.1.4.1. Chirurgie 18
1.1.4.2. Radiothérapie 18
1.1.4.3. Chimiothérapie 19
1.1.4.4. Thérapies ciblées 20
1.2. Le microenvironnement tumoral *21*
1.2.1. La cellule cancéreuse 21
1.2.1.1. Maintien des signaux de prolifération 21
1.2.1.2. Echappement aux suppresseurs de la croissance 21
1.2.1.3. Résistance à la mort cellulaire 21
1.2.1.4. Immortalité réplicative 22
1.2.1.5. Induction de l'angiogenèse 22
1.2.1.6. Echappement au système immunitaire 22
1.2.1.7. Reprogrammation du métabolisme énergétique 22
1.2.1.8. Mutations et instabilité génétique 23
1.2.1.9. Inflammation pro-tumorale 23
1.2.1.10. Invasion et métastases 23
1.2.2. Système immunitaire et cancer 24
1.2.2.1. Elimination 24
1.2.2.2. Equilibre 25
1.2.2.3. Echappement 26
1.2.4. Récepteurs Toll-like (TLRs) et cancer 27
1.2.4.1. Récepteurs Toll-like 27
1.2.4.2. TLRs et cancer 31
1.3. Le développement des métastases *34*
1.3.1. La formation des métastases 34
1.3.2. Le système immunitaire et les métastases 37
1.3.3. Rôle des TLRs dans le développement des métastases 39
2. OBJECTIFS **41**
2.1. L'étude du rôle de TLR7 dans la progression tumorale et des effets thérapeutiques de l'antagoniste IRS661 ..... *41*
2.2. Déterminer si la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales a un pro-métastatique *42*

3. MATERIEL ET METHODES 44
3.1. Lignées cellulaires 44
3.1.1. Transfection des cellules LLC 44
3.2. Animaux utilisés 45
3.3. Réactifs : agonistes et antagonistes de TLR7, et chimiothérapie 46
3.4. Etude de la progression tumorale et du rôle thérapeutique 46
3.4.1. Effets d'agoniste de TLR7 sur la progression tumorale chez les souris C57BL/6 et TLR7 KO…… 47
3.4.2. Effets de l'antagoniste de TLR7 IRS661 sur la progression tumorale chez les C57BL/6 et NOD/SCID 47
3.5. Etude de l'apparition des métastases par imagerie in vivo 48
3.6. Détection des métastases pulmonaires par coloration 49
3.7. Effet de la déplétion des MDSC sur la formation des métastases 50
3.8. Etude de l'expression du gène CCR4 par RT-PCR quantitative en temps réel 52
3.9. Marquage par immunohistochimie d'E-cadhérine 54
3.10. Analyses statistiques 56
4. RESULTATS 57
4.1. Effet pro-tumoral de la stimulation de TLR7 57
4.1.1. Rôle de TLR7 exprimé par les cellules tumorales et les cellules immunitaires de l'hôte…… 57
4.1.2. Etude de l'effet anti-tumoral d'un antagoniste de TLR7 58
4.1.2.1. Effet prophylactique de l'IRS661 58
4.1.2.2. Effet thérapeutique de l'IRS661 59
4.2. Impact de TLR7 dans la survenue des métastases 60
4.2.1. Détection *in vivo* des métastases 60
4.2.1.1. Effet pro-métastatique de TLR7 dans un modèle de souris NOD/SCID 60
4.2.1.2. Implication de TLR7 de l'hôte dans le développement de métastases 63
4.2.1.3. Implication des MDSC dans la formation des métastases 64
4.2.2. Mécanismes impliqués dans le développement des métastases 67
4.2.2.1. Etude par immunohistochimie de l'expression de l'E-cadhérine 67
4.2.2.2. Etude du rôle des récepteurs aux chimiokines 68
5. CONCLUSION ET DISCUSSION 70
5.1. Validation de l'effet pro-tumoral de TLR7 dans un modèle murin 72
5.2. Rôle pro-métastatique de TLR7 73
5.3. Stratégie thérapeutique de l'utilisation d'un antagoniste de TLR7 77
6. PERSPECTIVES 78
6.1. Rôle pro-tumoral de TLR7 exprimé par les cellules tumorales. 78

6.2. Etude du rôle de TLR7 dans le développement et la progression de CPNPC sur un modèle de tumeurs spontanées 79

6.3. Les ligands endogènes de TLR7 80

6.4. Mécanisme d'action de l'antagoniste de TLR7 81

6.5. TLR7 et le développement des métastases 82

7. BIBLIOGRAPHIE 84

8. ANNEXES 90

8.1. ANNEXE 1: Dual roles of TLR7 in the lung cancer microenvironment 90

8.2. ANNEXE 2: - Trial Watch - Immunostimulation with Toll-like receptor agonists in cancer therapy 90

8.3. ANNEXE 3: TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. 90

8.4. ANNEXE 4: Calreticulin is a powerful prognostic marker for survival of non-small-cell lung cancer patients and is required for an efficient immune microenvironment contexture. 90

A

ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AP-1	Activator protein 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénine Tri Phosphate

B

Bax	Bcl-2–associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BSA	Bovine Serum Albumine

C

Cas9	CRISPR associated protein 9
CCRx	C-C chemokine receptors
CD	Cluster of Differentiation
cDC	Conventional Dendritic Cells
c-IAP1	Cellular inhibitor of apoptosis protein-1
ClSPL	Cisplatine
Cl	Chlore
CMV	Cytomégalovirus
CO_2	Carbon dioxide
CpG	Cytosine phosphodiester Guanine
CPNPC	Cancers du Poumon Non à Petites Cellules
CPPC	Cancers du Poumon à Petites Cellules
CRC	Centre de Recherche des Cordeliers
CRISPR	Clustered Regularly Interspersed Palindromic Repeats
CSF-2	Colony stimulating factor 2
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCLx	C-X-C chemokine

D

DAB	Diaminobenzidine
DAMP	Damaged-Associated Molecular Patterns
DC	Dendritic Cell
DMEM	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
DMEM F-12	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium F-12
dNTP	Désoxyribonucléotides

E

EDTA	Ethylène-diamine-tétra-acétate
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor

F

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAM	5-Carboxyfluorescein
Fc	Fraction crystalisable

G

Gr1	Granzyme B

H

H_3N	Hydronitric acid
HEK	Human Embryonic Kidney
Hepes	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HLA	human leukocyte antigen
HMGB1	High Mobility Group Box-1
HRP	Horse Radish Peroxydase
HSP	Heat shock proteins

I

IFN	Interferon
IKK	I kappa B kinase
IL-x	Interleukine-x
iNOS	Nitric Oxide Synthase
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon Regulatory transcription Factor
IRS	Immunoregulatory sequence
IVIS	*In Vivo* Imaging System
IκB	Inhibitor of NF-κB

J

J	Jours
JNK	c-Jun N-terminal kinases

K

KO	Knock-Out

L

LLC	Lewis Lung Carcinoma
LOXO	Loxoribine

LPS	Lipopolysaccharides
LRR	Leucine-Rich Repeat
Luc	Luciferase
M	
M1	Macrophage de type 1
M2	Macrophage de type 2
MAPK	Mitogen-associated protein kinase
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
miARN	Micro-ARN
MMP	Métalloprotéases matricielles
MPO	Myéloperoxydase
MYD88	Myeloid Differentiation Factor 88
N	
NF-κB	Nuclear factor κB
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
NOD/SCID	Non Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficient
O	
O	Oxygène
ODN	Oligonucleotide
P	
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed Cell Death 1
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
PE	PhycoErythrin
PRR	Pattern Recognition Receptors
Pt	Platine
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
R	
RIN	RNA Integrity Number
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
S	
SEAP	Secreted embryonic alkaline phosphatase

STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SV40	Virus simien 40
SVF	Sérum de Veau Fœtal

T

TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TAM	Tumor associated macrophages
TBK	TANK-Binding Kinase 1
TBS	Tris Buffer Saline
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Th1	T helper 1
TIR	Toll-IL1 Receptor
TIRAP	TIR- domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TIRF-related adaptor molecule
Treg	T régulateur
TRIF	TIR-domain-containing adaptor inducing interferon β

V

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

W

WT	Wild Type

Liste des figures

Figure 1 : Structure des poumons……13
Figure 2 : Différents facteurs associés au développement d'un cancer du poumon……14
Figure 3 : Structure du cisplatine et du carboplatine……18
Figure 4 : Caractéristiques des cellules tumorales……23
Figure 5 : Théorie des trois E : Développement tumoral en trois phases d'après Dunn et al.25
Figure 6 : Structure des récepteurs Toll-like……27
Figure 7 : Récepteurs Toll-Like et voies de signalisation……29
Figure 8 : Développement des métastases……34
Figure 9 : Cellules leucocytaires impliquées dans le développement des métastases……38
Figure 10 : Plasmide pGL4.50[luc/CMV/Hygro]……44
Figure 11 : Schéma des expériences réalisées *in vivo*……47
Figure 12 : Principe de la détection des métastases par bioluminescence……48
Figure 13 : Détection des métastases par coloration des poumons……49
Figure 14 : Effet pro-tumoral du CL264 chez les souris sauvages et déficientes en TLR7……57
Figure 15 : La combinaison agoniste-antagoniste du récepteur TLR7 a un effet anti-tumoral *in vivo*……58
Figure 16 : L'administration tardive d'IRS661 inhibe l'effet pro-tumoral de l'agoniste de TLR7 chez les souris C57BL/6……59
Figure 17 : La stimulation de TLR7 augmente le développement des métastases……61
Figure 18 : L'administration de CL264 augmente la formation de métastases chez les souris WT……63
Figure 19 : La déplétion de MDSC diminue le développement des métastases induites par TLR7……65
Figure 20 : Expression de l'E-cadhérine chez les patients atteints de CPNPC……67
Figure 21 : Expression de CCR4 sur la lignée LLC_luc……68
Figure 22 : Schéma d'action de TLR7 dans la progression tumorale……70
Figure 23 : Schéma de l'implication des MDSC dans le développement des métastases après stimulation de TLR7……71

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification TNM du cancer du poumon non à petites cellules d'après Goldstraw……16

Tableau 2 : TLRs et ligands……..28

Tableau 3 : Processus de la transition épithélio-mésenchymateuse……35

Tableau 4 : Composition de la cohorte de 18 patients atteints de CPNPC……54

1. INTRODUCTION

J'ai réalisé mon diplôme des Sciences de la Vie et de la Terre au sein du Centre de Recherche des Cordeliers (CRC) dans l'équipe « Cancer et Immunité anti-tumorale » sous la supervision du Pr Isabelle Cremer. Différents projets de recherche sont menés dans cette équipe, comme l'étude de la densité et de la fonctionnalité des cellules Natural Killer (NK) dans le cancer du poumon. Un deuxième projet d'études porte sur l'implication de l'expression du récepteur « Toll-Like », TLR7, et de son impact sur le déclenchement de la survie des cellules tumorales, la progression tumorale et sur la résistance à la chimiothérapie.

A mon arrivée au laboratoire, mon équipe avait démontré que TLR7 et TLR8 sont exprimés par des lignées de cancer du poumon et par les cellules tumorales chez 70% des patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules. Une augmentation de la prolifération des cellules tumorales ainsi qu'une résistance à la chimiothérapie ont également été observées *in vitro* lorsque TLR7 est stimulé. Ces résultats ont été validés *in vivo* chez des souris immunocompétentes et immunodéprimées. Une augmentation de l'expression de l'ARNm codant CCR4, un récepteur aux chimiokines, a été observée *in vitro* lorsque les cellules sont stimulées par un agoniste de TLR7.

Avant de vous détailler les résultats obtenus durant mon stage, je vais en premier lieu vous introduire mon sujet d'études en vous présentant le cancer du poumon, l'implication du système immunitaire dans le cancer, les récepteurs Toll-like (TLR) et le développement des métastases, ainsi que les différentes techniques que j'ai utilisées.

1.1. Le cancer du poumon

1.1.1. Les poumons

Les poumons constituent l'organe principal du système respiratoire et ont comme fonction les échanges gazeux entre le sang et l'air. Ils sont composés d'un ensemble de bronches et bronchioles, qui aboutissent dans des petites cavités appelées alvéoles (*Figure 1*). Ils sont situés à l'intérieur de la cage thoracique, posés sur le diaphragme. Ces organes sont recouverts d'une membrane appelée plèvre et sont composés du poumon droit et du poumon gauche. Le poumon droit est divisé en trois lobes alors que le poumon gauche est divisé en deux lobes *(Figure 1) (National Cancer Institute, 2014).*

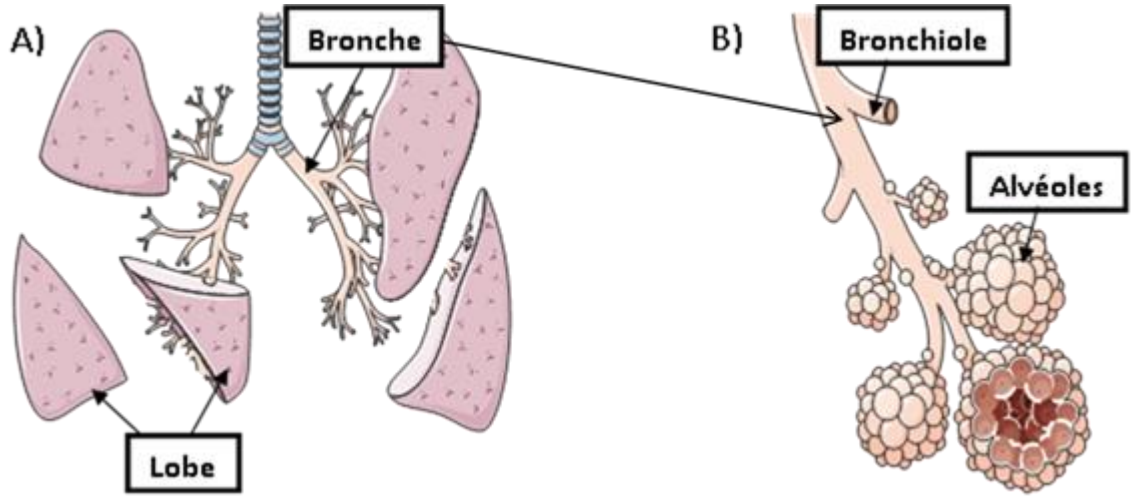


Figure 1 : Structure des poumons. (*adapté à partir de medicalart)*
A/ Poumon droit et gauche avec leurs lobes et bronches.
B/ Structure d'une bronche avec ses bronchioles et alvéoles.

1.1.2. Epidémiologie et étiologie du cancer pulmonaire

En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer du poumon dans le monde a été estimé à 1,8 million, ce qui représente 12,9% du nombre total de patients atteints de cancer du poumon. Ce cancer est la cause d'environ 1,59 million de morts par an, ce qui en fait la première cause de décès par cancer au niveau mondial (*GLOBOCAN IARC, 2012*).

La principale étiologie de ce cancer est le tabac. Les composants nocifs de la fumée de cigarettes induisent des lésions au niveau cellulaire *(Figure 2)*. Il existe ainsi une forte relation entre le risque de développer la maladie, la durée d'exposition à la fumée de cigarettes et la quantité de cigarettes fumées *(National Cancer Institute, 2014).*

L'exposition à la pollution de l'air est aussi une des causes de ce type de cancer *(Figure 2)* et est responsable en Europe de 11% des cancers du poumon. En effet, la pollution augmente le risque de développer un cancer chez les fumeurs, ainsi que chez les personnes qui sont exposées à des substances telles que l'amiante et le nickel, notamment sur leurs lieux de travail *(Molina et al., 2008).*

En plus de ces facteurs externes, des mutations dans certains gènes sont impliquées dans le développement de cancers du poumon. Par exemple, la présence d'une mutation T790M

dans la protéine Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) a été observée dans les familles où le cancer du poumon est fréquent *(Gazdar et al., 2014)*.

Plusieurs altérations génétiques pouvant conduire à une tumeur pulmonaire ont été décrites et divers oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs ont pu être caractérisés :

- l'activation du proto-oncogène *KRAS* par mutation ponctuelle est observée dans 15 à 27% des adénocarcinomes bronchiques.

- les oncogènes de la famille *MYC* sont surexprimés dans les cancers pulmonaires.

- les gènes suppresseurs de tumeurs *TP53* et *RB* sont mutés ou inactivés dans les cancers bronchiques.

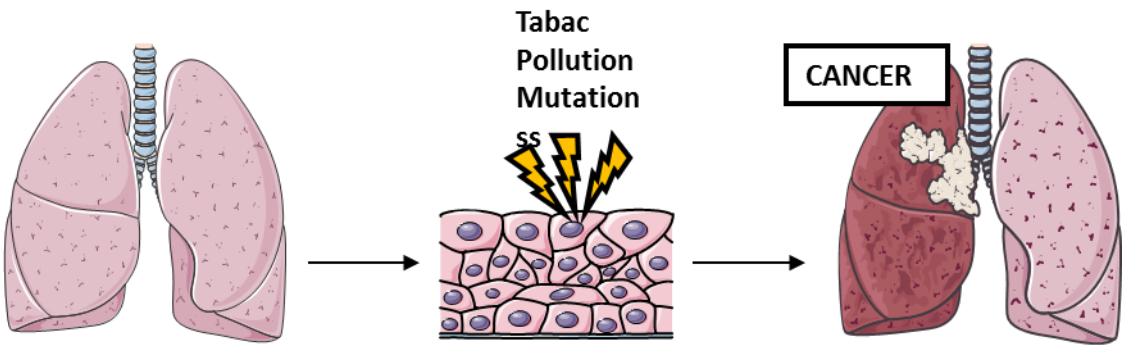


Figure 2 : Différents facteurs associés au développement d'un cancer du poumon.
Le tabac, l'exposition à des polluants et/ou les mutations génétiques peuvent conduire au développement du cancer du poumon (*adapté à partir de medicalart)*.

1.1.3. Classification des cancers du poumon

Les cancers du poumon sont classés selon la morphologie des cellules qui composent la tumeur. Ils sont regroupés en deux grandes catégories : les Cancers du Poumon à Petites Cellules (CPPC) et les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules (CPNPC). Alors que 13% des cancers du poumon sont des CPPC, les CPNPC représentent environ 87% de ces cancers. Les CPNPC sont des cancers à dissémination plus lente que les CPPC et peuvent être différenciés au niveau histologique en carcinomes épidermoïdes, adénocarcinomes et carcinomes à grandes cellules *(National Cancer Institute, 2014)*.

Afin d'établir le pronostic et d'adapter les protocoles thérapeutiques, une classification TNM selon l'envahissement aux ganglions (N), la taille de la tumeur (T), ainsi que la formation de métastases (M) (*Tableau 1*) a été établie *(National Cancer Institute, 2014, Goldstraw et al., 2007; Molina et al., 2008).*

STADE	TUMEUR	GANGLION	METASTASES	DESCRIPTION
Stade IA	T1a, b	N0	M0	Tumeur inférieure à 2cm (T1a) ou entre 2 et 3 cm (T1b), sans évidence bronchoscopique d'invasion plus proximale que la bronche lobaire
Stade IB	T2a	N0	M0	Tumeur entre 3 et 5 cm de diamètre ou tumeur caractérisée par : une atteinte de la bronche souche à 2 cm ou plus, ou de la carène (zone correspondant à la division de la trachée en ses deux bronches principales), et/ou une invasion de la plèvre viscérale, et/ou la présence d'une atélectasie (pathologie de l'appareil respiratoire) ou d'une pneumopathie obstructive (blocage du passage de l'air) s'étendant à la région hilaire (zone où les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques, les bronches et les nerfs entrent ou sortent du poumon) sans atteindre l'ensemble du poumon (T2a)
Stage IIA	T1a, b T2a T2b	N1 N0 N1	M0 M0 M0	Tumeur entre 5 et 7 cm de diamètre ou tumeur caractérisée par : une atteinte de la bronche souche à 2 cm ou plus, ou de la carène, et/ou une invasion de la plèvre viscérale, et/ou la présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilaire sans atteindre l'ensemble du poumon (T2b) Métastase dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux, y compris par envahissement direct (N1)
Stade IIB	T2b T3	N1 N0	M0 M0	Tumeur de plus de 7 cm ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris la tumeur de Pancoast, tumeur située dans la région supérieure du thorax), le diaphragme, le nerf phrénique (nerf qui descend le long du thorax jusqu'au diaphragme), la plèvre médiastinale (membrane qui recouvre les poumons), pleurale ou pariétale ou le péricarde (membrane qui entoure le cœur) ; ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir ; ou associée à une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive du poumon entier ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe (T3)
Stade IIIA	T1, T2 T3 T4	N2 N1, N2 N0, N1	M0 M0 M0	Tumeur de toute taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, cœur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébral, carène ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint (T4) Métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux et/ou sous-carinaires (N2)
Stade IIIB	T4 Tout T	N2 N3	M M0	Métastases dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ou hilaires controlatéraux, scalènes (muscles profonds du cou) ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou contralatéraux (N3)
Stade IV	Tout T	Tout N	M1a,b	Nodule(s) tumoral (-aux) distinct(s) dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural malin (ou péricarde) (M1a) Métastases à distance (M1b)

Tableau 1 : Classification TNM de cancer du poumon non à petites cellules d'après Goldstraw (*Goldstraw et al., 2007).*

1.1.4. Traitements du cancer du poumon

Pour préciser le diagnostic du cancer du poumon, il faut déterminer l'extension de la tumeur, ainsi que vérifier la fonctionnalité des poumons. Ceci va permettre de savoir quel traitement sera le plus adapté au patient. Selon la classification TNM, le patient va recevoir un traitement différent.

Après avoir établi un diagnostic grâce au bilan des tests réalisés, les patients vont suivre un ou plusieurs types de traitements, tels que la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et/ou une immunothérapie ciblée.

1.1.4.1. Chirurgie

Lorsqu'elle est possible, la chirurgie est la solution la plus adaptée dans le CPNPC. Pour cela, la résection de la tumeur doit être possible et le patient doit être dans les conditions adéquates pour supporter une intervention chirurgicale. Pour les tumeurs T0 et T1, c'est-à-dire ayant une taille inférieure à 3 centimètres, la chirurgie est l'indication majeure et consiste en une ablation d'une partie du poumon (lobectomie) ou de tout le poumon (pneumectomie). Lorsque les tumeurs ont une taille correspondant à un stade T2 avec des métastases au niveau des ganglions lymphatiques, la chirurgie sera effectuée après un traitement par chimiothérapie, traitement utilisé pour réduire la taille de la tumeur et aider à son prélèvement. Dès que la tumeur est à un stade III ou IV, la chirurgie n'est plus possible car c'est un traitement trop lourd pour le patient *(National Cancer Institute, 2014 ; La ligue contre le Cancer, 2009).*

1.1.4.2. Radiothérapie

La radiothérapie, ou thérapie par radiation, est une technique qui utilise des rayons à haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses. Ce type de traitement agit seulement sur les cellules qui se trouvent dans la zone d'exposition aux rayons *(National Cancer Institute, 2014; La ligue contre le Cancer, 2009).*

1.1.4.3. Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'utilisation de produits pharmacologiques pour détruire les cellules malignes du cancer et est un élément essentiel dans le traitement du CPNPC. Cependant, ces produits, administrés par voie intraveineuse, vont circuler dans le sang et affecter d'autres cellules du patient. Dans ce type de traitement, une combinaison de deux types de drogues est utilisée : les sels de platine (cisplatine ou carboplatine) et les chimiothérapies de troisième génération, telles que le taxotère, la navelbine ou la gemcitabine *(Molina et al 2008, National Cancer Institute, 2014).*

Le cisplatine et le carboplatine sont des agents anticancéreux alkylants. Ces agents font des liaisons interbrins covalentes au niveau de l'ADN, lesquelles vont empêcher la réplication de l'ADN et la transcription de l'ADN en ARN. En 1970, le cisplatine (dichloro-diamino-*cis*-platinium II) était déjà utilisé comme traitement des cancers génito-urinaires. Le cisplatine est un complexe qui se fixe sélectivement sur les bases puriques de l'ADN (A ou G) et induit une variation de la conformation locale du double brin d'ADN. Cette interaction va être stable grâce à une liaison hydrogène. Ce mécanisme d'action de cette drogue va aboutir au déroulement et au raccourcissement de l'hélice d'ADN. Le carboplatine est un analogue du cisplatine ayant le même mécanisme d'action (*Figure 3) (Clive P Page, 1999*).

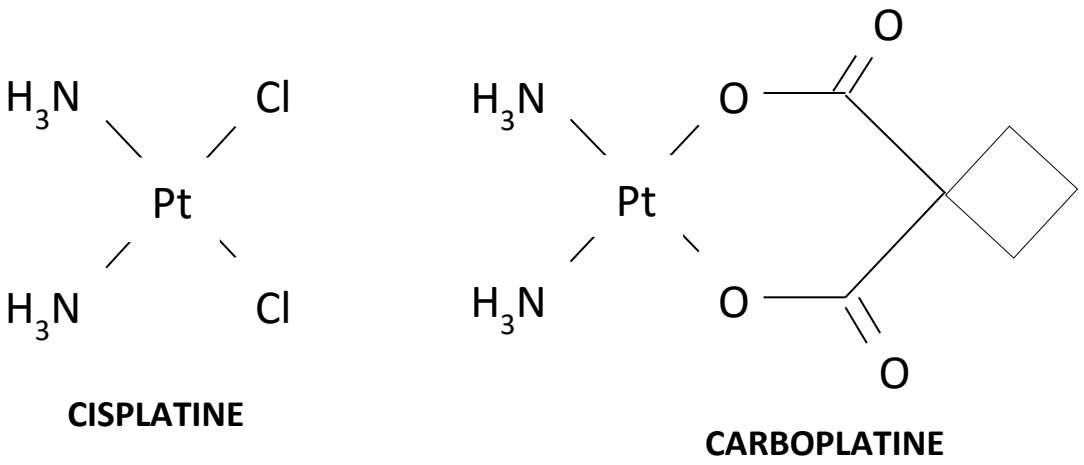


Figure 3 : Structure du cisplatine et du carboplatine. *(Oncoprof, 2011)*

1.1.4.4. Thérapies ciblées

La surexpression de certains gènes, ainsi que des variations dans leurs séquences jouent un rôle important dans la modification de voies de signalisations et de régulations cellulaires. Cela peut donc induire des altérations de l'angiogenèse, de l'apoptose et de la prolifération cellulaire lorsque, par exemple, les récepteurs à activité tyrosine kinase sont affectés.

Par exemple, la surexpression du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) est observée chez les patients atteints de CPNPC, et est liée à un mauvais pronostic. Des petites molécules ou des anticorps monoclonaux ont été développés pour inhiber l'action de ce récepteur, tels que le géfitinib et l'erlotinib. Ces inhibiteurs de tyrosine kinase vont s'insérer sur le site réservé à la fixation de l'ATP sur les récepteurs à l'EGF (Endothelial Growth Factor). Ainsi, ils vont bloquer l'activation du récepteur et empêcher la transduction de ce signal, ce qui va agir sur la prolifération cellulaire *(Molina et al., 2008; Okon et al., 2015).* Malgré les effets anti-tumoraux de ces molécules, le développement d'une résistance à ces inhibiteurs a été observé. Cette résistance peut être due à des mutations génétiques, ainsi qu'à des dérégulations des processus cellulaires comme des altérations métaboliques. En 2015, l'équipe d'Okon a montré que le traitement chronique par le géfitinib induisait une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une dysfonction mitochondriale dans le cancer du poumon, ainsi qu'une résistance à cette molécule *(Okon et al., 2015)*.

Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est un facteur de croissance qui va se lier à son récepteur, le VEGFR. Cette liaison sur les cellules endothéliales va promouvoir l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire et va ainsi favoriser la croissance tumorale. Le Bevacuzimab est un anticorps monoclonal anti-VEGFR, il inhibe ainsi la croissance anormale des vaisseaux sanguins *(Liu et al., 2015)*.

Les protéines impliquées dans les points de contrôle immunitaire («immune checkpoints ») comme le PD-1 («Programmed Cell Death 1») et CTLA-4 (« Cytotoxic T-lymphocyte Antigen - 4 ») sont des molécules impliquées dans la suppression d'une immunité anti-tumorale. Ainsi, ils vont conférer une capacité immunosuppressive au microenvironnement tumoral. L'inhibition de ces molécules par des anticorps, tels que l'ipilimumab qui est un anticorps anti-CLTA-4 ou le nivolumab et le pembrolizumab qui sont des anticorps dirigés contre PD-1,

a montré un effet anti-tumoral supérieur aux traitements conventionnels *(Adachi and Tamada, 2015).*

1.2. Le microenvironnement tumoral

1.2.1. La cellule cancéreuse

La transformation d'un cellule normale en cellule tumorale est due à l'acquisition par cette dernière de propriétés caractéristiques des tumeurs (*Figure 4) (Hanahan and Weinberg, 2011).*

1.2.1.1. Maintien des signaux de prolifération

L'une des capacités fondamentales des cellules cancéreuses est leur habilité à maintenir une prolifération chronique. Alors que le tissu normal contrôle la production des facteurs de croissance et les signaux de prolifération, le tissu néoplasique, quant à lui, parvient à le déréguler. En effet, ce tissu malin va acquérir la capacité de maintenir cette prolifération active grâce à la production de facteurs de croissance spécifiques pour leurs récepteurs. Celle-ci va donc être activée de façon autocrine. La surexpression de récepteurs à la surface des cellules tumorales va également aider au maintien de cet état de prolifération.

1.2.1.2. Echappement aux suppresseurs de la croissance

Les gènes suppresseurs de tumeur, comme celui muté dans le rétinoblastome et la protéine p53, vont agir de manière négative sur la prolifération des cellules malignes, en induisant leur sénescence ou apoptose. Ainsi, ils vont empêcher la formation des tissus néoplasiques. Les cellules tumorales vont donc également avoir la capacité d'inactiver ces gènes.

1.2.1.3. Résistance à la mort cellulaire

L'apoptose est considérée comme l'un des systèmes naturels pour empêcher le développement des cancers. Ce type de mort cellulaire programmée peut être induit par un stress physiologique au cours de la tumorigénèse ainsi que par les drogues anticancéreuses, telles que les chimiothérapies. Le mécanisme d'action de résistance à l'apoptose est

coordonné par l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, et par la diminution de protéines pro-apoptotiques, comme par exemple, Bax.

1.2.1.4. Immortalité réplicative

Afin de développer des tumeurs macroscopiques, les cellules néoplasiques doivent avoir la capacité de se répliquer de manière illimitée. En effet, les cellules normales ont une capacité de division limitée. Lors des divisions, la longueur des télomères va se raccourcir, ce qui détermine cette capacité. Une fois qu'elles ont atteint cette limite, deux processus entrent en jeu : la sénescence ou l'apoptose. La réplication illimitée des cellules tumorales est liée aux télomères, qui vont protéger la terminaison des chromosomes. Dans les cellules tumorales, la télomérase a été montrée comme étant plus fonctionnelle et maintient ainsi le potentiel de division de ces cellules en empêchant le raccourcissement des télomères.

1.2.1.5. Induction de l'angiogenèse

Grâce à la néovascularisation, les tissus tumoraux vont pouvoir recevoir les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur maintien. Elle va également permettre l'évacuation des déchets métaboliques et du dioxyde de carbone.

1.2.1.6. Echappement au système immunitaire

La majorité des tumeurs développées dans un organisme sont éliminées grâce au système immunitaire. Il a été démontré que chez les souris immunodéficientes en lymphocytes cytotoxiques CD8+, en cellules NK ou en lymphocytes CD4+ Th1, le développement des tumeurs était plus fréquent que chez les souris sauvages. L'immuno-évasion va ainsi être la cause du développement de cancers puisque les cellules tumorales échappent à la surveillance des cellules immunitaires.

1.2.1.7. Reprogrammation du métabolisme énergétique

La prolifération massive des cellules implique également une dérégulation au niveau du métabolisme pour que les cellules acquièrent l'énergie suffisante pour proliférer. Ainsi, les cellules tumorales vont utiliser la glycolyse pour leur production d'ATP au lieu de la phosphorylation oxydative utilisée habituellement pour la croissance cellulaire.

1.2.1.8. Mutations et instabilité génétique

L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur peut être due à une mutation héréditaire ou des événements mutationnels somatiques, mais cette inhibition peut également être acquise de façon épigénétique, c'est-à-dire, par des mécanismes tels que la méthylation de l'ADN ou les modifications affectant les histones. La plupart de ces modifications sont détectées et réparées normalement par la cellule, mais lorsque ces différents types de mutations sont présents, les cellules vont acquérir des caractéristiques tumorales.

1.2.1.9. Inflammation pro-tumorale

Les cellules du système immunitaire inné et adaptatif vont s'infiltrer dans la tumeur. Une forte infiltration de ces cellules va induire un effet anti-tumoral, alors qu'une inflammation chronique peut aider au développement de la maladie. Lors de l'inflammation, des facteurs de croissance, des facteurs angiogéniques et des enzymes pour modifier la matrice extracellulaire sont secrétés afin de favoriser la progression tumorale.

1.2.1.10. Invasion et métastases

La cellule tumorale va acquérir également la capacité de se détacher des cellules voisines ainsi que de la matrice extracellulaire. La modification de l'expression d'une molécule appelée E-cadhérine va jouer un rôle majeur dans ce processus. La diminution d'expression de cette protéine et l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine vont être liées à la perte de contact entre les cellules, et ce qui va donc favoriser la formation des métastases. La dégradation de la matrice extracellulaire par des enzymes va aider à la libération des cellules tumorales dans leur environnement.

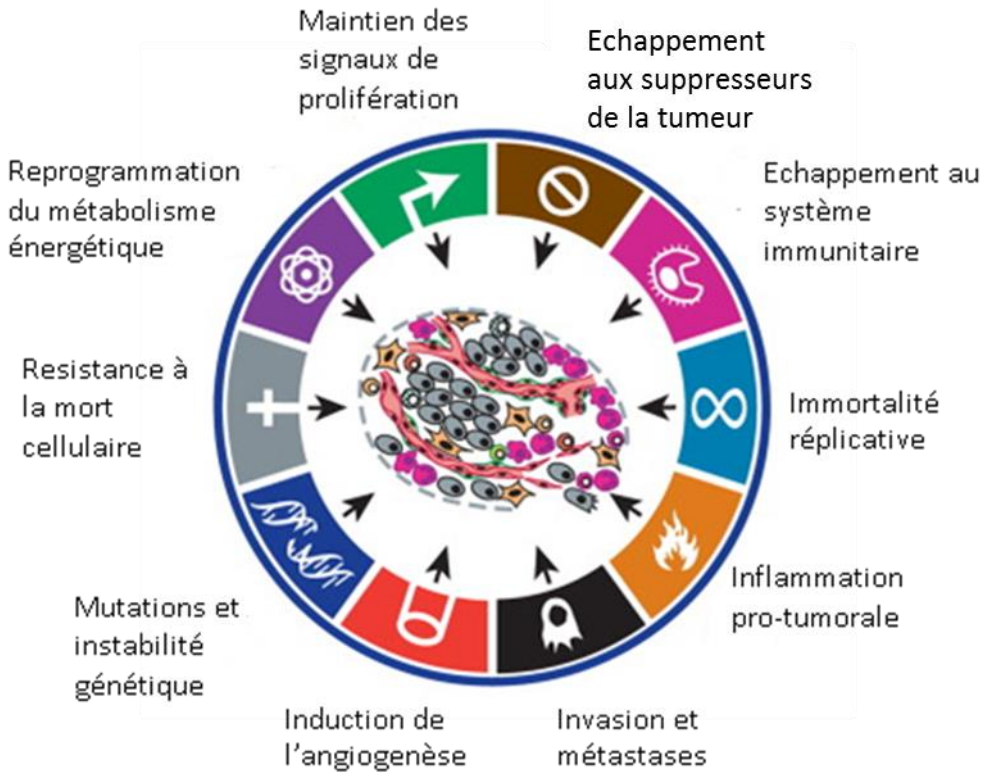


Figure 4 : Caractéristiques des cellules tumorales. *(Hanahan and Weinberg, 2011*)
Dix propriétés caractéristiques des cellules cancéreuses.

1.2.2. Système immunitaire et cancer

La tumeur est composée non seulement de cellules tumorales mais aussi de cellules stromales (cellules de phénotype fibroblastique qui assurent à la fois la nutrition et un soutien structural), d'un ensemble de vaisseaux et de cellules immunitaires. De plus, il est connu que le système immunitaire joue un rôle dans le contrôle de la progression tumorale. C'est de cette observation qu'est né le concept d'immunosurveillance. Il a été observé que l'immunité innée et adaptative, en plus d'avoir la capacité de protéger l'hôte du développement d'une tumeur, peuvent aussi modifier ou sculpter l'immunogénicité du cancer. Ce processus d'immunoédition est composé de trois phases, connu comme la « théorie des trois E : Elimination, Equilibre et Echappement » *(Dunn et al., 2004).*

1.2.2.1. Elimination

Cette étape est la première de l'immunoédition. Les cellules tumorales vont être éliminées grâce aux composants immunitaires *(Figure 5A).* Ce processus commence lorsque les cellules

tumorales et le remodelage du stroma sont reconnus par les cellules du système immunitaire inné. En effet, les changements produits dans le stroma et les cellules tumorales induisent la production de molécules pro-inflammatoires et de chimiokines, ce qui va permettre cette reconnaissance par le système immunitaire. Les cellules immunitaires répondant à ce signal de danger sont les cellules NK, les cellules NKT, les lymphocytes T et/ou les macrophages.

Une fois que les cellules du système immunitaire inné ont reconnu le site de la tumeur, elles vont secréter d'autres molécules, tels que l'interféron (IFN) γ et l'interleukine (IL) 12 pour amplifier la réponse des cellules immunitaires innées. Les cellules dendritiques (DC) acquièrent les antigènes tumoraux après avoir phagocyté les cellules tumorales mourantes. Une fois activées, les DC migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles vont induire l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+. Ainsi, le système immunitaire adaptatif va être activé et les cellules tumorales pourront être reconnues et éliminées. En 2008, l'équipe de Dieu-Nosjean a démontré la présence de structures lymphoïdes tertiaires dans le stroma des tumeurs pulmonaires. Il s'agit de formations ectopiques lymphocytaires que l'on peut retrouver dans les tissus enflammés, infectés ou tumoraux. Ces structures ont été associées à un bon pronostic pour la survie des patients atteints de CPNPC *(Dieu-Nosjean et al., 2008; Dunn et al., 2004)*. Une augmentation de la densité en lymphocytes CD8+ et CD4+ est également corrélée à un bon pronostic selon le type de cancer. Il a été observé que les souris déficientes en lymphocytes T sont plus susceptibles de développer des tumeurs *(Shankaran et al., 2001).*

1.2.2.2. Equilibre

Dans cette phase, le système immunitaire et leurs produits de sécrétion, comme les lymphocytes et l'IFN-γ, vont continuer à éliminer les cellules tumorales. En revanche, les cellules tumorales qui se trouvent au sein de la tumeur vont être plus sensibles à l'acquisition de nouvelles mutations dues à l'instabilité chromosomique et l'excision nucléotidique, ce qui va leur permettre de proliférer dans un microenvironnement immunocompétent *(Figure 5B).* On considère alors que la tumeur se trouve dans un état de « dormance ». C'est pour cela que cette phase d'équilibre est la phase la plus longue de l'immunoédition *(Dunn et al., 2004)*.

1.2.2.3. Echappement

C'est la dernière phase de l'immunoédition. Les cellules tumorales échappent au système immunitaire et des clones de cellules tumorales résistantes peuvent proliférer dans le microenvironnement immunitaire de la tumeur *(Figure 5C)*. Les cellules tumorales peuvent empêcher une réponse anti-tumorale de façon directe ou indirecte, en secrétant des cytokines immunosuppressives, telles que le Transforming Growth Factor (TGF) β ou l'IL-10, ainsi qu'en induisant un recrutement des cellules immunosuppressives comme les lymphocytes T régulateurs et/ou les cellules suppressives dérivées myéloïdes (MDSC). Ces cellules cancéreuses peuvent également modifier l'expression de leurs molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, l'expression des molécules anti-apoptotiques et/ou développer une insensibilité aux cytokines *(Dunn et al., 2004).*

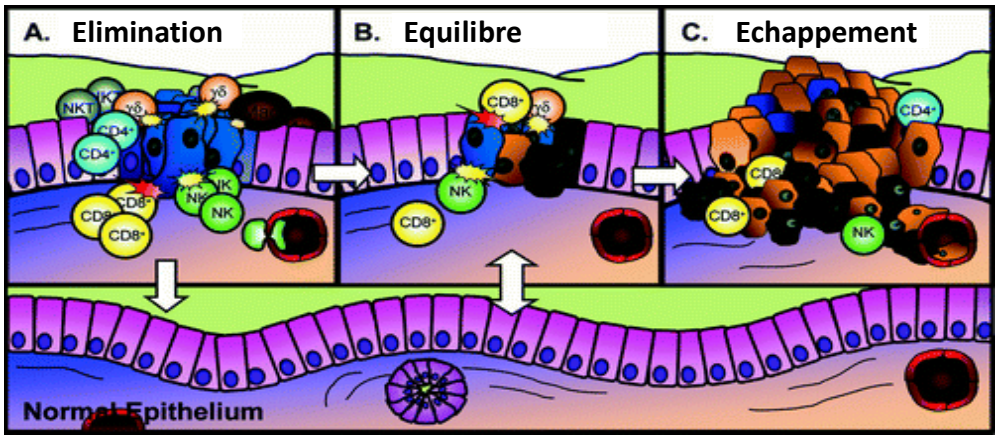


Figure 5 : Théorie des trois E : Développement tumoral en trois phases d'après Dunn et al. *(Dunn et al., 2004)*
A/ Elimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire.
B/ Equilibre entre les cellules immunitaires et la tumeur.
C/ Echappement des cellules tumorales à la reconnaissance et à l'attaque par les cellules du système immunitaire.

1.2.3. Inflammation et cancer

Au 19ème siècle, Roudolf Virchow observait la présence des leucocytes au sein de la tumeur. Ceci indiquait qu'il existait un possible lien entre l'inflammation et la progression tumorale. Il émettait l'hypothèse que les sites où il y avait une inflammation chronique étaient les sites d'origine du cancer. Lorsque les cellules tumorales sont dans un environnement riche en

cellules inflammatoires, en facteurs de croissance, en présence d'agents causants des dommages à l'ADN et d'un stroma actif, le risque de développer une tumeur augmente *(Coussens and Werb, 2002; Grivennikov et al., 2010).*

Le microenvironnement inflammatoire de la tumeur se caractérise par la présence des cellules du système immunitaire capables de produire des molécules pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF-α. Les cellules du système immunitaire inné (les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK et les MDSC) et les lymphocytes T et B vont interagir entre elles grâce à la production des chimiokines et ou de cytokines. Cela peut avoir à la fois un rôle anti-tumoral, en tuant les cellules cancéreuses, et un rôle pro-tumoral, en sécrétant des facteurs de croissance ou pro-angiogéniques *(Grivennikov et al., 2010).*

Les molécules pro-inflammatoires peuvent être sécrétées par les cellules tumorales et les leucocytes. Ces molécules peuvent contribuer à la progression des tumeurs. Le Tumor Necrosis Factor (TNF) α est une cytokine ayant un rôle majeur dans l'inflammation. Il est impliqué dans l'activation des cellules endothéliales et la destruction des vaisseaux sanguins. Cette molécule peut être trouvée dans l'initiation et la progression des tumeurs. Les interleukines 1 et 6 ont, quant à elles, un rôle dans le recrutement des macrophages et dans la formation de métastases *(Balkwill and Mantovani, 2001; Landskron et al., 2014).*

1.2.4. Récepteurs Toll-like (TLRs) et cancer

1.2.4.1. Récepteurs Toll-like

Les cellules du système immunitaire inné reconnaissent les molécules associées aux agents pathogènes (PAMPs : « Pathogen-Associated Molecular Patterns ») et aux dommages cellulaires (DAMPs : « Damaged-Associated Molecular Patterns ») grâce aux récepteurs « Pattern Recognition » (PRR). Les récepteurs « Toll-like» (TLRs) font partie de cette famille de récepteurs. Ces récepteurs ont été découverts dans les années 80 chez la drosophile (*Drosophila melanogaster)*. Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires qui ont une partie extracellulaire riche en leucines (LRR : « Leucine-Rich Repeat ») et une partie intracellulaire similaire au récepteur à l'interleukine 1 (TIR : « Toll-IL1 Receptor ») (*Figure 6*) *(Chatenoud L, 2012, Moreno and Sánchez-Ibarrola, 2003)*.

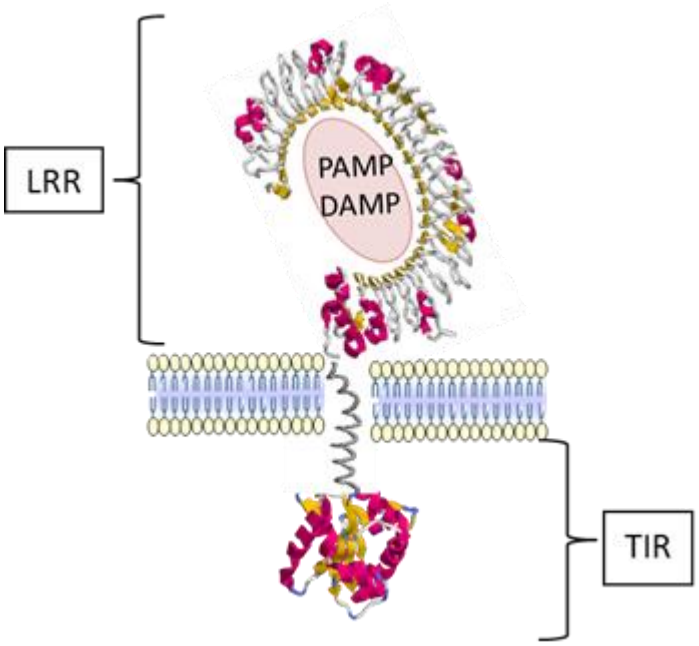


Figure 6 : Structure des récepteurs Toll-like.
Partie extracellulaire riche en leucines (LRR) et domaine intracellulaire (TIR) (*Lucienne Chatenoud, 2012*).

Treize récepteurs TLRs ont été décrits chez les mammifères, dont neuf sont exprimés chez l'Homme sous une forme fonctionnelle. Il existe deux types de récepteurs : les membranaires, qui vont être localisés à la surface de la cellule, et les endosomaux, qui se situent à l'intérieur de la cellule. Ces récepteurs vont reconnaître de nombreux ligands de type et d'origine différents (*Tableau 2*). TLR4, par exemple, va reconnaître le lipopolysaccharides (LPS) de la paroi des bactéries GRAM-, le TLR5 va avoir comme ligand la flageline des bactéries mobiles et le TLR7 reconnait les ARN simple brin *(Rakoff-Nahoum and Medzhitov 2009, Chatenoud L, 2012).*

TLR	Expression chez l'homme	Expression chez la souris	Ligand
TLR1	+	+	Triacyl lipopeptides Bactéries et certaines protéines parasitaires
TLR2	+	+	Diacyl lipopeptides Bactéries, acide lipotectoïque (bactéries Gram+), zymosan (paroi des levures)
TLR3	+	+	ARN double brin (virus)
TLR4	+	+	Endotoxine ou lipopolysaccharide (bactéries Gram-)
TLR5	+	+	Flageline (bactéries mobiles)
TLR6	+	+	Diacyl lipopeptides Bactériens, acide lipotectoïque (bactéries Gram+), zymosan (paroi des levures)
TLR7	+	+	ARN simple brin (virus)
TLR8	+	-	ARN simple brin (virus)
TLR9	+	+	Motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien et viral
TLR10	+	- (Forme inactive)	Inconnu
TLR11	Forme tronquée probablement inactive	+	Profiline, une protéine du parasite protozoaire *Toxoplasma gondii*, composante de bactéries provoquant des infections rénales et des voies urinaires
TLR12	-	+	Inconnu
TLR13	-	+	Inconnu

Tableau 2 : TLRs et ligands.
Expression des TLRs humains et murins et leurs ligands (*Chatenoud L, 2012).*

Lorsque le ligand est reconnu par le récepteur, le signal va se transmettre grâce aux adaptateurs moléculaires intra-cytoplasmiques : MYD88 (« Myeloid Differentiation Factor

88 »), TRIF (« TIR-domain-containing adaptor inducing interferon β »), TIRAP (« TIR- domain-containing adaptor protein ») et TRAM (« TIRF-related adaptor molecule »). La majeure partie des TLRs utilise comme adaptateur moléculaire MYD88, sauf TLR3 qui utilise TRIF, et TLR4 qui peut transmettre son signal via MYD88 et TRIF. Ces voies de signalisation vont conduire à la liaison à l'ADN de NF-κB, AP-1 et IRF3 et 7 (« Interferon Regulatory Factor »).

La stimulation des TLRs va induire l'activation des voies de signalisation de NF-κB, MAPK (mitogen-associated protein kinase), JNK (JUN N-terminal kinase) ainsi que les IRF 3 et 7 pour produire des cytokines pro-inflammatoires et de l'interféron de type 1 *(Figure 7)*. Ces voies de signalisation sont essentielles pour l'organisation de la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte contre les pathogènes. Il a été également observé que la stimulation des TLRs est associée à une survie cellulaire due à une augmentation de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique *(Rakoff-Nahoum and Medzhitov 2009).*

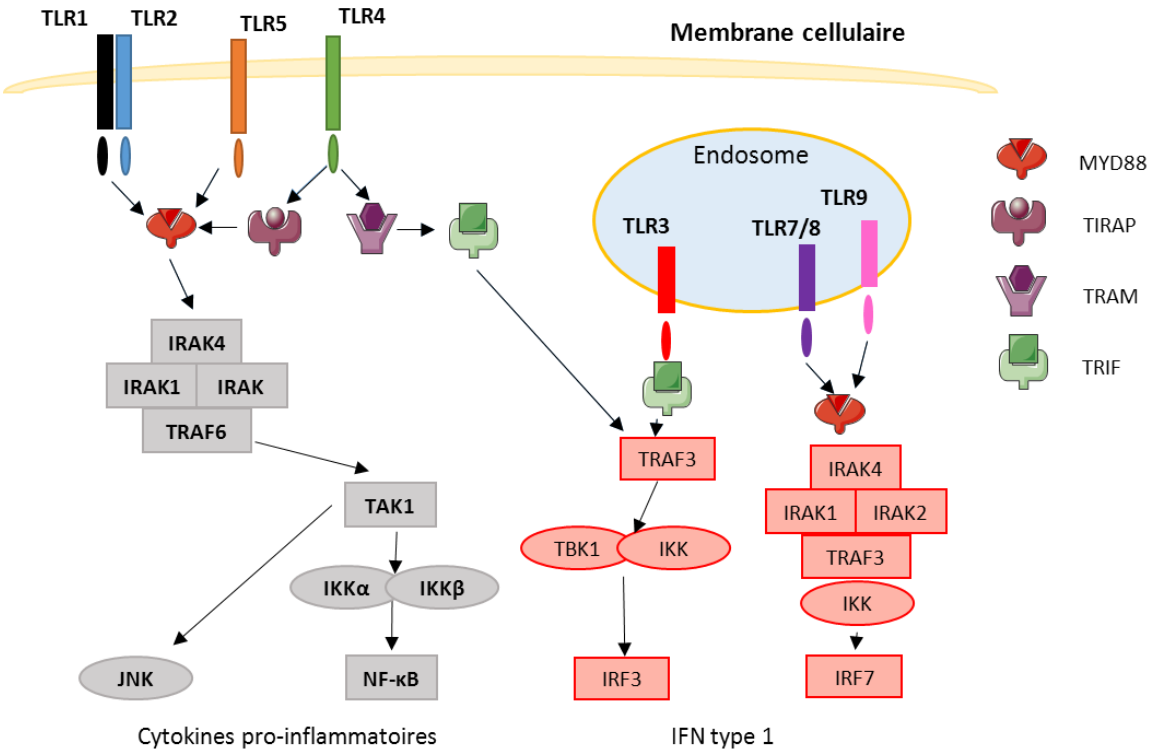


Figure 7 : Récepteurs Toll-Like et voies de signalisation.
Schéma des voies de signalisation (Zhao et al., 2014). La plupart des TLRs, sauf TLR3, utilisent MyD88 comme adaptateur moléculaire qui va à son tour activer NF-κB et AP-1. TLR3 et TLR4 vont induire l'activation de l'interféron de type 1 via TRIF.

1.2.4.1.1. NF-κB et inflammation pro-tumorale

Le facteur nucléaire-κB (NF-κB) est un facteur de transcription qui a un rôle important dans l'inflammation. Il régule l'inflammation, la réponse immunitaire et la prolifération/survie cellulaire. NF-κB est situé dans le cytoplasme cellulaire séquestré par des protéines d'inhibition de NF-κB appelées IκB. L'activation de NF-kB va se faire grâce à la phosphorylation et à la protéolyse de cet inhibiteur. Diverses molécules vont être impliquées dans l'activation de NF-κB. Ce facteur de transcription est activé dans différents types de cancers et est relié à un effet pro-tumoral *(Akira and Takeda, 2004; Balkwill and Coussens, 2004; Hopewell et al., 2013).*

L'activation de NF-κB dans les tissus normaux va provoquer une inflammation aigüe, laquelle va induire une augmentation de la sécrétion des molécules pro-inflammatoires, ainsi qu'une régulation de la prolifération et de la mort cellulaire. Cependant, lorsque cette activation a lieu lors d'une inflammation chronique ou dans des cellules tumorales, elle va induire l'expression d'enzymes, telles que iNOS, qui vont contribuer à ce processus. De plus, la stimulation de NF-κB est impliquée dans la production de protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, c-IAP1 et IXAP, et active l'expression de la cycline D1 (un régulateur de la phase G1 du cycle cellulaire) *(Balkwill and Coussens, 2004; Yamamoto and Gaynor, 2001).*

1.2.4.2. TLRs et cancer

Les infections dues aux microbes, l'inflammation et la réparation des tissus peuvent être associées au développement du cancer. Ainsi, un lien a été établi entre développement du cancer et l'expression ou la stimulation des TLRs. L'expression des TLRs peut être trouvée dans les cellules tumorales. Ainsi, lors de la stimulation de ces récepteurs, la production de cytokines et/ou chimiokines va être induite, ce qui pourrait conduire à une survie et une chimiorésistance des cellules cancéreuses, et à une progression tumorale. Cependant, d'après certains auteurs, cette stimulation peut induire une réponse immunitaire qui pourrait combattre voire éliminer les cellules tumorales *(Ioannou and Voulgarelis, 2010).*

1.2.4.2.1. <u>Rôle anti-tumoral des TLRs</u>

Certaines thérapies dérivées des microbes ont été utilisées pour combattre le cancer. OK-432, une préparation des *Streptococcus pyogenus,* stimule TLR4 et a été utilisée comme

thérapie anti-tumorale dans le cancer cervical, gastrique et le carcinome squameux oral. La stimulation de TLR2 par *Mycobacterium bovis,* a été utilisée comme traitement du cancer de la vessie pendant 30 ans *(Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009).*

Les effets anticancéreux des TLRs ont été également observés lorsque la stimulation est faite par des ligands purifiés ou synthétiques. En 2013, l'équipe de Han *et al.* démontrait que l'Imiquimod, un agoniste de TLR7, induisait un effet inhibiteur sur la croissance tumorale dans le cancer de la prostate *in vitro* et *in vivo*. En effet, ce traitement, dans les cellules TRAMP-C2 (murines), conduisait à un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2/M. L'activation de TLR7 des cellules avec cet agoniste induisait également une apoptose dépendante des mitochondries *(Han et al., 2013)*. L'Imiquimod est également utilisé comme traitement des mélanomes. Il a également été montré que lorsque des souris C57BL/6 sont traitées par l'agoniste de TLR7, une diminution dans la progression tumorale due à une augmentation de la densité des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) a été observée *(Drobits et al., 2012).* Le ligand du TLR9, le CpG, est en étude pour être administré aux patients atteints du cancer du rein, de la peau et du cerveau.

Les TLRs peuvent aussi induire une régression tumorale en augmentant la perméabilisation vasculaire, ce qui permet un recrutement des cellules du système immunitaire comme les pDC, les cellules NK ou les lymphocytes T cytotoxiques *(Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009).*

1.2.4.2.2. Rôle pro-tumoral des TLRs

De nombreuses études démontrent que les effets pro-tumoraux des TLRs semblent être dus aux récepteurs exprimés par les cellules tumorales. Lors de la stimulation des TLRs des cellules malignes, une augmentation de la progression tumorale va être induite, en induisant une survie et une prolifération cellulaire. Après stimulation des TLRs par leurs ligands spécifiques, les cellules tumorales vont secréter des cytokines et chimiokines qui peuvent agir de manière autocrine pour stimuler la croissance tumorale.

La stimulation de TLR4 par le LPS permet la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. Dans le cancer du sein, la stimulation de ce récepteur induit l'invasion, l'angiogenèse et la migration des cellules malignes. TLR4 est exprimé par les cellules cancéreuses mammaires, et son inhibition diminue la prolifération cellulaire. TLR4 joue également un rôle pro-tumoral dans le cancer du côlon et l'hépatocarcinome. Le traitement intra-tumoral avec la *Listeria monocytogenes* induit une prolifération tumorale via le TLR2 des cellules tumorales. Dans le cancer gastrique, une surexpression de TLR2 est liée à une mauvaise survie des patients. Chez des souris modifiées, la suppression de l'expression de TLR2 diminue le développement des tumeurs. TLR2 a également un rôle pro-tumoral dans le cancer du poumon en induisant la production d'IL-6 et de TNF-α par les macrophages, ce qui va favoriser le développement de métastases *(Pradere et al., 2014; Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009) .*

1.2.4.2.3. Rôle pro-tumoral de TLR7

Malgré les effets anti-tumoraux de TLR7, des études ont montré que la stimulation de ce récepteur peut induire un effet pro-tumoral. Ainsi, au sein du laboratoire, Julien Cherfils-Vicini a démontré que le récepteur TLR7 est exprimé par les cellules tumorales d'adénocarcinomes et de carcinomes épidermoïdes alors qu'il n'est pas exprimé dans le tissu pulmonaire non tumoral. *In vitro*, lorsque des lignées cellulaires pulmonaires humaines, telles que les cellules A549 (adénocarcinome) et SKMES (carcinome épidermoïde), sont incubées avec un ligand de TLR7 comme la loxoribine, une activation atypique de la voie de signalisation de NF-kB, ainsi qu'une augmentation de la survie cellulaire induite par une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ont été observées. Une augmentation de l'expression du récepteur aux chimiokines CCR4 et une résistance à la mort cellulaire induite par la chimiothérapie ont également été constatées. En 2014, Saradiya Chatterjee a validé ces résultats *in vivo* en montrant que des souris immunodéficientes NOD/SCID et immunocompétentes C57BL/6, ayant reçu une greffe sous-cutanée de cellules tumorales et traitées avec des agonistes de TLR7, présentaient une augmentation de la progression tumorale ainsi qu'une résistance au traitement par chimiothérapie *(Chatterjee et al., 2014; Cherfils-Vicini et al., 2010).*

En 2012, l'équipe d'Ochi a montré que, chez l'Homme et la souris, TLR7 n'était pas exprimé dans les pancréas normaux. En revanche, ils observaient que TLR7 était surexprimé dans le cancer du pancréas humain et chez la souris p48Cre;$Kras^{G12D}$, modèle spontané du cancer pancréatique. Lors de la stimulation de TLR7 par un agoniste appelé ssRNA40, une augmentation de la croissance tumorale se produisait. La stimulation de TLR7 induisait l'activation de NF-kB, de MAPK et une sous-expression de PTEN, ainsi qu'une forte activation de STAT3 qui a été associée à la modulation des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xl et c-Myc *(Ochi et al., 2012).*

1.3. Le développement des métastases

1.3.1. La formation des métastases

Les métastases sont des tumeurs secondaires qui se développent dans des organes distants du site primitif de la tumeur. Elles sont la principale cause de mort par cancer. Il a été démontré qu'il n'existe pas de corrélation entre la taille de la tumeur et sa capacité à développer des métastases. En effet, les petites tumeurs peuvent également mener à la formation des métastases. La formation de ces tumeurs secondaires implique des changements biochimiques et phénotypiques dans la cellule. Ces changements affectent différents niveaux cellulaires, tels que l'adhésion, l'expression génique, la morphologie, la motilité ou les voies de signalisation des facteurs de croissance. Le processus de développement des métastases peut être divisé en différentes étapes : invasion et migration, intravasation, circulation, extravasation et, pour finir, colonisation *(Figure 8) (Leber and Efferth, 2009).*

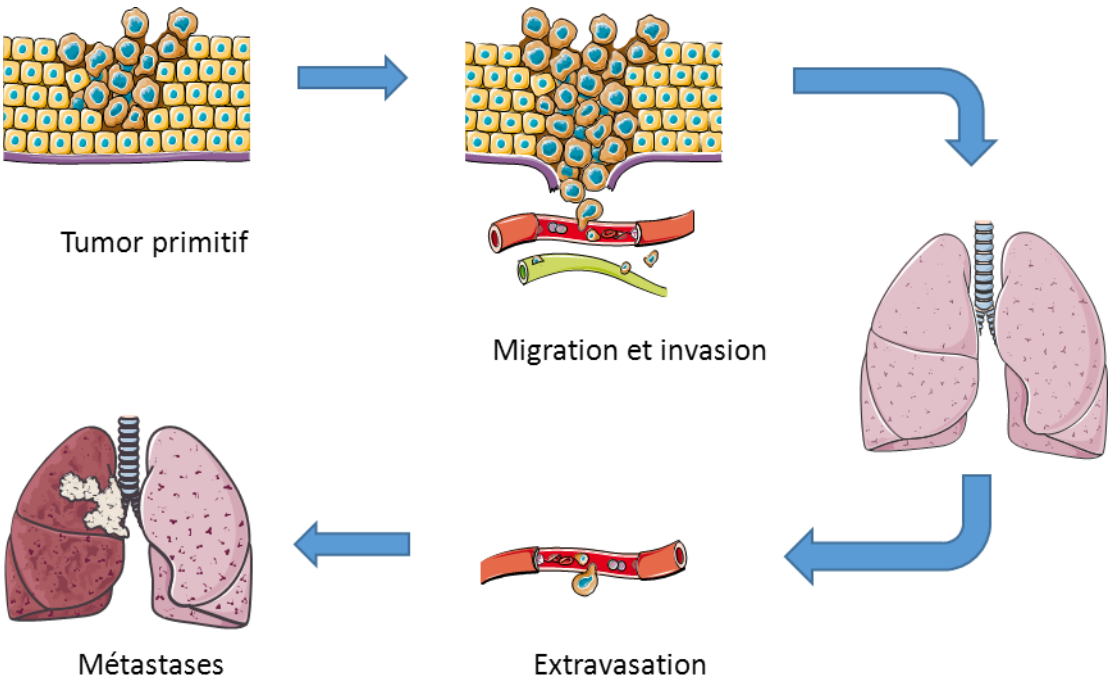


Figure 8 : Développement des métastases.
A partir de la tumeur primaire, les cellules vont acquérir des capacités invasives et migratoires qui va leur permettre de rentrer dans les vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques pour coloniser les organes secondaires (*adapté à partir de medicalart)*.

La plupart des cancers sont d'origine épithéliale, on les appelle carcinomes. Les cellules épithéliales sont des cellules dont la mobilité est réduite à cause des jonctions existant entre les cellules, comme l'adhésion cellule-cellule qui est faite grâce aux cadhérines et des glycoprotéines transmembranaires dépendantes du calcium. Une dérégulation de l'expression de ces protéines, particulièrement l'E-cadhérine, est observée dans les cellules cancéreuses invasives. Cette perte d'expression peut être liée à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Au cours de ce processus, la cellule va réorganiser son cytosquelette et l'expression des protéines épithéliales va être inhibée pendant que les protéines du mésenchyme vont être surexprimées. La TEM est produite lors de la formation des nouveaux tissus dans l'embryogenèse, mais dans un contexte tumoral, elle va induire une capacité migratoire aux cellules cancéreuses. Ainsi, les cellules tumorales vont perdre leur phénotype épithélial, comme la sous-expression de l'E-cadhérine, et gagner des caractéristiques mésenchymateuses, telles que la surexpression de la vimentine et des facteurs de transcription (Snail, Twist et ZEB) *(Tableau 3) (Leber and Efferth, 2009 ; Thiery et al., 2009).*

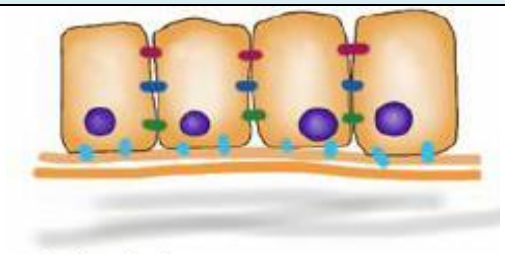
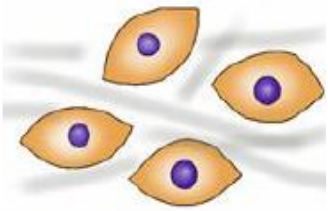
Cellules Epithéliales	Cellules Mésenchymateuses
	
Sur-expression d'E-cadhérine	Sous-expression d'E-cadhérine
Polarité cellulaire	Pas de polarité cellulaire
Adhésion cellule-cellule	Capacité de migration
Sur-expression de la cytokératine	Sous-expression de la cytokératine
Sous-expression de N-cadhérine	Sur-expression de N-cadhérine
Sous-expression de Vimentine	Sur-expression de Vimetine
Sous-expression de facteurs de transcription Twist, Snail, SLUG, ZEB	Sur-expression de facteurs de transcription Twist, Snail, SLUG, ZEB

Tableau 3 : Processus de la transition épithélio-mésenchymateuse.
Caractéristiques des cellules épithéliales et mésenchymateuses : morphologie et variation d'expression des protéines *(d'après le cours de Nadhir Yousfi en 2015).*

Au sein de la tumeur, différentes protéases vont être produites. Ceci va permettre la dégradation de l'endothélium des vaisseaux sanguins et lymphatiques et l'accès aux cellules néoplasiques. Grâce aux chimiokines et à l'expression altérée des molécules d'adhésion, les cellules vont pouvoir migrer dans la circulation sanguine ou lymphatique pour arriver aux organes secondaires. Une fois les cellules parvenues dans les vaisseaux, elles vont pouvoir migrer. Il est à noter que cette étape peut être toxique pour les cellules car elles ont besoin de facteurs de croissance pour proliférer et la plupart des cellules, lorsqu'elles ne sont pas en situation d'adhésion, vont induire leur propre apoptose. L'exposition aux lymphocytes va aussi aider à l'élimination des cellules malignes dans la circulation sanguine.

Les cellules tumorales vont exprimer à leur surface des molécules, telles que des intégrines ou sélectines, qui vont leur permettre d'adhérer à l'endothélium des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ainsi, l'extravasation, effet inverse de l'intravasation, va pouvoir se produire. L'endothélium va être dégradé et les cellules vont parvenir à atteindre les organes en sortant des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ce processus est naturellement utilisé par les

cellules leucocytaires lors d'une infection. Les cellules tumorales vont donc pouvoir coloniser un organe distant. Dans cette dernière phase, la prolifération des cellules et l'angiogenèse vont être les éléments clés. Ce nouveau microenvironnement ne va pas être adapté pour les cellules tumorales et ceci va empêcher leur prolifération qui peut induire la mort des cellules. L'angiogenèse va être très importante lors du développement des métastases pour apporter des nutriments et l'élimination des déchets métaboliques.

1.3.2. Le système immunitaire et les métastases

Les cellules immunitaires vont principalement aider à combattre le cancer. Cependant, quelques facteurs de croissances, des cytokines et chimiokines sécrétés par ces cellules ainsi que quelques sous-types cellulaires vont induire l'effet inverse. En effet, elles vont promouvoir la formation des métastases. Parmi ces cellules on retrouve les macrophages, les MDSC, les neutrophiles *(Figure 9) (Kitamura et al., 2015; Schmid and Varner, 2010)*.

Les macrophages sont recrutés dans les sites tumoraux en réponse aux signaux que les cellules tumorales et non tumorales secrètent. Ils vont ainsi faire partie de l'infiltrat immunitaire présent au sein de la tumeur. En fonction des signaux qu'ils reçoivent, les macrophages vont se différencier en macrophages de phénotype M1 ou M2. Si la cellule acquiert un phénotype M1, elle va avoir un effet anti-tumoral, entraînant ainsi l'élimination des cellules tumorales et l'inhibition de l'angiogénèse. Au contraire, les macrophages de type M2 peuvent aider à la progression tumorale en activant l'angiogénèse, en augmentant l'invasion tumorale et la fibrose *(Grivennikov et al., 2010; Long and Beatty, 2013)*

Les macrophages associés à la tumeur (TAM), vont empêcher l'infiltration dans la tumeur des cellules lymphocytaires CD8+, ainsi que l'immunité anti-tumorale. Ces cellules sécrètent un ensemble de cytokines et de chimiokines qui vont être impliquées dans la progression tumorale et l'invasion cellulaire. Les macrophages vont secréter le facteur de croissance EGF qui va activer les cellules cancéreuses pour leur migration. Les TAM vont aussi relarguer de l'IL-8 et du CXCL12, deux molécules qui vont agir dans la capacité d'invasion des cellules malignes, ainsi que du MMP-9 (Matrix Metallo Proteinase) responsable de la dégradation de

la matrice extra-cellulaire *(Joyce and Pollard, 2009; Kitamura et al., 2015; Schmid and Varner, 2010).*

Les cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes ou MDSC, sont des cellules myéloïdes immatures. Dans le cas d'un cancer, les cellules myéloïdes immatures peuvent être bloquées dans leur différenciation. Ceci va mener à une dissémination des cellules MDSC au sein de la tumeur et dans la rate. Ces cellules vont supprimer l'activation des lymphocytes T en agissant sur leur prolifération et leur production de cytokines. Il a été montré que dans les souris qui ont reçu une greffe de cellules du cancer du poumon, la déplétion des MDSC par des anti-Gr1 diminue la migration cellulaire ainsi que le nombre de métastases *(Kitamura et al., 2015; Schmid and Varner, 2010; Srivastava et al., 2012)* .

Les neutrophiles, cellules du système immunitaire majoritaires dans le sang, sont polymorphonucléaires et phagocytaires. Chez l'Homme, ces cellules peuvent être reconnues grâce à l'expression de CD66b dans leur surface et de la protéine myéloperoxydase (MPO) au sein de leur cytoplasme. Cependant, chez la souris, elles sont positives pour le marqueur Gr1. Une augmentation de neutrophiles a été observée chez les patients atteints de cancer du côlon, du poumon et gastrique. Les neutrophiles associés à la tumeur vont secréter MMP-9. Le TNF-α présent au sein de la tumeur va activer la sécrétion par les neutrophiles de granules qui contiennent du VEGF. Cette dégranulation va induire la prolifération des cellules endothéliales et la néovascularisation *(Schmid and Varner, 2010).*

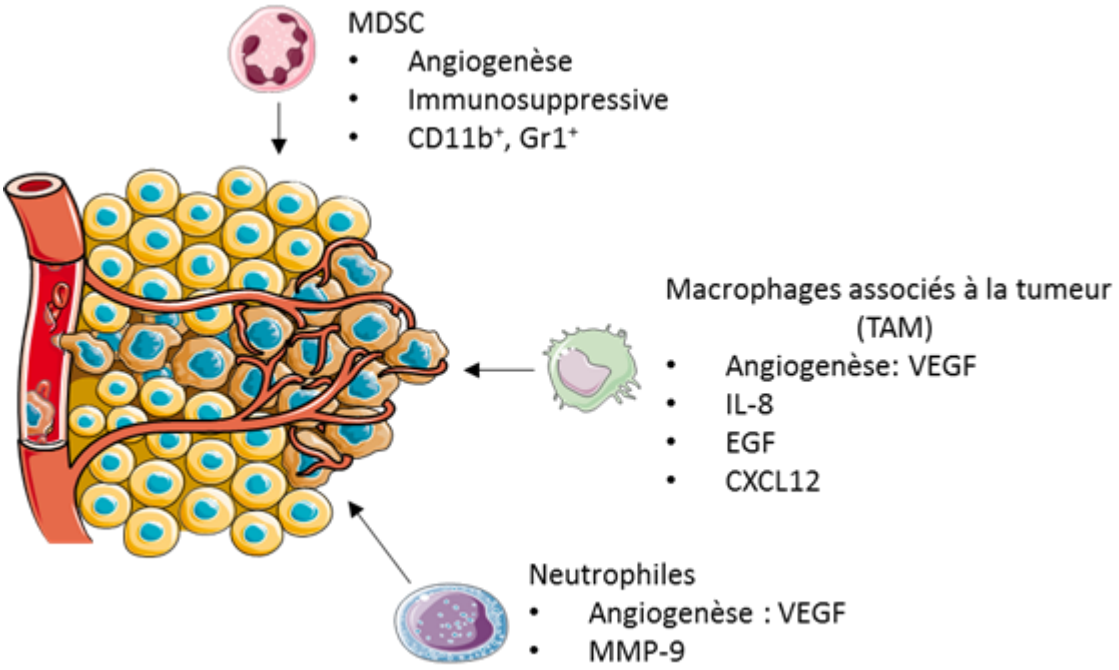


Figure 9 : Cellules leucocytaires impliquées dans le développement des métastases.
Les MDSC, macrophages et neutrophiles vont aider à la formation des métastases grâce à la sécrétion des protéines liées à l'angiogenèse (VEGF) et à la dégradation de la matrix extracellulaire (MMP) (*Schmid and Varner, 2010*).

1.3.3. Rôle des TLRs dans le développement des métastases

Une expression dérégulée des TLRs dans les cellules tumorales peut induire leur dissociation des cellules voisines. Ainsi, il a été montré que l'expression des TLRs par les cellules cancéreuses joue un rôle important dans la progression tumorale et dans la formation des métastases. Différents TLRs peuvent être exprimés par les mêmes cellules tumorales. Par exemple, les cellules du cancer gastrique expriment TLR4, TLR5 et TLR9, et les cellules de cancer du poumon peuvent exprimer TLR7, TLR9 ou TLR4 *(Huang et al., 2008)***.**

Dans les mélanomes humains, TLR2, TLR3 et TLR4 sont exprimés. L'équipe de Goto a démontré que la stimulation de ces récepteurs par leurs ligands (zymosan, polyIMP/polyCMP et LPS respectivement) induisait une augmentation de la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires activant ainsi la migration des cellules cancéreuses.

La ligné cellulaire MDA-MB-231 de cancer du sein exprime TLR9. Son activation entraîne une augmentation de l'expression de MMP-13 et de l'invasion tumorale. Dans le cancer de la prostate, TLR9, après avoir été stimulé par son ligand CpG-ODN, induit l'invasion cellulaire en surexprimant MMP-13 (*Goto et al., 2008; Huang et al., 2008; Sato et al., 2009)*.

TLR4 est un récepteur qui est exprimé dans différents cancers comme le cancer du côlon, le cancer du poumon ou le cancer de sein. Sa stimulation par le LPS induit l'invasion des cellules tumorales. Dans le cancer du sein, l'activation de ce récepteur induit la sur-expression de MMP-2, MMP-9 et du VEGF, ainsi qu'une augmentation de l'invasion et de la migration cellulaire. Ces effets sont diminués lorsque les cellules sont co-cultivées avec du LPS et un antagoniste de TLR4, l'Eritoran. Chez les patients, l'expression de TLR4 est corrélée avec la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques *(Yang et al., 2014).* La stimulation de TLR4 induit également une augmentation de la migration des lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire A549 et H59 *(Chow et al., 2015).* Dans le cancer du côlon, TLR4 peut induire la TEM dans certaines lignés cellulaires *(Luddy et al., 2014).*

Les TLRs peuvent induire l'augmentation de l'expression des récepteurs aux chimiokines comme CCR7 ou CCR8. Ces récepteurs sont exprimés par les lymphocytes et utilisés pour leur migration vers les ganglions lymphatiques. Ceci expliquerait le mécanisme par lequel les cellules tumorales peuvent envahir les ganglions lymphatiques *(Luddy et al., 2014).*

2. OBJECTIFS

Par des analyses en immunohistochimie, mon groupe a montré que TLR7 est exprimé par des cellules tumorales d'adénocarcinomes et de carcinomes épidermoïdes de cancer du poumon avec une localisation périnucléaire *(Cherfils-Vicini et al. 2010)*. Dans le tissu pulmonaire non tumoral, les cellules épithéliales n'expriment pas ce récepteur. Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que la stimulation des cellules A549 (adénocarcinome) et SKMES (carcinome épidermoïde) par la loxoribine (un ligand agoniste de TLR7) induit une activation atypique de NF-κB, une augmentation de la survie des cellules tumorales en conséquence d'une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, et une augmentation de la résistance à la mort induite par des drogues de chimiothérapie *(Cherfils-Vicini et al. 2010)*. Il a été également démontré qu'*in vitro* la stimulation de TLR7 par la loxoribine induit une augmentation de l'expression du récepteur de chimiokines CCR4. Les récepteurs de chimiokines ont été montrés comme pouvant être impliqués dans la dissémination métastatique de tumeurs *(Singh et al., 2007).*

Ces résultats ont été confirmés par des expériences *in vivo*, dans des modèles de souris immunodéficiences NOD/SCID et immunocompétentes C57BL/6. Par ailleurs, une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales de patients atteints de CPNPC est corrélée avec un mauvais pronostic *(Chatterjee et al., 2014).*

Au vu des observations précédemment décrites, les objectifs de mon projet de recherche, afin de mieux caractériser le TLR7 dans le cancer du poumon, ont été :

2.1. L'étude du rôle de TLR7 dans la progression tumorale et des effets thérapeutiques de l'antagoniste IRS661

Mon équipe a montré que chez les souris immunocompétentes la simulation de TLR7 induit un effet pro-tumoral et une chimiorésistance. Cet effet semble être médié par les cellules tumorales. J'ai donc étudié la progression tumorale des cellules LLC (adénocarcinome pulmonaire murin) chez des souris sauvages ou déficientes pour TLR7 dans lesquelles les cellules immunitaires n'expriment pas TLR7. Pour cela j'ai injecté les cellules tumorales par voie sous-cutanée et l'agoniste de TLR7 (CL264) et j'ai suivi la croissance de la tumeur au

cours de temps. Cette expérience a permis de déterminer si la progression tumorale est due à la stimulation du TLR7 des cellules tumorales ou immunitaires.

Il a été montré que l'IRS661, un oligonucléotide immunorégulateur, a été utilisé comme antagoniste spécifique de TLR7 (Barrat et al., 2005; Pawar et al., 2007). J'ai voulu étudier quel effet peut avoir cet antagoniste sur la progression tumorale chez nos souris et ainsi trouver une possible thérapie. Dans un premier temps, j'ai injecté les cellules LLC par voie sous-cutanée et co-injecté le CL264, l'IRS661 et le cisplatine, afin de déterminer la progression tumorale. Ensuite, j'ai étudié si une injection tardive de l'antagoniste peut induire une inhibition de la progression tumorale. Cette expérience a permis de trouver une possible thérapie pour combattre les effets pro-tumoraux de la stimulation de TLR7.

2.2. Déterminer si la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales a un effet pro-métastatique

Mon équipe a vu par expériences de PCR, qu'une stimulation de TLR7 des cellules SKMES et A549 (lignées cellulaires humaines de carcinome pulmonaire) par la loxobirine induit une augmentation du récepteur de chimiokines CCR4, qui a été démontré comme impliqué dans les métastases pulmonaires de cancer du sein *(Li et al., 2012)* et les métastases osseuses de tumeurs pulmonaires *(Nakamura et al., 2006).* Ces résultats suggèrent que la stimulation des cellules tumorales par TLR7 pourrait augmenter leur capacité métastatique. J'ai donc caractérisé le rôle de TLR7 dans la survenue des métastases, par des expériences *in vitro* et *in vivo*.

Pour déterminer la formation des métastases *in vivo* j'ai mis au point deux techniques. La première a consisté à injecter des cellules LLC exprimant la luciférase par voie sous-cutanée, puis de traiter les souris avec 3 injections d'agonistes de TLR7 par voie intratumorale. La croissance et l'apparition de métastases sont analysées grâce à l'utilisation de l'imagerie *in vivo* (IVIS). La deuxième consiste à prendre les poumons des animaux qui ont reçu une greffe de cellules LLC et ont été traitées par le CL264. Ces poumons sont colorés à l'encre de chine, puis fixés et les métastases sont décolorées grâce à l'utilisation de la solution Fekets *(Zimmerman et al., 2010, Miretti et al., 2008).*

La seconde partie a consisté à déterminer par quels mécanismes la stimulation de TLR7 peut induire une augmentation des métastases. Ainsi, j'ai étudié l'expression d'ARNm du gène *CCR4* par PCR après avoir stimulé les cellules par des agonistes de TLR7. Par des Western Blot et immunohistochimie, j'ai étudié la transition épithelio-mésenchymateuse en regardant les protéines et les facteurs de transcription potentiellement impliqués comme Vimentine, E-cadherine, Snail et Twist.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Lignées cellulaires

Pour ce projet, j'ai utilisé les lignées cellulaires humaines de cancer pulmonaire A549 (ATCC CCL-185), les lignées murines de tumeurs pulmonaires LLC (Lewis Lung Carcinoma, ATCC CRL-1642) et LLC exprimant de manière stable la luciférase (LLC-Luc, fournies par Vincezo Di Bartolo, Institut Pasteur, Paris). Les cellules A549 ont été cultivées en milieu DMEM F-12 supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal (SVF), 1% pénicilline, 1% streptomycine, 1% glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% Hepes et 1% d'acides aminés non essentiels. Les cellules LLC ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% SVF, 1% pénicilline et 1% streptomycine. Les cellules LLC-Luc ont été cultivées dans du milieu DMEM GlutaMAX supplémenté avec 10% de SVF, 1% pénicilline, 1% de streptomycine et 0,5 mg/mL d'hygromicine B. Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide sous 5% de CO_2.

3.1.1. Transfection des cellules LLC

Les cellules LLC ont été transfectées par un vecteur rapporteur luciférase (pGL4.50 [luc/CMV/Hygro] vector). Le plasmide, utilisé par l'équipe de Vincenzo à l'Institut Pasteur, a une taille de 6600 paires de bases et contient le promoteur du cytomégalovirus (CMV) qui permet un niveau de transcription élevé. Il exprime le gène de résistance à l'ampicilline qui est un marqueur de sélection bactérienne et permet l'amplification du vecteur dans des bactéries compétentes avant de le transfecter dans les cellules eucaryotes. Il contient également un gène de résistance à l'hygromycine B afin de pouvoir sélectionner les cellules de mammifères qui expriment ce vecteur. Ce plasmide porte le gène codant la luciférase «luc2» qui est dérivé de la luciole orientale commune *Photinus pyralis.* Pour une terminaison efficace de la transcription une séquence polyA du SV40 poly(A) est positionnée en aval de luc2. L'équipe de Pasteur ont obtenu ce vecteur chez « Promega » (catalogue#E1310) (*Figure 10*).

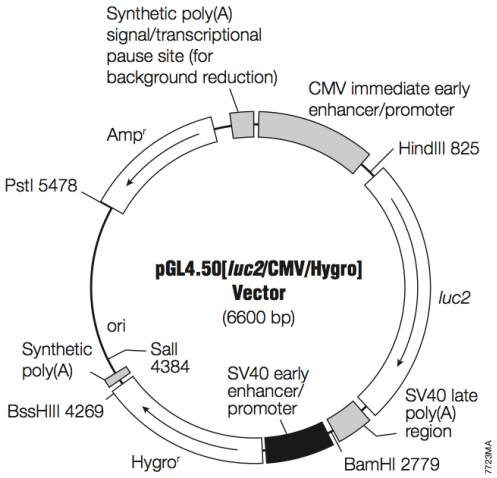


Figure 10 : Plasmide pGL4.50[luc/CMV/Hygro].
Plasmide utilisé pour la transfection des cellules LLC (*adapté à partir de Promega*).

3.2. Animaux utilisés

Trois types de souris ont été utilisés tout au long de ce projet. Les souris NOD/SCID, immunodéprimées permettent la greffe des cellules humaines comme les cellules A549. Ces souris ont une mutation au niveau du gène *Scid*, ce qui altère le développement des lymphocytes T et B. Ces souris présentent également une déficience en cellules NK.

J'ai utilisé des souris C57BL/6 J comme modèle de souris immunocompétentes et des souris déficientes pour TLR7 (B6.129S1-*Tlr7*^{tm1Flv}/J). La lignée murine LLC ou LLC-luc a été greffée à ces souris au cours de mes études.
Les souris C57BL/6J et NOD/SCID utilisées dans cette étude sont des souris femelles âgées de 6-8 semaines et elles ont été issues de l'élevage de Charles River. Pour les souris déficientes pour TLR7, les expériences ont été réalisées sur des souris femelles âgées de 6 à 8 semaines, à partir d'un élevage réalisé au Centre d'exploration Fonctionnelle du CRC.

3.3. Réactifs : agonistes et antagonistes de TLR7, et chimiothérapie

Seuls des agonistes synthétiques ont été utilisés au cours de cette étude. A mon arrivée au laboratoire, deux agonistes étaient utilisés, un analogue de la guanosine, la Loxoribine, qui est actif sur les cellules humaines A549 et un analogue de l'adénine, le CL264, qui a été utilisé sur les cellules murines LLC. Ces agonistes ont été administrés à une concentration de 40 µg par souris pour les études *in vivo*, et utilisés à 10 ou 40 µg/mL pour les expériences *in vitro*. Ces produits ont été fournis par Cayla Invivogen.

Comme antagoniste de TLR7, j'ai utilisé un oligonucléotide composé de 20 nucléotides, appelé IRS661 (5'-GCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3') (Immunoregulatory sequence). Comme contrôle j'ai utilisé une deuxième séquence oligonucléotidique appelée ODN (5'-CCTGCAGGTTAAGT-3'). Les antagonistes ont été fournis par Eurofins MWG Operon. *In vivo* et *in vitro*, la concentration utilisée a été de 40 µg par souris ou par mL. Au cours de ces expériences, une seule molécule utilisée en chimiothérapie a été utilisée, le cisplatine, principale drogue administrée aux patients atteints d'un CPNPC. Le cisplatine est obtenu auprès de la pharmacie de l'hôpital Saint Antoine (Paris) et est utilisé à 40 µg par souris.

3.4. Etude de la progression tumorale et du rôle thérapeutique d'IRS661 in vivo

Préparation des cellules A549 ou LLC : Au jour 0, le milieu de culture est aspiré et le tapis cellulaire est rincé avec 10 ml de PBS 1X. Les cellules sont décollées avec 2 ml (T75) ou 4ml (T175) de trypsine 0,05%-EDTA et incubées 3 minutes à 37ºC. L'action de la trypsine est arrêtée par ajout de milieu de culture, permettant ainsi de resuspendre les cellules, qui sont récoltées dans un tube Falcon® de 50 mL. Elles sont centrifugées à 1200 tours par minutes (rpm) pendant 10 minutes à 20°C. Elles sont ensuite resuspendues dans 10 ml de PBS 1X. Les cellules sont ensuite comptées. Pour cela, un volume de 10 µL de la suspension cellulaire est prélevé pour réaliser une dilution au 10ème avec du bleu trypan, qui sert à determiner le nombre de cellules vivantes. De cette suspension 10 µL sont utilisés pour réaliser un comptage au microscope. Après comptage, les cellules sont centrifugées une deuxième fois à 1200 rpm pendant 10 minutes à 20°C. Après avoir éliminé le surnageant, un volume de PBS

1X est ajouté afin d'avoir la concentration de cellules désirée, ici 1 million de cellules dans 100 µL. Toutes les expériences *in vivo* sont réalisées selon le même schéma (*Figure 11*). La taille de la tumeur a été mesurée tous les 2-3 jours au pied à coulisse et le volume tumoral est calculé grâce à la formule suivante : volume tumoral (mm^3) = 4/3π x l/2 x d/2 x b/2 = 0.5236 x l x d x b, avec l = longueur, d = largeur et b = profondeur.

3.4.1. Effets d'agoniste de TLR7 sur la progression tumorale chez les souris C57BL/6 et TLR7 KO

Les souris C57BL/6 sauvages et déficientes pour TLR7 ont reçu une injection de 1 million de cellules LLC par voie sous-cutanée, dans le cou, dans 100 µL de PBS 1X. Ces animaux ont reçu trois injections de l'agoniste CL264 à une dose de 40 µg/100 µL de PBS 1X, par voie intratumorale, tous les trois jours pendant 6 jours, c'est-à-dire au jour (J) 0, 3 et 6. Neuf jours après la première administration des cellules tumorales, les souris ont reçu trois injections de cisplatine, par voie intrapéritonéale, tous les trois jours (J9, J12 et J15) à une concentration de 40 µg/100 µL.

3.4.2. Effets de l'antagoniste de TLR7 IRS661 sur la progression tumorale chez les C57BL/6 et NOD/SCID

Les souris C57BL/6 ou NOD/SCID ont reçu une injection de 1 million de cellules LLC ou A549, respectivement, par voie sous-cutanée dans 100 µL de PBS 1X. Ces animaux ont reçu une co-injection d'agonistes (40 µg/100 µL de loxoribine (NOD/SCID) et 40 µg/100 µL de CL264 (C57BL/6)) et/ou d'antagonistes (40 µg/100 µL d'IRS661 ou d'ODN) de TLR7 tous les trois jours pendant six jours, c'est-à-dire à J0, J3 et J6. Au jour 9, les souris ont reçu une injection de cisplatine, tous les trois jours (à J9, J12 et J15) à une concentration de 40 µg/100 µL. Tous ces produits ont été dilués dans du PBS 1X. La taille de la tumeur a été mesurée tous les trois jours.

Chez les souris immunocompétentes, j'ai étudié l'effet thérapeutique de l'antagoniste IRS661 lorsque les tumeurs étaient déjà palpables. Pour cela, 1 million de cellules LLC diluées dans 100 µL de PBS 1X ont été injectées aux souris C57BL/6. Tous les trois jours pendant 6 jours (à J0, J3 et J6), les animaux ont reçu une injection d'agoniste CL264 à une concentration de 40 µg/100 µL. Dès que la taille de la tumeur atteignait 500 mm^3, les souris ont reçu des injections d'antagoniste de TLR7 (IRS661) à une concentration de 120 µg/100 µL

ou de son contrôle (ODN) par voie intra-tumorale. Ces injections ont été faites toutes les 72 heures tout au long de l'expérience.

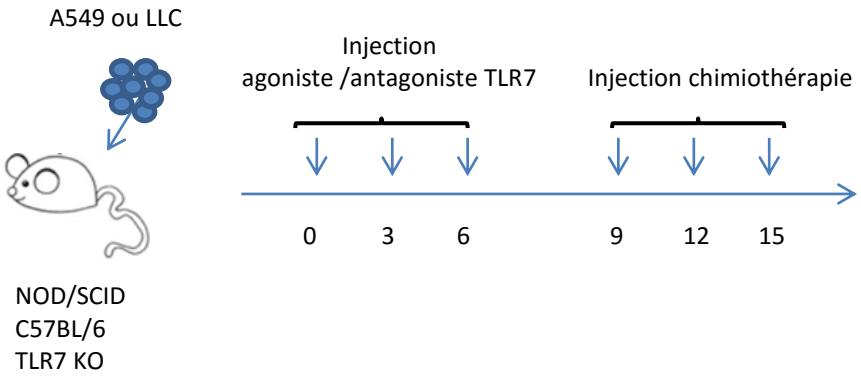


Figure 11 : Schéma des expériences réalisées *in vivo.*
A J0 les souris ont reçu 1 million de cellules cancéreuses par voie sous-cutanée au niveau du cou. A J0, J3 et J6, les souris reçoivent des injections de l'agoniste (Loxoribine ou CL264) et/ou de l'antagoniste (IRS661 ou ODN) de TLR7. Neuf jours après la greffe de cellules tumorales, les souris ont reçu trois injections de cisplatine (à J9, J12 etJ15).

3.5. Etude de l'apparition des métastases par imagerie in vivo

Le principe de cette technique repose sur la détection de la bioluminescence *in vivo*. En effet, la luciférine va être dégradée par la luciférase produite par les cellules tumorales. Cette réaction va induire le relargage de photons que l'appareil IVIS (Lumina II de Caliper) va détecter. Ceci permet de localiser les cellules tumorales (*Figure 12*) car l'intensité de bioluminescence est corrélée avec la quantité de cellules.

Des souris NOD/SCID ont reçu une injection par voie sous-cutanée au niveau de la cuisse, de 10^6 millions de cellules LLC_luc resuspendues dans 100µL de PBS 1X. Tous les trois jours et pendant six jours (à J0, J3 et J6) les souris ont reçu une injection intra-tumorale de l'agoniste de TLR7, le CL264, à une dose de 40 µg/100 µL de PBS 1X.
A partir du jour 4, les souris ont reçu des injections par voie intra-péritonéale de 100µL de D-luciférine K+ salt (Interchim) (225mg/kg). Ces injections ont été réalisées toutes les 72 heures. Les souris sont ensuite endormies à l'isoflurane et les mesures de bioluminescence sont effectuées 5 minutes après l'administration de la luciférine grâce à l'appareil IVIS Lumina II. Le temps d'exposition pour chaque mesure a été de 5 minutes à un « binning »

(technique d'acquisition numérique qui consiste à regrouper plusieurs pixels du capteur de la caméra sur une ou deux directions) réglé à 4, une taille « object height » de 1.5 et un champ de vision D (à J4 et lors de l'apparition des deuxièmes masses tumorales) ou B (pour regarder la cage thoracique au début des expériences).

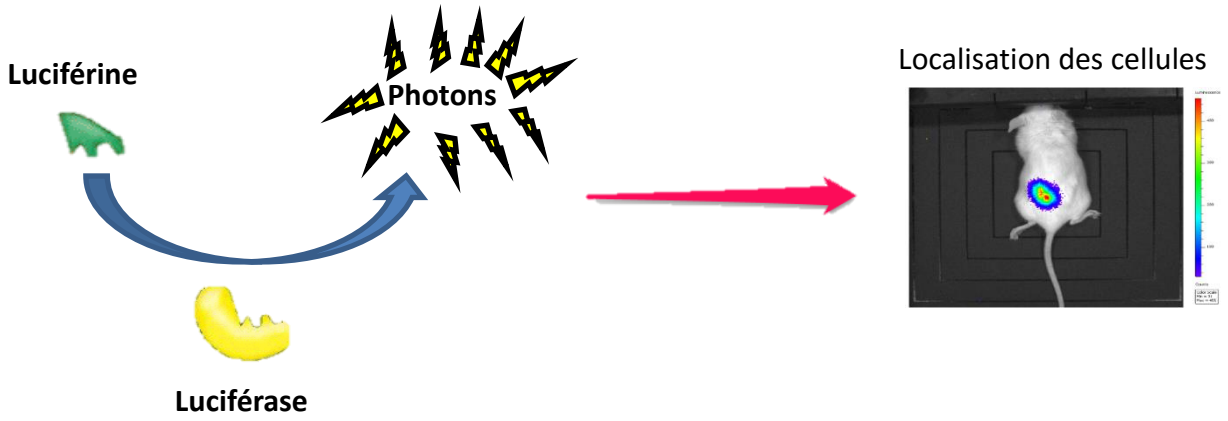


Figure 12 : Principe de la détection des métastases par bioluminescence.
La luciférine va réagir avec la luciférase produite par les cellules LLC_Luc injectées aux souris. Ceci va induire un relargage de photons que l'appareil IVIS va détecter. Ce système permet de localiser les cellules LLC_Luc et d'observer leur densité.

3.6. Détection des métastases pulmonaires par coloration

Cette technique permet de réaliser la détection et la quantification des métastases pulmonaires qui sont difficilement détectables à l'œil nu (*Figure 13*). Les souris C57BL/6 sauvages et déficientes pour TLR7 ont reçu une injection de 10^6 millions de cellules LLC dans 100 µl de PBS 1X par voie sous-cutanée, au niveau du cou des souris. Tous les trois jours pendant six jours (J0, J3 et J6), les souris ont reçu une injection intra-tumorale de l'agoniste de TLR7 CL264 à une dose de 40 µg/100 µL de PBS 1X. Entre J22 et J24, selon leur état, les souris ont été sacrifiées. Avec l'aide de ciseaux et de pinces de dissection, la cage thoracique de l'animal est incisée. Une injection de 1mL d'encre de chine diluée à une concentration de 7.5% dans du PBS 1X est réalisée par voie intra-trachéale. Les poumons sont prélevés et rincés dans du PBS 1X. Chaque lobe est dissocié et le tissu conjonctif est retiré, avant de déposer les organes dans des tubes en polypropylène contenant 1 ml de solution de Feket

(solution composée de 300 ml d'éthanol 70%, 30 ml de formaldéhyde 37% et 5 ml d'acide acétique-glacial). La solution Feket est conservée à 4°C. Les métastases pulmonaires sont comptées les jours suivants sous une sorbonne.

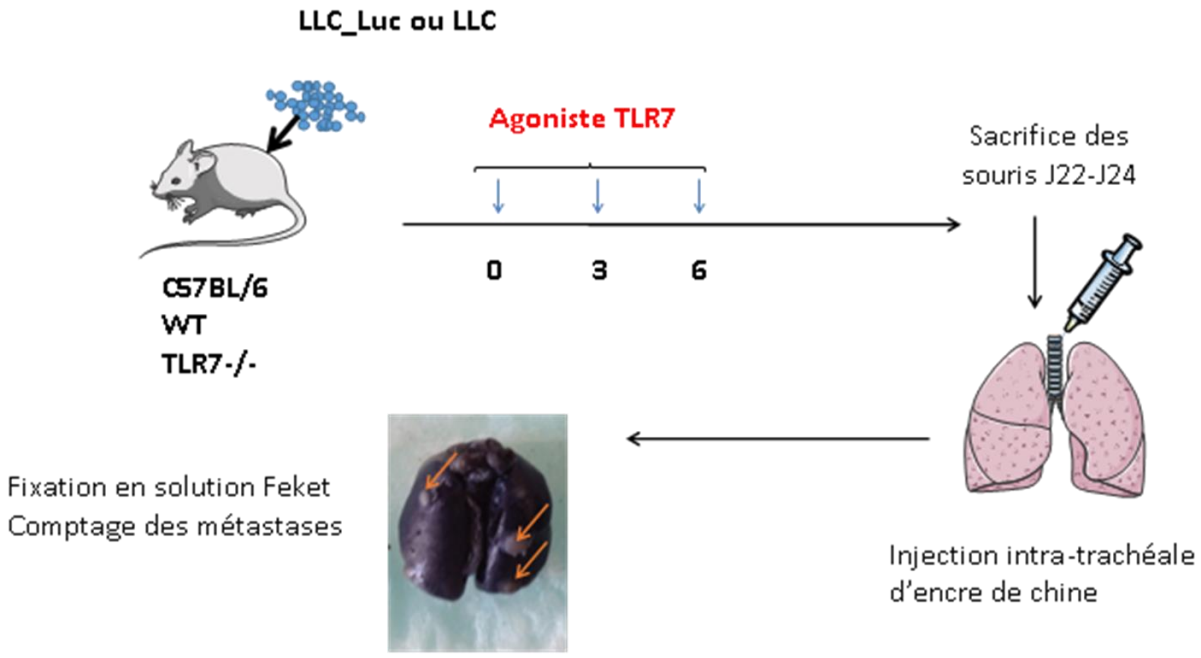


Figure 13 : Détection des métastases par coloration des poumons.
A J22-24 après la greffe des cellules tumorales, les souris sont sacrifiées. L'encre de chine est administrée par voie intratrachéale. Les poumons sont prélevés et conservés dans la solution Feket qui permet le comptage des métastases, apparaissant en blanc alors que le poumon est noir.

3.7. Effet de la déplétion des MDSC sur la formation des métastases

Les souris C57BL/6 sauvages et déficientes pour TLR7 ont reçu une injection de 1 million de cellules LLC resuspendues dans 100 µL de PBS 1X par voie sous-cutanée (SC). Ces animaux ont reçu trois injections de l'agoniste CL264 à une dose de 40 µg/100 µL de PBS directement dans la tumeur préalablement détectée au toucher, tous les trois jours pendant 6 jours, c'est-à-dire aux jours 0, 3 et 6. Lorsque les tumeurs étaient palpables et toute les 48 heures, l'anticorps anti-GR1 (RB6-875, BioXCell) ou son contrôle isotypique(LTF-2, BioXCell) a été administré à une dose de 200 µg/100 µL de PBS 1X.

A J11, une vérification de la déplétion a été faite. 200 µL du sang ont été prélevés par voie rétro-orbitale à 4 souris de chaque groupe. Les échantillons sont déposés dans des microtubes avec 50 µL d'Héparine. Les tubes sont agités immédiatement afin d'empêcher la formation des caillots sanguins. Pour lyser les globules rouges, 1mL de solution ACK (chlorure d'ammonium 0,15M ; carbonate de potassium 10 mM ; EDTA 0,1 mM ; pH 7,2-7,4) est ajouté aux échantillons qui sont ensuite incubés 5 minutes à température ambiante puis centrifugés 30 secondes à 10 000 rpm. Après avoir enlevé le surnageant à la pipette, 500 µL de solution ACK sont déposés dans chaque tube et une centrifugation de 30 secondes à 10 000rpm est faite immédiatement. Le surnageant est prélevé et le culot est resuspendu dans 1 mL de PBS-BSA 0,5%-EDTA 2 mM (PBS-BSA-EDTA). Les échantillons sont ensuite filtrés avec un filtre de 70 µm et 180 µL sont déposés en plaque 96 puits.

La plaque est centrifugée 2 minutes à 1600 rpm et le surnageant est enlevé par bref renversement. Les récepteurs Fc sont bloqués en incubant les échantillons 20 minutes à 4°C avec 50 µL de 24G2 (produit au laboratoire) par puits à une dilution de 1/100ème. La microplaque est ensuite centrifugée 2 minutes à 1600 rpm et le surnageant est de nouveau enlevé. Les puits sont lavés avec 100 µL de PBS-EDTA-BSA, puis centrifugés 2 minutes à 1600 rpm. Après avoir enlevé le surnageant, on ajoute 50 µL du mix d'anticorps dans chaque puits correspondant: anti-CD45-PeCy7 (BD ParMingen, 552848) à 1/800ème, Live Dead (Life Technologies, L34959) à 1/100ème, anti-Gr1-PerCpCy 5.5 (BD ParMingen, 552093) à 1/100ème, anti-CD11b-eF450 (eBioscience, 48-0112-80) à 1/100ème, anti-CD317-BV651 (Bioegend, 127019) à 1/100ème et anti-CD11c-PE (eBioscience, 12-0114-83) à 1/100ème. Les cellules sont incubées avec les anticorps 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Une fois que le marquage est terminé, la plaque est centrifugée 2 minutes à 1600 rpm et le surnageant retiré. Les cellules sont lavées avec 100 µL de PBS-BSA-EDTA et re-centrifugées 2 minutes à 1600 rpm. Après avoir enlevé le surnageant, les cellules sont resuspendues dans 100 µL de PBS-BSA-EDTA et mis dans des tubes FACS dans lesquels 300µL de PBS-BSA-EDTA avaient été préalablement ajoutés. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux avec l'appareil LSRFortessa (BD).

3.8. Etude de l'expression du gène CCR4 par RT-PCR quantitative en temps réel

Préparation des échantillons : Des plaques 6 puits ont été ensemencées à des concentrations cellulaires de un million de cellules LLC dans 2 mL de milieu complet. Au jour 1, les cellules ont été stimulées pendant 6 ou 12 heures avec 10 µg/mL ou 40 µg/mL d'agonistes de TLR7 (Imiquimod, CL264 ou Loxoribine). Les cellules sont ensuite lavées au PBS 1X (500 µL) et incubées en présence de trypsine (500 µL par puits, à 37°C). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 1 mL de PBS 1X et centrifugées 5 minutes à 1500 rpm. Le culot est resuspendu dans 700 µL de tampon de lyse RLT fourni dans le kit d'extraction d'ARN utilisé ensuite (RNeasy Mini Kit Qiagen) + 10 µL/mL de β-mercaptoéthanol à une concentration initiale de 50 mM. Elles sont placées sur la glace et congelées rapidement à -80ºC.

Extraction d'ARN : Pour l'extraction d'ARN, j'ai utilisé le kit « RNeasy mini kit » (Qiagen). Les échantillons sont décongelés lentement sur glace. Après décongélation, 700 µL d'éthanol 70% RNAse free sont rajoutés et bien homogénéisés aux échantillons. 700 µL de ce mélange sont déposés sur une colonne d'extraction composée de silice et pouvant retenir jusqu'à 100µg d'ARN. Le principe repose sur l'affinité de la colonne avec les ions négatifs qui chargent l'ARN. Les colonnes sont centrifugées à 10 000 rpm pendant une minute. Le liquide récupéré dans le tube collecteur sous la colonne est vidé. Les 700 µL restant des échantillons sont déposés sur ces mêmes colonnes et sont centrifugées une deuxième fois de la même manière. A partir de cette étape, toute la manipulation, jusqu'à l'élution se fait à température ambiante. Les membranes sont ensuite lavées avec 700 µL de tampon RW1 et centrifugées une minute à 10 000 rpm. Le tube collecteur est alors changé. 500 µl de solution RPE sont ajoutés sur les colonnes qui sont ensuite centrifugées une minute à 10 000 rpm. Un deuxième lavage avec la solution RPE est réalisé mais cette fois-ci les colonnes sont centrifugées deux minutes à 10 000 rpm pour être sûr de bien éliminer tout l'alcool présent sur la colonne car la présence de ce dernier peut perturber les expériences ultérieures que l'on va faire avec l'ARN. Le tube collecteur est de nouveau changé et une centrifugation à vide d'une minute à 10 000 rpm est faite. Un microtube de 1,5 ml est alors placé sous la colonne pour l'élution de l'ARN. 40 µL d'eau RNAse free sont déposés au centre de la

membrane des colonnes d'extraction, sans la toucher. Les tubes sont ensuite centrifugés une dernière fois pendant une minute à 10 000 rpm. Les ARN sont placés immédiatement sur la glace. Un aliquot de 2 µL de l'éluat est mis de côté, nécessaire au dosage d'ARN.

La quantité et la qualité des ARN totaux extraits sont ensuite quantifiées à l'aide de nanopuces à ARN du kit *RNA 6000 Nano Kit* et du *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) selon le protocole du fabricant. Le bioanalyseur Agilent 2100 constitue la méthode standard pour le contrôle qualité des échantillons d'ARN et remplace dans ce domaine l'électrophorèse sur gel qui demandait beaucoup de travail. Ses avantages tiennent principalement à l'amélioration de la précision et de la reproductibilité des données, à la faible durée des analyses, à la consommation minimale d'échantillon et à l'amélioration de l'automatisation et de l'intégration des analyses dans les processus complexes. Le bioanalyseur Agilent 2100 utilise la microfluidique pour l'analyse d'échantillons biologiques. Pour des lignées cellualires, nous retenons pour les expériences les échantillons dont le numéro d'intégrité de l'ARN (RIN) est supérieur à 8.5.

1µg d'ARN par échantillon sont rétro-transcrits grâce au kit *High CapacitycDNA Reverse Transcription* (AppliedBiosystems). Le mix réactionnel est composé de 2,5 µL de RT-buffer (10X initial), de 1 µL de dNTP (25X initial), de 2,5 µL de random primer (10X initial), de 1 µg d'ARN, de 1,25 µL d'enzyme Reverse Transcriptase, de 1,25µL d'inhibiteurs de RNase et de quantité d'eau RNase-Free suffisante pour avoir 16,5 µL final. Le cycle de rétro-transcription se compose d'une phase de 5 minutes de dénaturation à 95°C, d'une phase de rétro-transcription/amplification de 2 heures à 37°C et d'une phase terminale de dénaturation de 5 min à 95°C.

L'étude de la variation d'expression du gène *CCR4* se fait par RT-PCR quantitative en temps réel selon la technologie Taqman sur un appareil Applied Biosystems 9700HT. Chaque sonde Taqman est couplée à un fluorochrome FAM (5-Carboxyfluorescein) qui permettra le suivi en temps réel de l'amplification des ADNc de départ et leur quantification en temps réel via la mesure du nombre de cycles nécessaire pour atteindre un seuil défini de fluorescence émise dans chaque puits. Le mélange réactionnel d'un volume final de 20µL par puits est composé de : 1µL de la sonde Taqman 20X + 10µL de Taqman MasterMix 2X, de 0 ,25µL d'ADNc et de 8,75µL d'eau. Chaque échantillon est présent en duplicat sur la plaque.

La plaque est ensuite scellée par un film spécifique permettant d'éviter l'évaporation, puis centrifugée brièvement. Le cycle produit par l'appareil de PCR quantitative en temps réel est le suivant :

1 cycle de 2 minutes à 50°C

1 cycle de 10 minutes à 95°C

40 cycles de 15 secondes à 95°C + 1 minute à 60°C

A la fin de cette PCR quantitative en temps réel, les données sont analysées via deux logiciels spécifiques : SDS2.3 et RQ Manager1.2.1 (de Applied Biosystems).

Pour mesurer la variation de l'expression des gènes, les résultats sont normalisés dans un premier temps. Pour chaque échantillon, on mesure le ΔCt= (Moyenne du duplicat des Ct d'un échantillon) - (Moyenne du duplicat des Ct du gène endogène de ce même échantillon).

Pour comparer deux situations, on procède au calcul du $\Delta\Delta$Ct= ΔCt échantillon1- ΔCt échantillon2. Afin de transcrire ce résultat en terme de « nombre de fois plus ou moins exprimé », on calcule la variation d'expression de gènes avec la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*Matt Xia, 2010).*

3.9. Marquage par immunohistochimie d'E-cadhérine

Grâce à la collaboration avec les équipes de chirurgie et d'anatomopathologie de l'Hôpital de Cochin, j'ai pu étudier l'expression de l'E-cadhérine et de Twist, deux protéines liées à la transition épithelio-mésenchymateuse (TEM), sur des coupes de tumeurs de patients atteints de CPNPC (*Tableau 4*). Des tumeurs de souris stimulées ou non par l'agoniste de TLR7 ont également été récupérées, fixées avec du formaldéhyde 4% et inclus en paraffine.

	Cohorte complète (18)	Forte expression de TLR7 (9)	Faible expression de TLR7 (9)
Sexe			
Homme	15 (83,3 %)	8	7
Femme	3 (16,6 %)	1	2
Type de cancer			
Adénocarcinome	12 (66,6 %)	7	5
Carcinome épidermoïde	7 (38,8 %)	3	4
Stades du cancer			
Stade I	9 (50 %)	4	5
Stade II	7 (38,8%)	4	3
Stade III	2 (11,1%)	1	1
Stade IV	0	0	0
Survie			
Décédé	11 (61,1%)	6	5
Vivant	7 (38,8%)	3	4

Tableau 4 : Composition de la cohorte de 18 patients atteints de CPNPC.

Les lames sont séchées 30 minutes à 37°C. Elles sont ensuite déparaffinées avec 3 bains successifs de 5 minutes de Clearene (Leica), puis 4 bains de 5 minutes à concentration décroissante d'éthanol (100%, 90%, 70% et 50%) et un dernier bain d'eau distillée. Le démasquage des sites antigéniques est ensuite réalisé en solution de citrate pH6, pendant 30 minutes à 97°C au bain marie. Lorsque le démasquage est terminé, on laisse refroidir les lames dans les solutions de démasquage 30 minutes à température ambiante et puis les lames sont stockées en solution TBS 1X.

Les lames sont ensuite incubées 15 minutes avec de l'eau oxygénée pour bloquer les peroxydases présentes naturellement dans les tissus. Pour bloquer les sites non spécifiques, les lames sont incubées 30 minutes avec 5% de Blocking Protein (Dako,) (reconnaissant les récepteurs de la fraction C). Les anticorps primaires sont dilués dans la solution Dako real, antibody diluent. L'anti-E-cadhérine (Dako M3613) est dilué au 1/100ème, et les lames incubées une heure à température ambiante et en chambre humide. L'anticorps secondaire

utilisé est un âne anti-lapin couplée à la biotine (JIR 715-066-150), dilué au 1/200ème avec une incubation des lames pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames sont ensuite incubées 30 minutes avec de la streptavidine-HRP (Dako) (1/300ème) pour amplifier le signal. Après chaque incubation, les lames sont lavées 5 minutes avec de TBS 1x + 0.04% Tween. Le marquage a été révélé en utilisant le kit DAB (Dako, K3468). La révélation est arrêtée en plaçant les lames dans de l'eau. Elles sont contre-colorées à l'hématoxyline (2 minutes) et montées en glycergel (Dako, C0563)

3.10. Analyses statistiques

Pour les expériences *in* vivo, les courbes représentent la moyenne de la taille de la tumeur pour chaque groupe de souris avec n=5 souris par groupe. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Sofware), en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. Sur les figures de résultats sont indiquées les valeurs de p selon la légende suivante :*:$p<0,05$; **:$p<0,01$; ***:$p<0,001$. Les expériences ont été réalisées trois fois de manière indépendante (sauf indication contraire).

4. RESULTATS

4.1. Effet pro-tumoral de la stimulation de TLR7

4.1.1. Rôle de TLR7 exprimé par les cellules tumorales et les cellules immunitaires de l'hôte

Lors de précédentes études menées au laboratoire, il a été observé la présence de lymphocytes T et B, de cellules NK et de DC matures et immatures au sein du microenvironnement tumoral *(Germain et al., 2014; Gillard-Bocquet et al., 2013; Goc et al., 2014; Remark et al., 2013*). Parmi ces cellules immunitaires, certaines expriment TLR7 notamment les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), les cellules NK et les lymphocytes B (*Dajon et al., 2015; Drobits et al., 2012*). Ainsi, *in vivo*, les cellules immunitaires et les cellules tumorales expriment le récepteur TLR7 et la stimulation de TLR7 par un ligand agoniste pourrait conduire *in situ* à un effet pro- ou anti-tumoral *(Chatterjee et al., 2014; Drobits et al., 2012*). Il a été montré par l'équipe que l'injection de CL264 (agoniste synthétique de TLR7) a un effet pro-tumoral chez des souris immunocompétentes ayant reçu une greffe sous-cutanée de cellules murines d'adénocarcinomes (LLC) *(Chatterjee et al., 2014*). Afin de mieux caractériser le rôle de TLR7 dans la progression tumorale, j'ai réalisé des expériences similaires dans des souris C57BL/6 déficientes pour TLR7 ($TLR7^{-/-}$). Les cellules immunitaires de ces animaux n'expriment pas le récepteur TLR7 alors que les cellules tumorales greffées l'expriment. J'ai injecté des cellules LLC à des souris sauvages C57BL/6 WT (WT=Wild Type) et C57Bl/6 $TRL7^{-/-}$. Les souris ont reçu trois injections de CL264 aux jours 0, 3 et 6 de l'expérience, puis 3 injections de cisplatine, aux jours 9, 12 et 15 de l'expérience. Les groupes contrôles ont reçu du PBS 1X au lieu de l'agoniste et/ou du cisplatine.

Lorsque les souris sont traitées avec l'agoniste du récepteur TLR7, j'ai observé un effet pro-tumoral, c'est-à-dire une augmentation de la taille de la tumeur chez ces souris par rapport au groupe de souris contrôle. Nous savons que l'administration d'un traitement chimiothérapeutique induit un effet anti-tumoral dans les souris WT et $TLR7^{-/-}$. J'ai observé que cet effet anti-tumoral disparaissait lorsque les souris ont reçu l'agoniste de TLR7 (*Figure 14*). Ces résultats démontrent que l'effet pro-tumoral observé *in vivo* est dû à l'expression de TLR7 par les cellules tumorales.

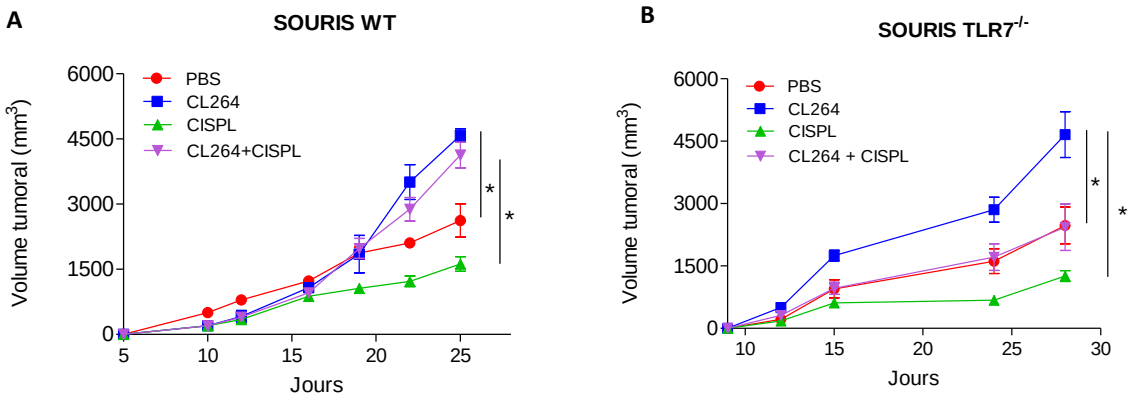


Figure 14 : Effet pro-tumoral du CL264 chez les souris sauvages et déficientes en TLR7.
Suivi de la croissance tumorale dans (A) les souris sauvages (WT) et (B) déficientes en TLR7 (TLR7 -/-) ayant reçu une greffe de 1 million de cellules LLC par voie sous-cutanée. Le CL264 est injecté par voie intra-tumorale, à raison de 40 µg dans 100 µL de PBS 1X aux jours 0, 3 et 6. Le cisplatine a été injecté par voie intra-tumorale aux jours 9, 12 et 15 à une dose de 40 µg dans 100 µL de PBS 1X. Les tests statistiques utilisés sont de type Mann Whitney (*:p<0,05).

4.1.2. Etude de l'effet anti-tumoral d'un antagoniste de TLR7

4.1.2.1. Effet prophylactique de l'IRS661

Des séquences d'oligonucléotides immunorégulatrices (courtes séquences d'ADN), appelées IRS, ont été utilisées dans diverses études comme antagonistes de TLR7 et TLR9. L'IRS661, composé de 20 nucléotides phosphorothioates, a été utilisé comme antagoniste spécifique de TLR7 *(Pawar et al., 2007 ; Barrat et al., 2005)*. Nous avons voulu déterminer si cet antagoniste avait un effet inhibiteur de l'agoniste de TLR7 dans la progression tumorale. Pour cela, des cellules A549 et LLC ont été injectées respectivement par voie sous-cutanée, chez des souris NOD/SCID et C57BL/6. Les souris ont ensuite reçu des injections de loxoribine ou de CL264 (agonistes), en combinaison avec l'IRS661 (antagoniste) ou l'ODN contrôle de l'oligonucléotide IRS661.

Je n'ai constaté aucun effet sur la progression tumorale chez les souris immunocompétentes ou immunodéprimées qui n'ont reçu que l'antagoniste du TLR7 par rapport au groupe de souris contrôle n'ayant reçu que du PBS 1X. Les deux groupes développent des tumeurs de taille approximativement identique. En revanche, chez les souris ayant reçu une injection d'antagoniste IRS661 en combinaison avec la loxoribine ou le CL264, j'ai observé une diminution de la croissance tumorale (*Figure 15*). Un effet anti-tumoral est observé lors d'une co-injection d'agoniste et d'antagoniste dans les deux modèles des souris.

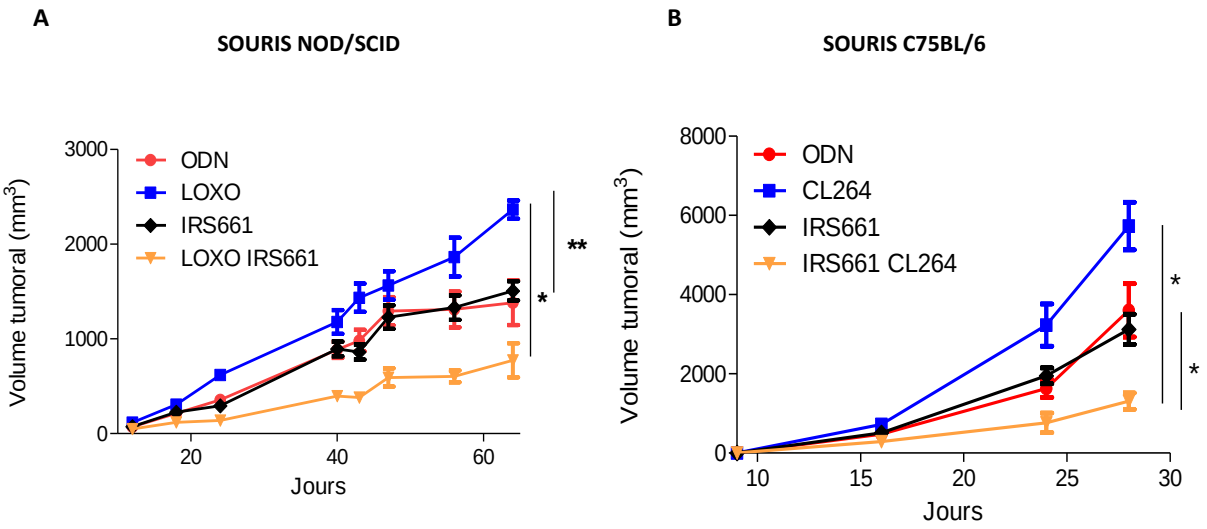


Figure 15 : La combinaison agoniste-antagoniste du récepteur TLR7 a un effet anti-tumoral *in vivo*. Suivi de la croissance tumorale dans les souris (A) NOD/SCID et (B) C57BL/6 ayant été traitées par la loxoribine (agoniste), l'IRS661 (antagoniste), l'ODN (contrôle négatif antagoniste). Les tests statistiques utilisés sont de type Mann Whitney (*:p<0,05; **:p<0,01).

4.1.2.2. Effet thérapeutique de l'IRS661

Jusqu'à présent, l'IRS661 avait été administré à J0, J3 et J6, c'est-à-dire en début d'expérience, avant la présence d'une tumeur palpable. J'ai par la suite testé s'il était possible d'obtenir le même effet anti-tumoral lorsque l'antagoniste est injecté à des temps plus tardifs, une fois que les tumeurs étaient palpables, afin de démontrer un effet thérapeutique. Pour cela, les souris C57BL/6 ayant reçu les cellules LLC ont été traitées par l'agoniste CL264 à J0, J3 et J6. Lorsque la taille des tumeurs atteignait un volume de 500 mm^3, l'IRS661 ou son contrôle ODN a été injecté toutes les 72 heures par voie intra-tumorale. J'ai pu observer que l'administration tardive de l'antagoniste de TLR7 seul n'avait aucun effet sur la progression tumorale dans les souris traitées comparé au groupe contrôle. Les tumeurs se développaient de la même manière. En revanche, l'administration conjointe de l'agoniste et de l'antagoniste (même injecté à des temps tardifs) inhibe l'effet pro-tumoral de l'agoniste (*Figure 16*). Toutefois, l'effet sur la progression tumorale n'est pas aussi fort que celui observé dans les expériences précédentes où l'antagoniste était injecté en début d'expérience.

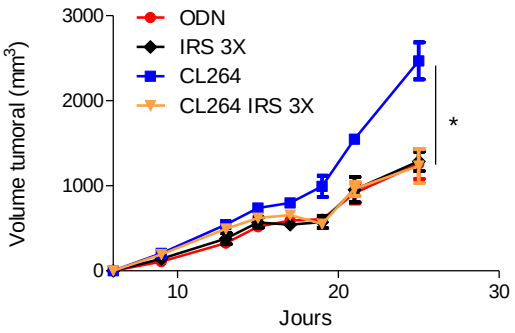


Figure 16 : L'administration tardive d'IRS661 inhibe l'effet pro-tumoral de l'agoniste de TLR7 chez les souris C57BL/6.
L'IRS661 a été injecté lorsque les tumeurs atteignaient une taille de 500 mm^3 et toutes les 72 heures à partir de ce moment-là. Les tests statistiques utilisés sont de type Mann Whitney (* : $p<0,05$).

4.2. Impact de TLR7 dans la survenue des métastases

4.2.1. Détection *in vivo* des métastases

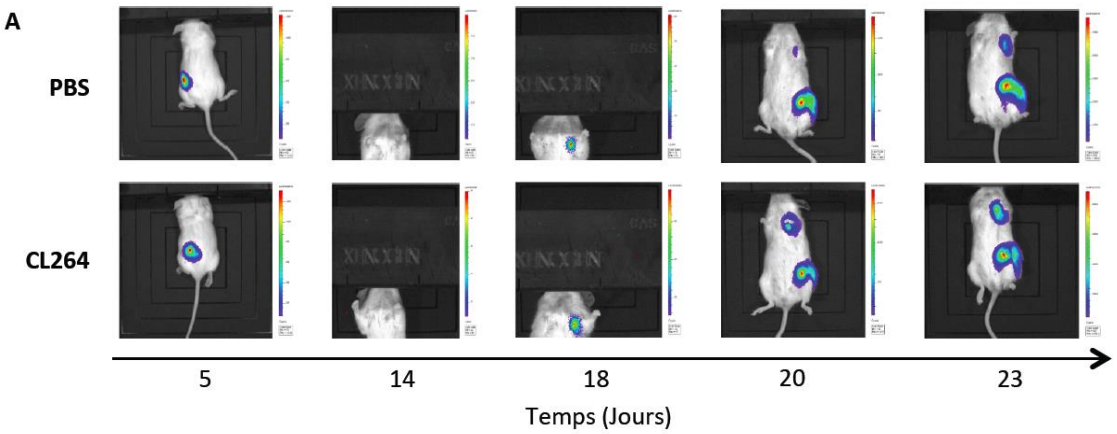
4.2.1.1. Effet pro-métastatique de TLR7 dans un modèle de souris NOD/SCID

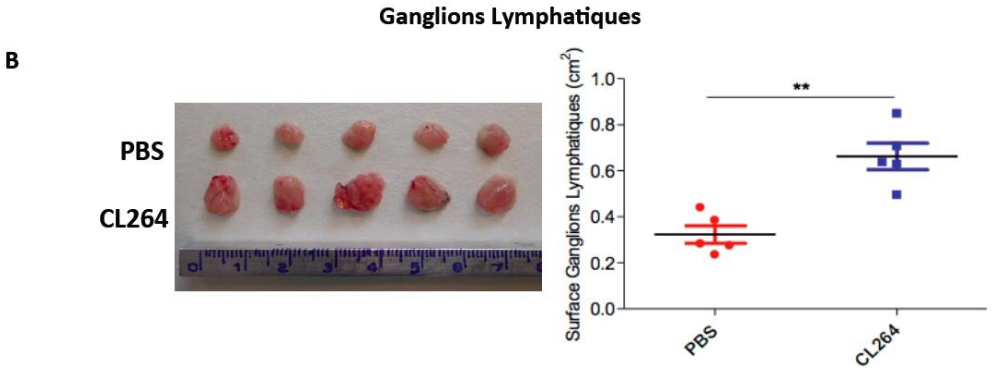
Des études ont montré que la stimulation des TLRs peut induire une augmentation de la migration des cellules tumorales. Ainsi, en 2014, l'équipe de Yang démontrait que la stimulation de TLR4 était associée à la migration des cellules du cancer du sein *(Yang et al., 2014)*. J'ai voulu savoir si la stimulation de TLR7 pouvait induire une augmentation de la survenue des métastases dans nos modèles tumoraux. Pour cela, des cellules LLC qui expriment la luciférase (LLC_luc) ont été injectées au niveau de la cuisse des souris NOD/SCID. Ces cellules tumorales peuvent être localisées *in vivo* grâce à un système d'imagerie permettant de mesurer la bioluminescence après injection de luciférine aux animaux. Les cellules tumorales ont été injectées au niveau de la cuisse afin de pouvoir visualiser la bioluminescence au niveau des poumons, sans interférence de signaux entre la tumeur initiale et les métastases. Les souris NOD/SCID ont été utilisées dans ces expériences, en partie en raison de leur pelage blanc qui permet une détection aisée de la bioluminescence. Les souris ont reçu 3 injections de CL264. Pour détecter les masses tumorales, les souris ont reçu une injection de 225mg/kg de luciférine par voie intrapéritonéale. Cette molécule va réagir avec la luciférase présente dans les cellules et va émettre des photons que l'appareil IVIS Lumina va pouvoir détecter sur les souris préalablement anesthésiées. Grâce à cette technique, j'ai pu étudier la cinétique d'apparition des métastases dans les souris immunodéficientes.

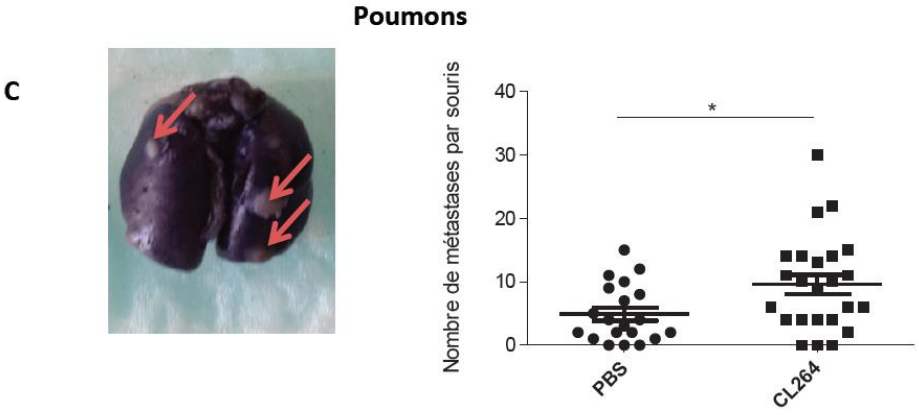
La figure 17A montre l'apparition d'une deuxième masse tumorale au niveau de la cage thoracique qui grandit au cours du temps dix-huit jours après la greffe des cellules tumorales. Six jours après la détection de cette masse, j'ai sacrifié les souris et j'ai autopsié les animaux afin d'étudier la nature de cette masse tumorale. J'ai également constaté que la taille des ganglions lymphatiques axillaires avait augmenté. La figure 17B montre que cette augmentation de taille était plus élevée chez les souris ayant reçu une stimulation de TLR7 en comparaison avec le groupe de souris contrôle.

Etant donné que l'apparition de cette deuxième masse était localisée au niveau de la cage thoracique et que la lignée cellulaire injectée est d'origine pulmonaire, j'ai regardé si les cellules tumorales avaient envahi les poumons. J'ai coloré les poumons des animaux avec 1 mL d'encre de chine injectée par voie intra-trachéale. Ensuite, les lobes des organes ont été dissociés et conservés dans la solution de Feket qui rend les colonies métastatiques blanches. Grâce à cette solution, j'ai observé que les cellules migraient aussi dans les poumons et qu'elles y développaient des tumeurs distantes. De manière intéressante, la migration et la formation de métastases étaient plus importantes chez les souris dont TLR7 avait été stimulé que dans le groupe contrôle PBS 1X (*Figure 17C*).

Jusqu'à présent, la stimulation de TLR7 a été réalisée toutes les 72 heures pendant six jours. J'ai donc voulu savoir si une stimulation continue de TLR7 pouvait aggraver la formation des métastases chez les souris immunodéficientes. Les souris ont reçu une injection de l'agoniste CL264 toutes les 72 heures jusqu'à la fin de l'expérience. J'ai alors constaté qu'une stimulation continue de TLR7 favorisait la migration des cellules tumorales, car la formation des métastases pulmonaires était plus élevée (*Figure 17D*).


A
PBS
CL264
5
14
18
20
23
Temps (Jours)


Ganglions Lymphatiques
B
PBS
CL264
Surface Ganglions Lymphatiques (cm²)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
PBS
CL264


Poumons
C
Nombre de métastases par souris
40
30
20
10
0
*
PBS
CL264

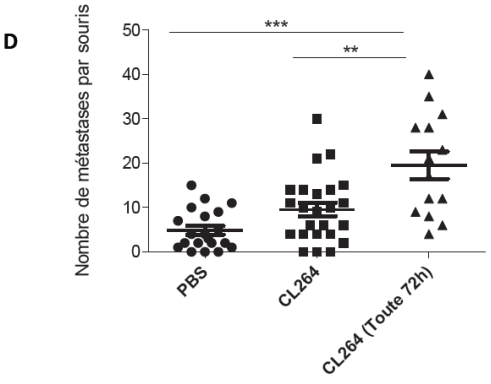

D
Nombre de métastases par souris
50
40
30
20
10
0
***
**
PBS
CL264
CL264 (Toute 72h)

Figure 17 : La stimulation de TLR7 augmente le développement des métastases.
A/ Les cellules LLC_luc induisent la formation d'une deuxième masse tumorale dans la cage thoracique dans les souris NOD/SCID à J18 qui augmente de taille au cours de temps.
B/ La taille des ganglions lymphatiques est augmentée et est plus élevée chez les souris pour lesquelles TLR7 a été stimulé.
C/ La formation des métastases pulmonaires a été étudiée en utilisant de l'encre de chine et la solution de Feket. La lignée cellulaire murine envahit également les poumons des souris et la stimulation de ce récepteur induit un développement plus important de métastases pulmonaires par rapport au groupe contrôle.
D/ La stimulation continue par le CL264 induit une formation des métastases plus importante. Les tests statistiques utilisés sont de type Mann Whitney (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

4.2.1.2. Implication de TLR7 de l'hôte dans le développement de métastases

Grâce à l'utilisation des souris NOD/SCID immunodéprimées, j'ai pu démontrer que la stimulation du récepteur TLR7 a un impact sur la formation des métastases. Bien que ces souris ne disposent pas d'un système lymphocytaire fonctionnel, leur système immunitaire myéloïde reste opérationnel. Il a été décrit dans la littérature que les macrophages, les neutrophiles et les MDSC jouent un rôle dans la formation des tumeurs secondaires *(Keskinov and Shurin, 2015 ; Galdiero et al., 2013)*. De plus, TLR7 peut être exprimé par des cellules immunitaires comme les cellules NK, les DC et les lymphocytes B *(Drobits et al., 2012*). Afin étudier l'impact que le système immunitaire, ainsi que l'expression de TLR7 par les cellules de l'hôte, pouvait avoir sur la formation de métastases lors de la stimulation de ce récepteur, les cellules tumorales murines ont été greffées à des souris C57BL/6 WT immunocompétentes et déficientes pour TRL7. Pour cela, les souris ont reçu 1 million de cellules LLC par voie sous-cutanée au niveau du cou, afin que les souris n'abiment pas la taille de la tumeur, puis trois injections de CL264, aux jours 0, 3 et 6, à une concentration de 40 µg. Entre J22 et J24, selon leur état, les souris ont été sacrifiées. Les poumons des animaux ont été colorés avec 1 mL d'encre de chine injectée par voie intra-trachéale. Ensuite les lobes des organes sont dissociés et conservés dans la solution de Feket, puis les colonies blanches ont été comptées. La figure 18 représente le nombre de métastases développées chez des souris C57/BL6 Wild-Type (WT) ayant reçu ou non le CL264. Lorsque les souris sont traitées avec l'agoniste CL264, le nombre de métastases pulmonaires est augmenté en comparaison au groupe contrôle qui a reçu des injections de PBS. En revanche, aucun effet pro-métastatique n'a été observé chez les souris déficientes pour TLR7 ayant ou non reçu une stimulation du TLR7 *(Figure 18)*. Ces résultats indiquent d'une part que l'injection de

CL264 augmente la formation des métastases pulmonaires chez les souris immunocompétentes WT, comme observé dans les souris NOD/SCID, et d'autre part, que le TLR7 de l'hôte est important lors de la formation des métastases.

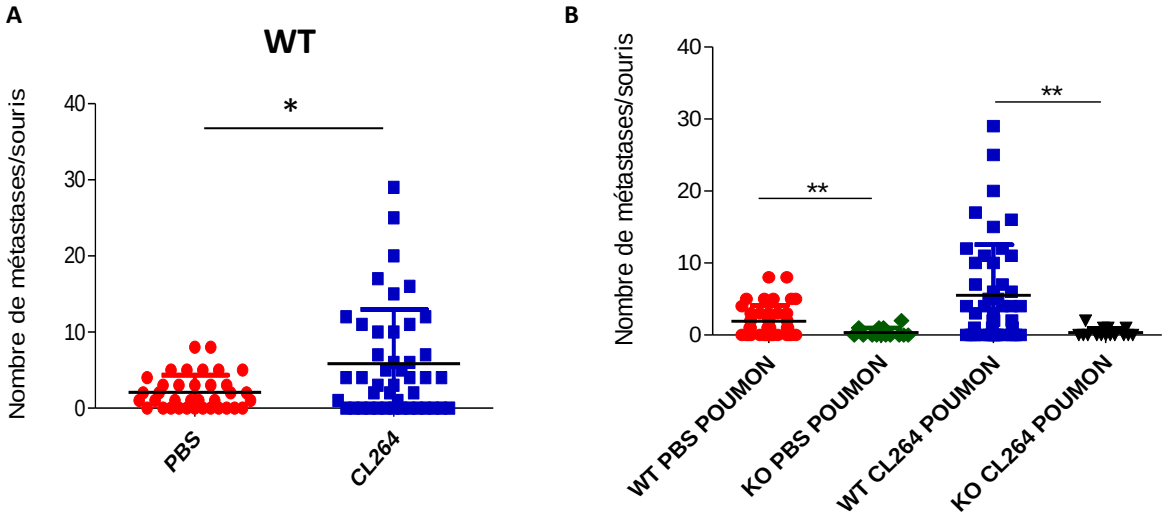


Figure 18 : L'administration de CL264 augmente la formation de métastases chez les souris WT.
La stimulation de TLR7 induit un développement plus important de métastases pulmonaires par rapport au groupe contrôle chez (A) les souris sauvages mais pas chez (B) les souris déficientes pour ce récepteur. Les tests statistiques utilisés sont de type Mann Whitney (*: $p<0,05$).

4.2.1.3. Implication des MDSC dans la formation des métastases

En 2013, l'équipe de Huang démontrait qu'une augmentation de la population de cellules MDSC $CD14^{+}$, $HLA\text{-}DR^{-/low}$ était corrélée avec la formation de métastases extra-thoraciques chez les patients atteints de cancer pulmonaire (*Huang et al., 2013*). Au laboratoire, il a été montré que la stimulation de TLR7 induisait une augmentation du recrutement de cellules MDSC dans la tumeur (*Chatterjee et al., 2014*). Il a été décrit dans la littérature que ces cellules peuvent supprimer l'activation des lymphocytes en agissant sur leur prolifération et leur production des cytokines. L'équipe de Srivastava a démontré en 2012 que lorsque les MDSC étaient déplétées, la taille de la tumeur diminuait et que la migration cellulaire était réduite *(Srivastava et al., 2012*).

Nous avons voulu étudier le rôle potentiel des MDSC dans la progression tumorale et la survenue des métastases impliquant la stimulation de TLR7. Pour cela, les populations de cellules MDSC ont été déplétées *in vivo* par injection d'anti-Gr1. Nous avons ainsi montré que la déplétion de ce type cellulaire induit une diminution de la progression tumorale chez

les souris dont TLR7 avait été stimulé (données non publiées). J'ai donc voulu étudier si cette déplétion induisait un développement de métastases moindre dans notre modèle murin, car il a été décrit dans la littérature que les MDSC peuvent induire la transition épithélio-mésenchymateuse aux temps précoces de la maladie et à long terme détruire la matrice extracellulaire (*Keskinov and Shurin, 2015*).

Dès que la tumeur était palpable, les souris ont reçu 200 µg de l'anticorps déplétant ou de l'isotype contrôle, par voie intrapéritonéale, toutes les 48 heures. Les métastases pulmonaires ont ensuite été détectées par la technique de coloration à l'encre de chine. Au cours de l'expérience, l'efficacité de la déplétion des MDSC a été vérifiée dans le sang des souris (*Figure 19A*). Sur la figure 19B on observe que la déplétion de ce type cellulaire diminue la progression tumorale induite par la stimulation de TLR7 (en noir) par rapport au groupe contrôle (en bleu). Une fois les souris sacrifiées, les poumons ont été colorés à l'encre de chine et conservés dans la solution Feket pour, ensuite, réaliser un comptage de métastases. Lorsque les MDSC ont été déplétés, une diminution de la formation de métastases a été observée chez les souris dont TLR7 avait été stimulé par rapport aux souris contrôles (*Figure 19C*).

Ces résultats montrent que la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales augmente la survenue des métastases par un mécanisme impliquant les MDSC.

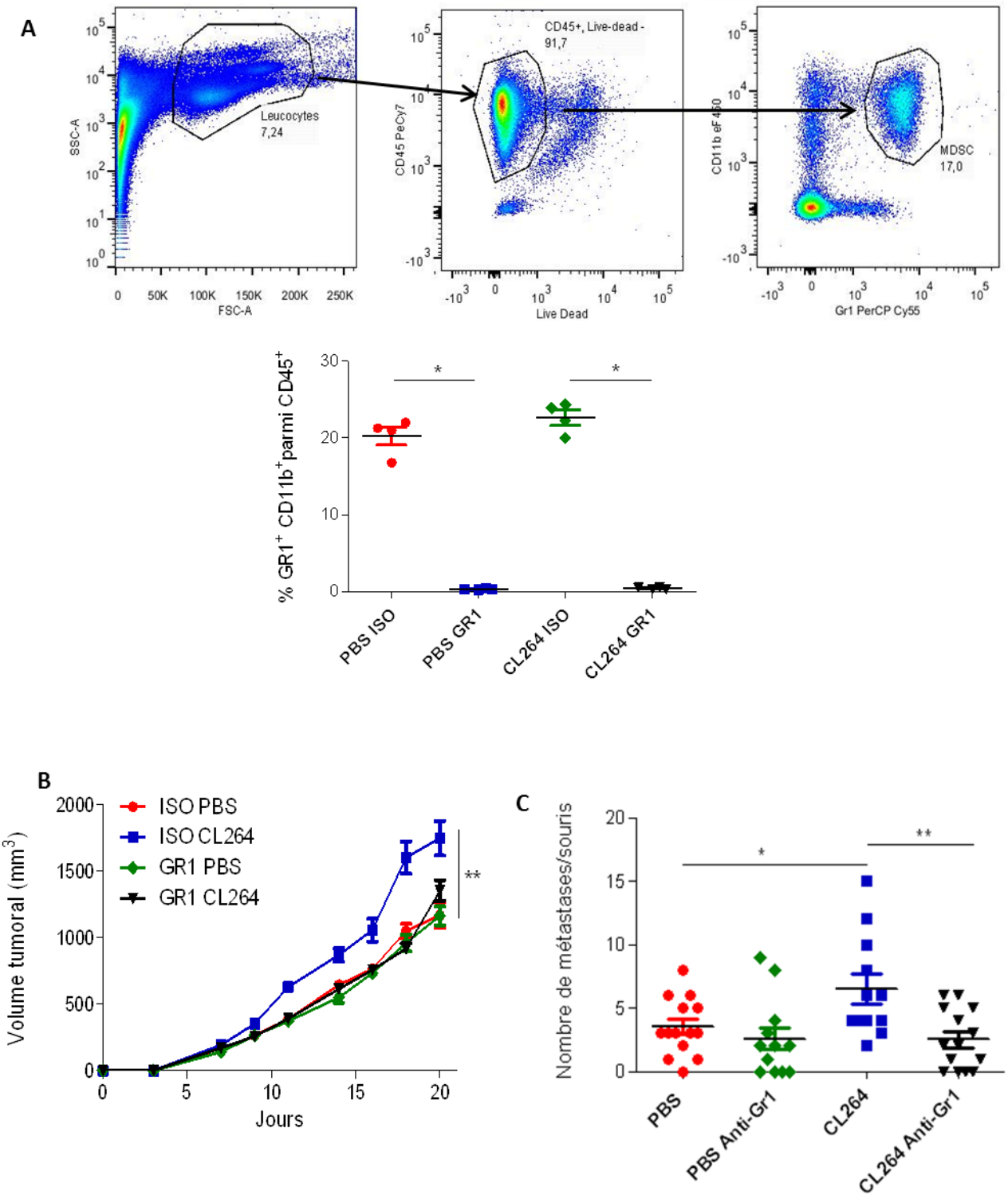


Figure 19 : La déplétion de MDSC diminue le développement des métastases induites par TLR7.
A/ Vérification de la déplétion des MDSC dans le sang.
B/ L'effet pro-tumoral de TLR7 est diminué après déplétion des MDSC. C/ La formation des métastases pulmonaires a été étudiée en utilisant de l'encre de chine et la solution de Feket. La déplétion des MDSC semble diminuer la formation des métastases chez les souris ayant reçu l'agoniste de TLR7. Les tests statistiques utilisés sont de type Mann Whitney (*:p<0,05; **:p<0,01)

4.2.2. Mécanismes impliqués dans le développement des métastases

4.2.2.1. Etude par immunohistochimie de l'expression de l'E-cadhérine

La transition épithelio-mésenchymateuse (TEM) est un processus se déroulant au moment de l'embryogénèse. Ainsi, les cellules de la crête neurale vont se différencier en différents types cellulaires comme les cellules musculaires, neurones etc. Dans le cas des tumeurs, la TEM est impliquée dans la migration des cellules tumorales et l'invasion cellulaire. En effet, les cellules peuvent acquérir un changement de morphologie et être capables d'envahir et de migrer aux organes distants pour induire la formation de tumeurs secondaires (*Creighton et al., 2013*). Nous avons démontré que la stimulation de TLR7 induisait une augmentation du recrutement des MDSC dans la tumeur, ceci pouvant induire la TEM *(Keskinov and Shurin, 2015*) et la modification de la capacité migratoire des cellules tumorales, en les rendant plus agressives lors de la colonisation des autres organes.

Au laboratoire il a été montré par des marquages d'immunohistochimie que les cellules tumorales provenant de patients atteints d'un CPNPC présentent une expression hétérogène de TLR7. Les patients ayant une forte expression de TLR7 dans leurs cellules tumorales (>80%) ont une survie globale plus courte que les patients ayant une faible expression de TLR7. Cela indique que l'expression de ce récepteur par les cellules tumorales est de mauvais pronostic (*Chatterjee et al., 2014*). Par des analyses de Western Blot, j'ai pu constater que les cellules LLC utilisées au cours des expériences *in* vivo, sont majoritairement de type mésenchymateux. J'ai notamment montré que les cellules exprimaient fortement la vimentine ainsi qu'une absence de l'expression de l'E-cadhérine. Du fait de ces résultats, la lignée LLC ne semble pas être un bon modèle d'étude de la TEM. L'ensemble des résultats obtenus et l'hétérogénéité cellulaire dans les tumeurs de poumons humaines, m'ont amenée à étudier les effets de la stimulation de TLR7 dans ces tumeurs humaines.

Pour étudier l'implication possible de la TEM chez les patients atteints d'un CPNPC, j'ai regardé par immunohistochimie l'expression de l'E-cadhérine, une protéine associée aux cellules épithéliales et dont une perte d'expression dans les cellules est considérée comme une étape importante de la TEM.

Vingt patients atteints d'un CPNPC ont été scindés en deux groupes, ceux dont les tumeurs expriment fortement TLR7 ($TLR7^{high}$) et ceux qui expriment faiblement ce récepteur ($TLR7^{low}$). Comme on peut l'observer en figure 20A, l'expression de l'E-cadhérine est membranaire. Un comptage semi-quantitatif a été réalisé pour déterminer l'expression d'E-cadhérine. J'ai pu constater que chez les patients $TLR7^{high}$, l'expression d'E-cadhérine est homogène et faible, alors que chez les patients exprimant faiblement TLR7 dans leurs tumeurs, l'expression de cette protéine membranaire est hétérogène (*Figure 20B*).

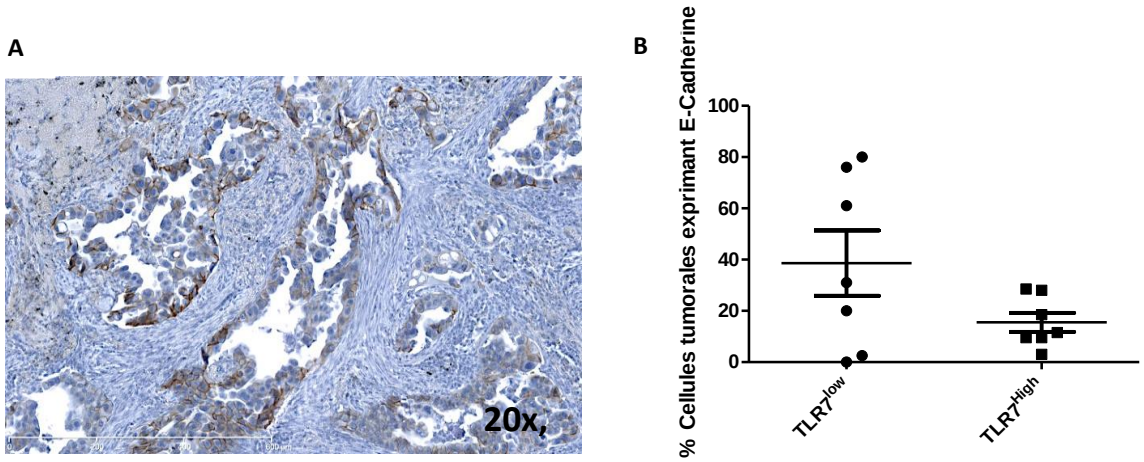


Figure 20 : Expression de l'E-cadhérine chez les patients atteints de CPNPC.
A/ Marquage membranaire d'E-cadherine sur les cellules tumorales.
B/ Pourcentage de l'expression d'E-cadherine par les cellules tumorales chez les patients $TLR7^{High}$ et $TLR7^{low}$.

4.2.2.2. Etude du rôle des récepteurs aux chimiokines

Les chimiokines sont des petites protéines impliquées dans la migration cellulaire et la surveillance immunitaire. Elles ont notamment un rôle dans le contrôle du trafic et de la localisation des cellules immunitaires lors de la réponse immune. L'importance de ces protéines dans la progression du cancer a été démontrée puisqu'elles sont impliquées dans la croissance, l'angiogenèse, la transition éptihélio-mésenchymateuse, l'échappement du système immunitaire et le développement des métastases (*Sarvaiya et al., 2013*). Plus particulièrement, il a été montré que le récepteur aux chimiokines CCR4 est impliqué dans le développement des métastases pulmonaires, de cancer du sein, de l'os et des ganglions lymphatiques *(Nakamura et al., 2006 ; Tsujikawa et al., 2013 ; Olkhanud et al., 2009)*. Au laboratoire, il a été précédemment observé que la stimulation de cellules tumorales

pulmonaires humaines de la lignée A549 par un agoniste de TLR7 augmentait l'expression du gène au niveau ARN du récepteur CCR4 *(Cherfils-Vicini et al., 2010)*. Afin d'étudier l'implication de ce récepteur dans le développement des métastases dans notre modèle, j'ai cultivé les cellules LLC-luc pendant 6 ou 12 heures avec différents agonistes de TLR7. L'étude de la variation de l'expression du gène *CCR4* a été faite par PCR quantitative en temps réel. Sur la figure 21A on peut constater que l'expression du gène codant le récepteur CCR4 (violet) sur la lignée murine LLC-luc est très faible en comparaison au gène endogène (vert). De plus, lors de l'analyse, j'ai observé que l'expression de CCR4 est très peu reproductible (*Figure 21B*).

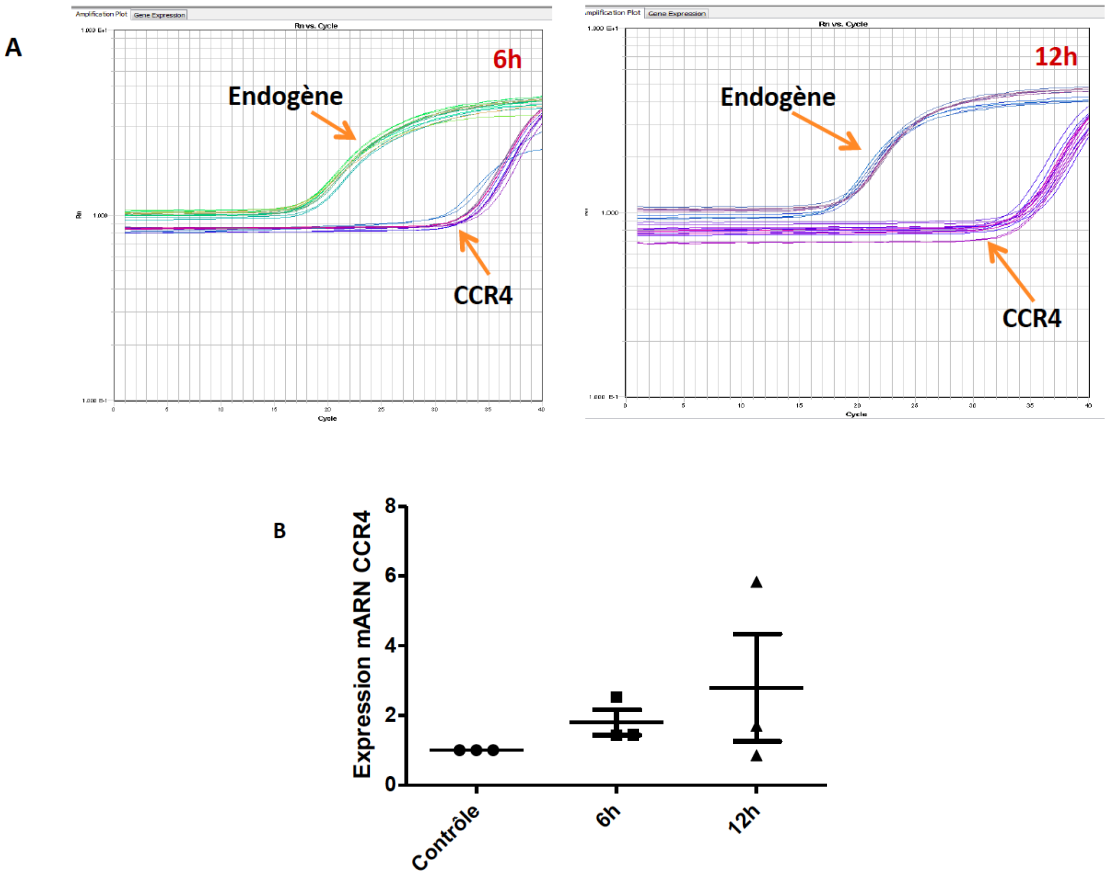


Figure 21 : Expression de CCR4 sur la lignée LLC_luc.
A/ L'expression tardive de CCR4 dans la lignée murine.
B/ L'expression de CCR4 n'est pas reproductible après stimulation de TLR7.

5. CONCLUSION ET DISCUSSION

Au cours de mon stage de Diplôme, j'ai pu confirmer que la stimulation de TLR7 par l'agoniste CL264 induit un effet pro-tumoral et une diminution de l'effet de la chimiothérapie. De plus, ces différents effets ont également été observés chez les souris déficientes pour TLR7.

J'ai également observé, par imagerie et par comptage après coloration, que l'injection de l'agoniste de TLR7 augmente la survenue des métastases pulmonaires dans des souris NOD/SCID. Cet effet est d'autant plus fort chez les souris dont TLR7 a été stimulé de façon continue. J'ai validé ces résultats chez des souris C57BL/6 immunocompétentes où j'ai également observé que la stimulation de ce récepteur induit une augmentation du nombre de métastases pulmonaires. En revanche, aucun effet n'a été observé chez les souris déficientes pour TLR7. Lors de la déplétion des MDSC, j'ai constaté une diminution de la formation des métastases pulmonaires chez les souris dont TLR7 avait été précédemment stimulé. Après avoir montré l'effet pro-métastatique de TLR7, j'ai voulu étudier les mécanismes impliqués dans ce processus. J'ai démontré que les cellules tumorales de la lignée LLC sont de type mésenchymateux, puisqu'elles n'expriment pas l'E-cadhérine, et expriment fortement la vimentine, qu'elles aient été stimulées ou non avec le CL264 *in vitro*. Ce n'est donc pas la TEM qui peut expliquer à elle seule les effets pro-métastatiques de la stimulation de TLR7. En revanche, chez les patients atteints de CPNCP, j'ai constaté qu'une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales est associée à une diminution de l'expression de l'E-cadhérine, ce qui est un argument en faveur de la TEM dans les tumeurs humaines.

Ces résultats pris ensemble montrent que la stimulation de TLR7 présent dans les cellules tumorales va induire la production de cytokines impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives, tels que les MDSC, Treg, M2 ou macrophages. Ce microenvironnement va induire la destruction de la matrice extracellulaire, ce qui va induire la migration des cellules cancéreuses et la formation de tumeurs secondaires à distance (*Figure 22*).

Dans ce travail, nous avons mis en évidence un rôle de MDSC lors du développement des métastases après stimulation de TLR7. Ainsi, la stimulation de TLR7 présent dans les cellules tumorales induit le recrutement des MDSC par la sécrétion des cytokines et interleukines telles que l'IL-6, CCL2 et GM-CSF. Les MDSC vont ainsi sécréter des cytokines capables d'induire l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription liés à la transition épithelio-mésenchymateuse. Ces cellules peuvent également induire la production de l'IL-6 qui va induire une augmentation de STAT3 dans les cellules tumorales, impliqué également dans la TEM. Enfin, ces cellules peuvent sécréter des matrix métalloprotéinases, chargées de la destruction de la matrice extracellulaire. Tout cela va conduire la migration et invasion des cellules tumorales (*Figure 23*).

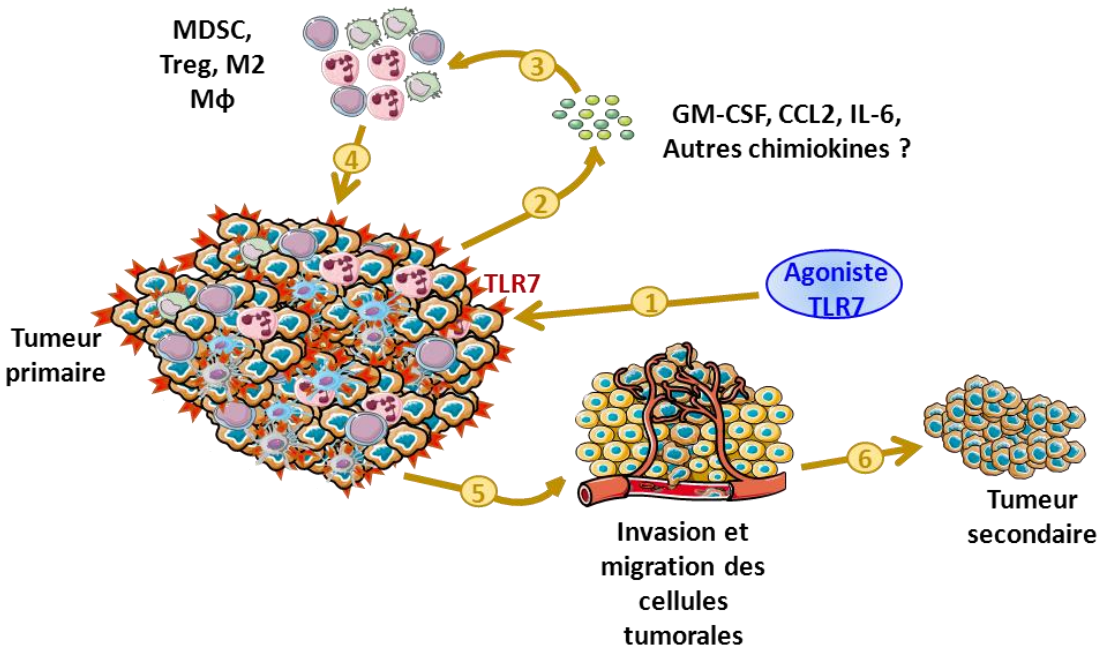


Figure 22 : Schéma d'action de TLR7 dans la progression tumorale
Le TRL7 exprimé par les cellules tumorales va conduire à la production des chimiokines et cytokines responsables du recrutement des cellules immunosuppressives. Cela va induire l'invasion cellulaire et la formation de tumeurs secondaires.
1/ L'agoniste stimule le TLR7 present dans les cellules tumorales.
2/ Les cellules secreten des cytokines et chimiokines.
3/ Les chimiokines et cytokines sont reconues par le système immunitaire myeloïde.
4/ Les cellules lyeloïdes sont recroutées au sein de la tumeur.
5/ Le microennvironement tumorale induit l'invasion et migration des cellules tumorales.
6/ Formation des tumeurs secondaires distants.

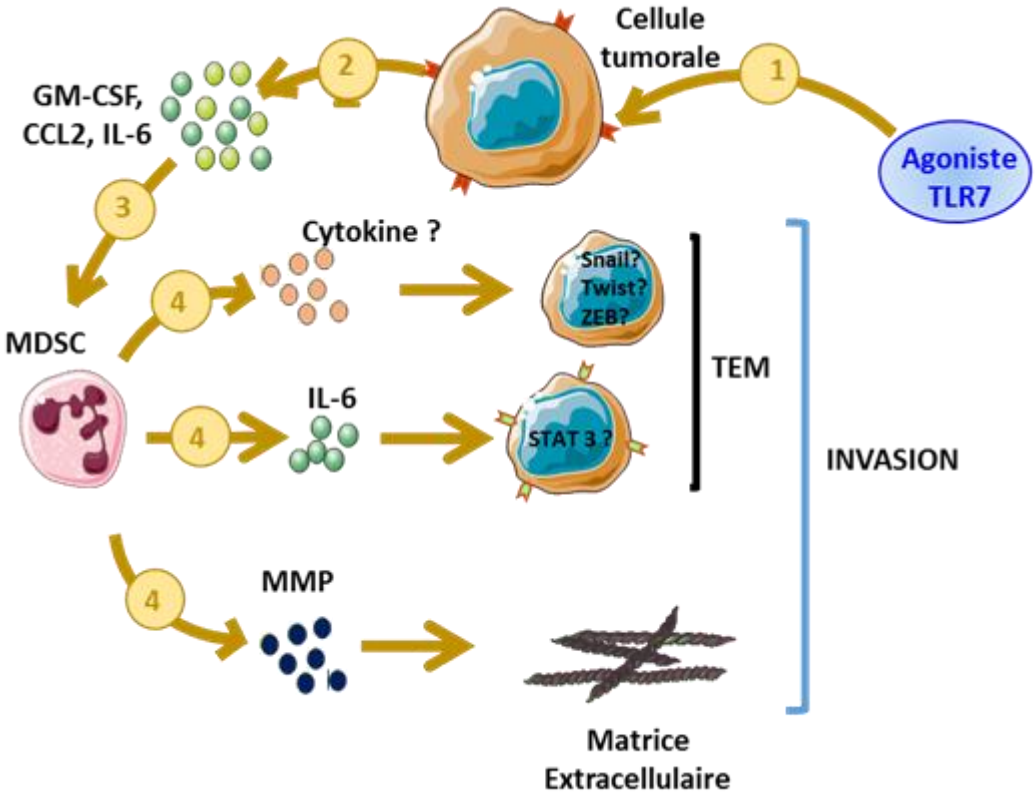


Figure 23 : Schéma de l'implication des MDSC dans le développement des métastases après stimulation de TLR7

La stimulation de TLR7 induit le recrutement des MDSC par la production des cytokines et chimiokines. Les MDSC vont secreter de cytokines et MMP capables d'induire la TEM ou de détruire la matrice extracellulaire.

1/ Le récepteur TLR7 des cellules tumorales est stimulé par l'agoniste

2/ Secretion des cytokines et chimiokines par les cellules tumorales

3/ Stimulation des MDSC par les chimiokines et cutokines

4/ Les MDSC vont secreter des cytokines cappables d'induir la TEM et/ou de detruire la matrice extracellulaire.

5.1. Validation de l'effet pro-tumoral de TLR7 dans un modèle murin

Il a été montré dans la littérature que lors de la stimulation de TLR7 deux effets peuvent être trouvés. La stimulation de ce récepteur par un agoniste peut mener à un effet anti-tumoral en stimulant le récepteur exprimé par les cellules du système immunitaire, comme les pDC, les lymphocytes B, et les cellules NK. En plus de l'expression de TLR7 par les cellules immunitaires, celui-ci peut également être exprimé par les cellules tumorales. Ainsi, au sein du laboratoire, il a été démontré que TLR7 est exprimé par les cellules tumorales d'adénocarcinomes et de carcinomes épidermoïdes alors qu'il n'est pas exprimé dans le tissu pulmonaire non tumoral *(Cherfils-Vicini et al., 2010)***.** Dans mon étude, j'ai confirmé que la

stimulation de TLR7 par le ligand CL264 induisait un effet pro-tumoral chez les souris déficientes pour TLR7. Précédemment, l'expression de TLR7 par la lignée LLC avait été vérifiée par PCR. Nous pouvons donc conclure que la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales, et pas sur les cellules immunitaires, est le stimulus responsable de cet effet pro-tumoral.

Une étude similaire a été réalisée dans le cancer du pancréas, où il a été démontré que TLR7 n'était pas exprimé dans les cellules normales du pancréas, chez l'Homme et la souris. En revanche, les auteurs ont observé que TLR7 était surexprimé dans le cancer du pancréas humain et dans le modèle spontané du cancer pancréatique p48Cre;$Kras^{G12D}$ et que la stimulation de TLR7 par l'agoniste ssRNA40 entraine une augmentation de la croissance tumorale. La stimulation de ce récepteur induit l'activation de NF-kB, de MAPK et une sous-expression de PTEN, ainsi qu'une forte activation de STAT3, qui a été associée à la modulation des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xl et c-Myc *(Ochi et al., 2012)*.

5.2. Rôle pro-métastatique de TLR7

Il a été montré que l'expression dérégulée des TLRs par les cellules cancéreuses joue un rôle important dans la progression tumorale et dans la formation des métastases.
Lors de ce travail, et grâce à l'utilisation de l'imagerie *in* vivo, l'apparition d'une deuxième masse tumorale a été observée au niveau de la cage thoracique des souris. L'autopsie et l'analyse par coloration des poumons ont confirmé les résultats observés par imagerie *in vivo*, avec une augmentation du nombre de métastases pulmonaires chez les souris immunocompétentes ou immunodéprimées, lors de la stimulation du TLR7. De plus chez les souris immunodéprimées il a été observé une augmentation de la taille des ganglions lymphatiques axillaires après stimulation de TLR7. La cause de cette augmentation des ganglions n'est pas connue. Cela pourrait être dû à une infiltration des cellules tumorales dans les ganglions plus importante après stimulation de ce récepteur.

A la suite de ces résultats, j'ai voulu comprendre les mécanismes impliqués dans cet effet pro-métastatique. Ainsi, diverses possibilités ont été envisagées. Différents mécanismes peuvent favoriser le développement des métastases, tels que la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), les facteurs de croissance, les récepteurs aux chimiokines, etc.

Lors de la régulation de la réponse immunitaire au cours de l'inflammation, les chimiokines ont un rôle dans le contrôle du trafic des cellules du système immunitaire. Au sein de l'équipe, il a été démontré que la stimulation de cellules A549 (cellules d'adénocarcinome pulmonaire humaines) *in vitro* par la loxoribine (un agoniste du TLR7 humain) augmente l'expression d'ARNm du récepteur aux chimiokines CCR4 (*Cherfils-Vicini et al., 2010)*. Dans la littérature, il a été montré que ce récepteur aux chimiokines est impliqué dans le développement des métastases pulmonaires, de cancer du sein, de l'os et des ganglions lymphatiques *(Nakamura et al., 2006 ; Tsujikawa et al., 2013 ; Olkhanud et al., 2009)*. L'implication de ce récepteur aux chimiokines a donc été étudiée dans ce travail. L'expression d'ARNm a été analysée après 6h et 12h de stimulation avec le ligand de TLR7 dans les cellules LLC. Il a été constaté que le signal de ce récepteur sortait tardivement chez les cellules en rapport au gène endogène utilisé et l'expression trouvée après stimulation du récepteur n'est pas reproductible. Ce n'est donc pas un mécanisme qui est impliqué dans l'effet pro-métastatique que nous observons après stimulation de TLR7 dans les cellules tumorales murines.

Les cellules du système immunitaire vont principalement aider à éliminer les cellules tumorales. Toutefois, la formation des métastases peut être promue par quelques sous-types cellulaires. Parmi ces cellules on retrouve les macrophages, les MDSC et les neutrophiles (*Kitamura et al., 2015; Schmid and Varner, 2010*).

Des études précédentes menés au sein du laboratoire avaient démontré 1) que la stimulation des cellules tumorales par un agoniste du récepteur TLR7 induit une augmentation de CSF-2, cytokine qui favorise le recrutement des cellules MDSC dans la tumeur *(Cherfils-Vicini et al., 2010)* ; et 2) *in vivo* que la stimulation de TLR7 par son ligand CL264 induisait une augmentation des cellules MDSC au sein de la tumeur *(Chatterjee et al., 2014)*. Ces cellules ont la capacité de supprimer l'activation des lymphocytes T en agissant sur leur prolifération et leur production de cytokines. Dans la littérature, ces cellules sont décrites comme étant pro-tumorales et ayant un rôle dans le développement des métastases *(De Sanctis et al., 2015)*. Il a été montré dans les souris qui ont reçu une greffe de cellules du cancer du poumon que la déplétion des MDSC par un anticorps anti-Gr1 diminue

la migration cellulaire ainsi que le nombre de métastases *(Kitamura et al., 2015; Schmid and Varner, 2010; Srivastava et al., 2012)*

Cette population est donc connue pour ses fonctions immunosuppressives. La déplétion de cette population immunitaire, en utilisant un anticorps déplétant, a permis la mise en évidence au sein du laboratoire de l'implication des MDSC dans l'effet pro-tumoral après stimulation de TLR7. De plus, j'ai montré que ces cellules étaient également impliquées dans l'effet pro-métastatique de TLR7. En effet, lors de la déplétion de ces cellules, la formation de métastases pulmonaires diminuait chez les souris traitées par l'agoniste de TLR7, ce qui indique que cet effet pro-métastatique semble impliquer les MDSC. Mais d'autres mécanismes non étudiés au laboratoire pourraient s'ajouter au rôle des MDSC.

Ainsi, il a été décrit dans la littérature que la stimulation du récepteur TLR4 est lié à l'invasion cellulaire. En 2014 l'équipe de Yang a montré que la stimulation de TLR4 par du lipopolysaccharide (LPS) induisait une augmentation des capacités invasives des cellules tumorales du cancer de sein par la sur-expression des protéines responsables de la destruction de la matrice extracellulaire, telles que les Matrix Métalloprotéinases MMP-2, MMP-9, et le facteur de croissance VEGF. Ils ont démontré que la stimulation de TLR4 induisait une augmentation de l'invasion et de la migration cellulaire. Ils ont confirmé ces effets *via* la co-culture de cellules tumorales avec du LPS et un antagoniste de TLR4, l'Eritoran. Enfin, ils ont constaté chez les patientes atteintes de cancer du sein, que l'expression de TLR4 est corrélée avec la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques (*Yang et al., 2014)*. Dans cette étude ils démontrent donc que la stimulation d'un TLR modifie l'expression de certaines protéines, pouvant induire une augmentation de la migration cellulaire, donc des métastases.

Au cours de mon étude, j'ai observé une diminution du développement des tumeurs secondaires pulmonaires chez les souris déficientes pour TLR7. Ainsi, L'implication de TLR7 présent dans les cellules de l'hôte a été mise en évidence. Une étude publiée en 2014 montre que les souris déficientes pour TLR4 développent moins de métastases que les souris sauvages. De plus, ce développement métastatique augmentait lors de la stimulation de ce récepteur par l'agoniste LPS. Ils ont également observé une diminution plaquettaire chez les souris porteuses d'une tumeur et l'adhésion cellule tumorale-plaquette a été montrée, à la

fois *in vitro* et *in vivo (Yu et al., 2014).* Il a été décrit dans la littérature que les plaquettes peuvent exprimer le récepteur TLR7 *(Jenne, 2014*). Des études ont montré que les plaquettes peuvent aider les cellules tumorales à survivre dans les vaisseaux sanguins, en s'adhérant autour de la cellule. Par ce biais, les cellules ne sont pas reconnues par le système immunitaire et elles ne vont pas mourir par stress. De plus, les plaquettes peuvent sécréter différentes protéines (protéases et cytokines), telles que MMP-2, MMP-9, le VEGFA et l'IL-1β, qui vont jouer un rôle dans l'angiogenèse, l'extravasation et/ou le remaniement des vaisseaux sanguins (*Gay and Felding-Habermann, 2011; Yu et al., 2014)*. Ici il a été montré que le TLR7 présent dans les cellules de l'hôte joue un rôle dans la formation des métastases. L'implication des plaquettes lors de ce processus serait à prendre en compte dans notre modèle, ainsi que l'implication des MMP.

Lors de cette étude, j'ai mis en évidence, par des marquages d'immunohistochimie, qu'une diminution de l'expression de l'E-cadhérine était détectée chez les patients atteints d'un CPNPC exprimant fortement le récepteur TLR7 dans leurs cellules tumorales. La diminution de l'expression de la E-cadhérine est liée à la perte de l'adhésion cellulaire et à un changement morphologique cellulaire *(Leber and Efferth, 2009)*.

Il a été montré que l'IL-6, via l'activation de STAT3, peut induire l'invasion cellulaire de la lignée d'adénocarcinome humaine A549 *in vitro*. Le traitement des cellules par l'IL-6 induit une perte d'expression de l'E-cadhérine et une augmentation de l'expression de la vimentine et du facteur de transcription Snail *(Zhao et al., 2014).* Comme il a été précédemment décrit, l'équipe d'Ochi a montré que la stimulation de TLR7 dans le cancer pancréatique induit une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription STAT3. Il a été décrit dans la littérature que les cellules fœtales dérivées de la peau induisent une augmentation de la production de la cytokine IL-6 après la stimulation de TLR7 *(Matsushima et al., 2004)*. De plus, cette cytokine a été aussi décrite comme étant l'une des responsables du recrutement des MDSC *(Marvel and Gabrilovich, 2015)* .

Les résultats que j'ai obtenus suggèrent que la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales induit une augmentation de l'IL-6 (données non montrées), qui expliquerait l'augmentation de cellules MDSC chez les souris traitées avec l'agoniste CL264. Le relargage de cette

interleukine pourrait également agir de façon autocrine sur les cellules tumorales et induire une activation des facteurs de transcription tels que Twist, Snail et/ou STAT3.

5.3. Stratégie thérapeutique de l'utilisation d'un antagoniste de TLR7

Il a été décrit dans la littérature que l'IRS661, une séquence oligonucléotidique immunorégulatrice, peut bloquer spécifiquement le récepteur TLR7 dans la maladie du Lupus *(Barrat et al., 2005; Pawar et al., 2007).* Des études ont également montré que l'administration de IRS661 induit une diminution de la production de cytokines, telles que IL-6, le TNF-α et IL-1β par des macrophages ou les neutrophiles *(Feng et al., 2015). In vivo,* j'ai observé que cet inhibiteur a un effet prophylactique chez les souris immunocompétentes ainsi que les souris immunodéprimées lorsque les souris ont également reçu du ligand de TLR7. Lors d'un traitement thérapeutique avec l'antagoniste de TLR7, j'ai constaté que l'effet pro-tumoral de la stimulation de ce récepteur disparaissait. Pourtant l'administration d'un antagoniste inhibe l'effet de la stimulation de ce récepteur. En revanche, quand l'antagoniste IRS661 est administré seul, aucun effet n'est observé. Etant donné que le mode d'action de cet IRS est encore inconnu, il est difficile de comprendre pourquoi l'antagoniste seul n'induit pas un effet anti-tumoral. Il semble qu'il faut induire une activation de la voie de signalisation par TLR7 afin de pouvoir l'inhiber. Des résultats similaires ont été décrits par l'équipe d'Ochi où les auteurs ont montré que l'inhibition de TLR7 par le même agoniste que celui utilisé dans ce travail diminue la progression du cancer pancréatique *(Ochi et al., 2012).*

En 2007, Latz *et al.* ont étudié l'inhibition de TLR9 par des séquences d'ADN et proposent une hypothèse de fonctionnement des IRS. Lorsque le ligand de TLR9 va se lier avec le récepteur, des changements de conformation vont se produire. Ceci va induire le rapprochement des domaines cytoplasmiques qui va permettre la transduction du signal. En revanche, lorsque l'antagoniste est reconnu par le récepteur aucun changement de conformation n'est observé *(Latz et al., 2007).* Cette étude suggère que l'inhibition de TLR7 pourrait être effectuée par le même mécanisme d'action dû à la ressemblance au niveau de la structure moléculaire des deux inhibiteurs.

6. PERSPECTIVES

Nous avons démontré que l'effet pro-tumoral et d'induction de chimiorésistance est dû à la stimulation de TLR7 exprimé par les cellules tumorales, et que cet effet peut être inhibé par l'utilisation d'une co-injection agoniste-antagoniste. Mais les mécanismes impliqués dans ce processus n'ont pas été complètement identifiés. J'ai également constaté que la stimulation de ce récepteur joue un rôle important lors du développement des métastases et il semblerait que l'implication du microenvironnement tumoral soit essentielle dans ce processus.

6.1. Rôle pro-tumoral de TLR7 exprimé par les cellules tumorales.

En 2010, au sein du laboratoire, il a été démontré *in vitro* que la stimulation de TLR7 induisait une augmentation dans la survie cellulaire de la lignée pulmonaire humaine A549, ainsi qu'une chimiorésistance *(Cherfils-Vicini et al., 2010).* Ces résultats ont été également validés *in vivo*, où il a été observé que la stimulation de TLR7 dans un modèle de souris immunocompétentes ou immunodéprimées conduisait à une augmentation de la progression tumorale ainsi qu'à une résistance au cisplatine. Grâce à l'utilisation d'un modèle de souris déficientes pour TLR7, j'ai pu démontrer que cet effet pro-tumoral semble être dû au TLR7 présent dans la lignée cellulaire LLC ou LLC_luc.

Pour vérifier si les agonistes utilisés agissent spécifiquement sur les cellules tumorales, nous voudrions abolir l'expression de TLR7 dans notre lignée cellulaire. Au laboratoire nous avons cherché à obtenir des cellules LLC n'exprimant plus TLR7, grâce à l'utilisation de shRNA. Toutefois, nous avons constaté par RT-PCR que ces cellules expriment encore un faible niveau de récepteur. C'est pourquoi nous allons utiliser la technologie CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspersed Palindromic Repeats/ CRISPR associated protein 9), afin d'obtenir des cellules déficientes pour TLR7. Une fois l'expression génique de TLR7 supprimée dans les cellules, nous vérifierons l'absence de la protéine par cytométrie en flux. L'utilisation de celle lignée déficiente pour TLR7 nous permettra de déterminer la contribution de la stimulation directe de ce récepteur exprimé par les cellules tumorales.

6.2. Etude du rôle de TLR7 dans le développement et la progression de CPNPC sur un modèle de tumeurs spontanées

Dans le modèle murin que nous avons utilisé, les cellules tumorales ont été greffées par voie sous-cutanée. Les cellules LLC ou LLC_luc utilisées dans cette étude sont des cellules pulmonaires, et elles vont avoir une tendance de migrer dans les poumons. Pour mieux comprendre la migration cellulaire due à la stimulation de TLR7, nous nous sommes intéressés au modèle CPNPC génétiquement induit. Les mutations responsables de la création de ce modèle sont des mutations constitutives hétérozygotes de K-ras et la mutation conditionnelle de la protéine p53. Ces souris sont porteuses hétérozygotes de la mutation G12D de K-ras et le gène codant la protéine p53 se trouve entre deux séquences lox. La recombinase CRE est insérée dans un lentivirus administré aux souris par voie intratrachéale. Ainsi, les cellules tumorales infectées par ce lentivirus vont être porteuse de la mutation K-ras et avoir une délétion du suppresseur de tumeur *TP53* à cause de la recombinase CRE. Du fait de ces doubles mutations, les souris vont développer des adénocarcinomes pulmonaires *(DuPage et al., 2009)*. La luciférine peut également être insérée dans le lentivirus de sorte que les tumeurs peuvent être localisées grâce à la bioluminescence sans sacrifier les animaux (*DuPage et al., 2012*).

Le Pr Olivier Lantz de l'Institut Curie, avec qui nous avons commencé une collaboration, a un élevage de ces souris. Après avoir vérifié que ces cellules expriment le récepteur TLR7, nous souhaitons étudier le développement de ces tumeurs, ainsi que la formation de métastases après la stimulation ou non du récepteur par leurs agonistes, administrés par voie intraveineuse. Grâce à ces souris, nous pourrons également étudier l'infiltrat immunitaire pulmonaire dans les tumeurs. Nous souhaitons également étudier l'effet de la stimulation de TLR7 via des ARN viraux originaires des virus respiratoires, car dans les études menées au laboratoire nous avons utilisé des agonistes synthétiques. Ainsi, cette étude pourra nous fournir des informations sur un lien potentiel entre les infections virales et la progression du CPNPC.

6.3. Les ligands endogènes de TLR7

Il a été décrit dans la littérature que les TLR peuvent être stimulés par des ligands endogènes. Ces ligands sont des molécules dérivées du tissu ou des cellules de l'hôte, tels que la fibronectine, le fibrinogène, l'héparane sulfate, ou les molécules chaperones HSP et HMGB1 (reconnus par TLR4 et TLR2). Il a été également décrit que TLR3 peut être stimulé par des ARNm endogènes. Ces molécules sont secrétées par le tissu endommagé et/ou enflammé, ainsi que par les cellules mortes *(Barrat et al., 2005; Huang et al., 2008; Yu et al., 2010).*

En plus de protéines de la matrice extracellulaire, des chaines de 19-22 nucléotides d'ARN non codants sont rélargués par les cellules, appelés miRNA (Fabbri et al., 2012). TLR7 est un récepteur qui reconnait les ARN simple brin. En 2012, l'équipe de Fabbri démontrait que miR-21 et 29 relargués par les cellules tumorales peuvent être trouvés dans le sang, dans des exosomes. Ces miRNA sont reconnus par le TLR7 et ils vont déclencher une réponse inflammatoire pro-métastatique *(Fabbri et al., 2012*). Il a également montré que la lignée de CPNPC A549 sécrètent ces miRNA et que ces molécules vont stimuler les cellules immunitaires via le TLR7, qui va induire une augmentation des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF-α. Cela va avoir comme conséquence une augmentation du potentiel pro-métastatique des cellules cancéreuses (*Fabbri, 2012*).

Dans notre étude, la stimulation de TLR7 par des ligands endogènes pourrait conduire à une augmentation de la progression tumorale par l'activation des cellules tumorales. Pour étudier l'implication des ligands endogènes chez les patients atteints de CPNPC, nous allons utiliser les cellules embryonnaires de rein HEK, qui ont été co-transfectées par deux gènes : hTLR7 et le rapporteur SEAP (Secreted embryonic alkaline phosphatase). Lorsque TLR7 est stimulé par un agoniste, NF-κB et AP-1 vont être activés, conduisant à la production de SEAP, qui peut être mesuré par un test colorimétrique. Les cellules HEK seront cultivées avec différentes fractions cellulaires ou surnageants provenant de tumeurs des patients (tumeurs fournies par l'Hôpital Cochin), afin de rechercher si les cellules tumorales des patients sont capables de produire un ligand agoniste capable de stimuler le récepteur TLR7. Nous souhaitons ensuite rechercher la présence de miRNA par PCR. Ces résultats seront corrélés avec le niveau d'expression de TLR7 par les cellules tumorales des patients.

6.4. Mécanisme d'action de l'antagoniste de TLR7

Dans cette étude, il a été observé une diminution de la progression tumorale lorsque les souris ont reçu une co-injection d'agoniste et d'antagoniste de TLR7. Des études menées au laboratoire avaient montré qu'*in vivo*, la stimulation de TLR7 induisait une augmentation du recrutement des MDSC. Ces cellules ont été décrites comme étant des cellules pro-tumorales *(Marvel and Gabrilovich, 2015; De Sanctis et al., 2015*). En 2015 l'équipe de Feng démontrait *in vitro* que l'inhibition deTLR7 induisait une diminution de la production d'IL-6, TNF-α et IL1-β par les macrophages et neutrophiles après stimulation de ce même récepteur (Feng et al., 2015). L'IL-6 a été décrite comme étant impliquée dans le recrutement des MDSC (*Marvel and Gabrilovich, 2015*)

La composition de l'infiltrat immunitaire tumoral lors l'administration de la combinaison agoniste/antagoniste de TLR7 est encore inconnue. Pour mieux comprendre le mode d'action de l'IRS661, il serait intéressant de regarder, par cytométrie en flux, la composition de l'infiltrat immunitaire chez les souris traitées de façon prophylactique ainsi que thérapeutique, afin d'étudier le recrutement immunitaire lors d'un traitement agoniste-antagoniste. Lors de la stimulation de TLR7 nous avons constaté une augmentation des cellules myéloïdes, notamment les MDSC, alors que la fraction lymphocytaire n'était pas significativement modifiée. Comme il a été précédemment décrit, l'inhibition de TLR7 par l'antagoniste induit une diminution de l'IL-6, ce qui pourrait induire une diminution des cellules myéloïdes intratumorales. C'est pour cela que nous souhaitons étudier l'infiltrat en cellules myéloïdes (macrophages, MDSC, pDC et cDC), ainsi qu'en cellules lymphocytaires (CD8, CD4, NK et Treg).

Dans cette étude nous n'avons pas regardé l'implication de l'antagoniste IRS661 lors de la formation des tumeurs secondaires. En 2014, l'équipe de Yang démontrait que l'inhibition de TLR4 par l'antagoniste Eritoran diminuait l'invasion cellulaire (*Yang et al., 2014*). Nous souhaitons étudier si l'administration d'un antagoniste de TLR7 ainsi qu'une co-administration d'agoniste-antagoniste joue un rôle sur la formation des métastases

6.5. TLR7 et le développement des métastases

Nous avons montré que la stimulation de TLR7 induit un effet pro-métastatique *in vivo*, qui semble diminuer lorsque les cellules MDSC sont déplétées. Chez les patients, une forte expression de TLR7 est associée avec une expression diminuée de l'E-cadhérine.

Les mécanismes impliqués dans ce processus n'ont pas été mis en évidence dans ce travail. L'implication de CCR4 dans la formation de métastases lors de la stimulation de TLR7 a été écartée car nous n'avons pas observé de modulation de l'expression de CCR4 par PCR après avoir stimulé notre lignée cellulaire 6h ou 12h. Par des expériences de western blot, nous avons étudié *in vitro* l'expression de différentes molécules impliquées dans la TEM, tels que la vimentine, l'E-cadherine et les facteurs de transcription Snail, Twist et Zeb. Nous n'avons pas mis en évidence de TEM dans notre lignée cellulaire après avoir ou non stimulé TLR7, car la lignée LLC est, de base, une lignée mésenchymateuse. Cela ne veut pas dire que la TEM n'est pas impliquée dans ce processus de formation de métastases car elle peut s'effectuer lorsque les cellules tumorales sont en contact avec le système immunitaire. Cette hypothèse peut être étudiée en regardant l'expression de la vimentine, N-cadhérine, ainsi que des facteurs de transcription, tels que Snail, Twist et ZEB, dans des tumeurs extraites de souris traitées ou non par l'agoniste de TLR7, CL264.

Grâce à la technologie Nanostring, permettant une hybridation directe de l'ARN (*NanoString®Technologies*), nous pourrons analyser dans les tumeurs de souris traitées ou non avec l'agoniste de TLR7, ainsi que chez des patients exprimant faiblement ou fortement TLR7, l'expression de 770 gènes impliqués dans la progression tumorale, ainsi que dans le processus de développement des métastases. Ceci nous aidera à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de métastases dues à la stimulation de TLR7.

Des études ont montré que les plaquettes peuvent aider les cellules tumorales à survivre *(Yu et al., 2014*). Il a été décrit dans la littérature que les plaquettes peuvent exprimer le récepteur TLR7 (*Jenne, 2014*). Nous voudrions étudier si les plaquettes peuvent être impliquées dans le développement des métastases observé chez nos souris. Pour cela, nous regarderons le nombre de plaquettes des souris naïves, après la greffe des tumeurs et après stimulation de TLR7. Cette étude sera réalisée chez les souris sauvages ainsi que chez les

souris déficientes pour TLR7. Ensuite, l'adhésion plaquettaire peut être inhibée par l'administration de l'aspirine à nos souris traitées ou non par l'agoniste de TLR7. Le nombre de métastases pourra être étudié par notre protocole, afin de connaitre l'implication des plaquettes.

Nous avons observé dans ce travail que les souris déficientes pour TLR7 n'induisaient pas une formation de métastases, ce qui nous fait penser que les cellules de l'hôte sont impliquées dans ce processus. Pour vérifier ces résultats et étudier si un des composants hématopoïétiques est impliqué, les souris sauvages ainsi que les souris déficientes pour TLR7 seront irradiées et greffées avec la moelle osseuse des souris WT ou $TLR7^{-/-}$. Les souris recevront ensuite une injection de cellules tumorales en sous-cutanée et une administration de l'agoniste de TLR7.

Chez les patients atteints de CPNPC avec une forte expression de TLR7, une diminution de l'expression de l'E-Cadhérine a été constatée par immunohistochimie. *In vivo,* une augmentation des MDSC a été observée lors de la stimulation de ce récepteur. Ces cellules ont été décrites comme promotrices de la TEM (*De Sanctis et al., 2015*). Grâce à une collaboration avec l'Hôpital Cochin de Paris, nous avons accès aux tumeurs des patients de CPNPC. Par des analyses de cytométrie en flux, nous souhaitons étudier l'infiltrat immunitaire, plus précisément, au recrutement des MDSC chez l'homme. Les résultats obtenus seront corrélés avec l'expression de TLR7 étudiée par des marquages d'immunohistochimie. L'ensemble de ces résultats nous permettra de définir si les cellules immunosuppressives sont impliquées dans la TEM.

7. BIBLIOGRAPHIE

Adachi, K., and Tamada, K. (2015). Immune checkpoint blockade opens an avenue of cancer immunotherapy with a potent clinical efficacy. Cancer Sci.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. *4*, 499–511.

Balkwill, F., and Coussens, L.M. (2004). Cancer: an inflammatory link. Nature *431*, 405–406.

Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet *357*, 539–545.

Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med. *202*, 1131–1139.

Chatenoud L, J.-F. B. (2012). Immunologie. *6*. Paris: Lavoisier.

Chatterjee, S., Crozet, L., Damotte, D., Iribarren, K., Schramm, C., Alifano, M., Lupo, A., Cherfils-Vicini, J., Goc, J., Katsahian, S., et al. (2014). TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. Cancer Res. *74*, 5008–5018.

Cherfils-Vicini, J., Platonova, S., Gillard, M., Laurans, L., Validire, P., Caliandro, R., Magdeleinat, P., Mami-Chouaib, F., Dieu-Nosjean, M.-C., Fridman, W.-H., et al. (2010). Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. J. Clin. Invest. *120*, 1285–1297.

Chow, S.C., Gowing, S.D., Cools-Lartigue, J.J., Chen, C.B., Berube, J., Yoon, H.-W., Chan, C.H.F., Rousseau, M.C., Bourdeau, F., Giannias, B., et al. (2015). Gram negative bacteria increase non-small cell lung cancer metastasis via toll-like receptor 4 activation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. Int. J. Cancer *136*, 1341–1350.

Clive P Page, M. J. (1999). *Pharmacologie Intégrée.* DeBoeck Université.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. Nature *420*, 860–867.

Creighton, C.J., Gibbons, D.L., and Kurie, J.M. (2013). The role of epithelial-mesenchymal transition programming in invasion and metastasis: a clinical perspective. Cancer Manag. Res. *5*, 187–195.

Dajon, M., Iribarren, K., and Cremer, I. (2015). Dual roles of TLR7 in the lung cancer microenvironment. Oncoimmunology *4*, e991615.

Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *26*, 4410–4417.

Drobits, B., Holcmann, M., Amberg, N., Swiecki, M., Grundtner, R., Hammer, M., Colonna, M., and Sibilia, M. (2012). Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. J. Clin. Invest. *122*, 575–585.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. Annu. Rev. Immunol. *22*, 329–360.

DuPage, M., Dooley, A.L., and Jacks, T. (2009). Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. Nat. Protoc. *4*, 1064–1072.

DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L.M., Cheung, A.F., and Jacks, T. (2012). Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. Nature *482*, 405–409.

Fabbri, M. (2012). TLRs as miRNA Receptors. Cancer Res. *72*, 6333–6337.

Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., et al. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, E2110–E2116.

Feng, Y., Chen, H., Cai, J., Zou, L., Yan, D., Xu, G., Li, D., and Chao, W. (2015). Cardiac RNA induces inflammatory responses in cardiomyocytes and immune cells via Toll-like receptor 7 signaling. J. Biol. Chem. jbc.M115.661835.

Galdiero, M.R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., and Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. Immunobiology *218*, 1402–1410.

Gay, L.J., and Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. Nat. Rev. Cancer *11*, 123–134.

Gazdar, A., Robinson, L., Oliver, D., Xing, C., Travis, W.D., Soh, J., Toyooka, S., Watumull, L., Xie, Y., Kernstine, K., et al. (2014). Hereditary lung cancer syndrome targets never smokers with germline EGFR gene T790M mutations. J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer *9*, 456–463.

Germain, C., Gnjatic, S., Tamzalit, F., Knockaert, S., Remark, R., Goc, J., Lepelley, A., Becht, E., Katsahian, S., Bizouard, G., et al. (2014). Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *189*, 832–844.

Gillard-Bocquet, M., Caer, C., Cagnard, N., Crozet, L., Perez, M., Fridman, W.H., Sautès-Fridman, C., and Cremer, I. (2013). Lung tumor microenvironment induces specific gene expression signature in intratumoral NK cells. Front. Immunol. *4*, 19.

Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K.D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., et al. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. Cancer Res. *74*, 705–715.

Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D.J., Groome, P.A., Rami-Porta, R., Postmus, P.E., Rusch, V., Sobin, L., International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee, et al. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer *2*, 706–714.

Goto, Y., Arigami, T., Kitago, M., Nguyen, S.L., Narita, N., Ferrone, S., Morton, D.L., Irie, R.F., and Hoon, D.S.B. (2008). Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. Mol. Cancer Ther. *7*, 3642–3653.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. Cell *140*, 883–899.

Han, J.-H., Lee, J., Jeon, S.-J., Choi, E.-S., Cho, S.-D., Kim, B.-Y., Kim, D.-J., Park, J.-H., and Park, J.-H. (2013). In vitro and in vivo growth inhibition of prostate cancer by the small molecule imiquimod. Int. J. Oncol. *42*, 2087–2093.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Hopewell, E.L., Zhao, W., Fulp, W.J., Bronk, C.C., Lopez, A.S., Massengill, M., Antonia, S., Celis, E., Haura, E.B., Enkemann, S.A., et al. (2013). Lung tumor NF-κB signaling promotes T cell-mediated immune surveillance. J. Clin. Invest. *123*, 2509–2522.

Huang, A., Zhang, B., Wang, B., Zhang, F., Fan, K.-X., and Guo, Y.-J. (2013). Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. Cancer Immunol. Immunother. CII *62*, 1439–1451.

Huang, B., Zhao, J., Unkeless, J.C., Feng, Z.H., and Xiong, H. (2008). TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. Oncogene *27*, 218–224.

Ioannou, S., and Voulgarelis, M. (2010). Toll-like receptors, tissue injury, and tumourigenesis. Mediators Inflamm. *2010*.

Jenne, C.N. (2014). Platelets: crossroads of immunity and hemostasis. Blood *124*, 671–672.

Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. Nat. Rev. Cancer *9*, 239–252.

Keskinov, A.A., and Shurin, M.R. (2015). Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis. Immunobiology *220*, 236–242.

Kitamura, T., Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. Nat. Rev. Immunol. *15*, 73–86.

Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M.A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. J. Immunol. Res. *2014*, 149185.

Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C.M., Klein, D.C.G., Monks, B.G., McKnight, C.J., Lamphier, M.S., Duprex, W.P., et al. (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. Nat. Immunol. *8*, 772–779.

Leber, M.F., and Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). Int. J. Oncol. *34*, 881–895.

Li, J.-Y., Ou, Z.-L., Yu, S.-J., Gu, X.-L., Yang, C., Chen, A.-X., Di, G.-H., Shen, Z.-Z., and Shao, Z.-M. (2012). The chemokine receptor CCR4 promotes tumor growth and lung metastasis in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. *131*, 837–848.

Liu, K.-J., Ding, L.-Y., and Wu, H.-Y. (2015). Bevacizumab in combination with anticancer drugs for previously treated advanced non-small cell lung cancer. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.

Long, K.B., and Beatty, G.L. (2013). Harnessing the antitumor potential of macrophages for cancer immunotherapy. Oncoimmunology *2*, e26860.

Luddy, K.A., Robertson-Tessi, M., Tafreshi, N.K., Soliman, H., and Morse, D.L. (2014). The role of toll-like receptors in colorectal cancer progression: evidence for epithelial to leucocytic transition. Front. Immunol. *5*, 429.

Marvel, D., and Gabrilovich, D.I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. J. Clin. Invest. *125*, 3356–3364.

Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H., and Shimada, S. (2004). TLR3-, TLR7-, and TLR9-Mediated Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines from Murine Connective Tissue Type Skin-Derived Mast Cells but Not from Bone Marrow-Derived Mast Cells. J. Immunol. *173*, 531–541.

Miretti, S., Roato, I., Taulli, R., Ponzetto, C., Cilli, M., Olivero, M., Di Renzo, M.F., Godio, L., Albini, A., Buracco, P., et al. (2008). A mouse model of pulmonary metastasis from spontaneous osteosarcoma monitored in vivo by Luciferase imaging. PloS One *3*, e1828.

Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., and Adjei, A.A. (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. Mayo Clin. Proc. *83*, 584–594.

Moreno, C., and Sánchez-Ibarrola, A. (2003). [Toll type receptors: molecular bases of the relationship between innate and adaptation responses of the immune system]. Rev. Med. Univ. Navarra *47*, 29–33.

Nakamura, E.S., Koizumi, K., Kobayashi, M., Saitoh, Y., Arita, Y., Nakayama, T., Sakurai, H., Yoshie, O., and Saiki, I. (2006). RANKL-induced CCL22/macrophage-derived chemokine produced from osteoclasts potentially promotes the bone metastasis of lung cancer expressing its receptor CCR4. Clin. Exp. Metastasis *23*, 9–18.

Ochi, A., Graffeo, C.S., Zambirinis, C.P., Rehman, A., Hackman, M., Fallon, N., Barilla, R.M., Henning, J.R., Jamal, M., Rao, R., et al. (2012). Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. J. Clin. Invest. *122*, 4118–4129.

Okon, I.S., Coughlan, K.A., Zhang, M., Wang, Q., and Zou, M.-H. (2015). Gefitinib-mediated ROS instigates mitochondrial dysfunction and drug resistance in lung cancer cells. J. Biol. Chem.

Olkhanud, P.B., Baatar, D., Bodogai, M., Hakim, F., Gress, R., Anderson, R.L., Deng, J., Xu, M., Briest, S., and Biragyn, A. (2009). Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. Cancer Res. *69*, 5996–6004.

Pawar, R.D., Ramanjaneyulu, A., Kulkarni, O.P., Lech, M., Segerer, S., and Anders, H.-J. (2007). Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *18*, 1721–1731.

Pradere, J.-P., Dapito, D.H., and Schwabe, R.F. (2014). The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. Oncogene *33*, 3485–3495.

Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. Nat. Rev. Cancer *9*, 57–63.

Remark, R., Alifano, M., Cremer, I., Lupo, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Riquet, M., Crozet, L., Ouakrim, H., Goc, J., Cazes, A., et al. (2013). Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 4079–4091.

De Sanctis, F., Solito, S., Ugel, S., Molon, B., Bronte, V., and Marigo, I. (2015). MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. Biochim. Biophys. Acta.

Sarvaiya, P.J., Guo, D., Ulasov, I., Gabikian, P., and Lesniak, M.S. (2013). Chemokines in tumor progression and metastasis. Oncotarget *4*, 2171–2185.

Sato, Y., Goto, Y., Narita, N., and Hoon, D.S.B. (2009). Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. Cancer Microenviron. *2*, 205–214.

Schmid, M.C., and Varner, J.A. (2010). Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment: Modulation of Tumor Angiogenesis and Tumor Inflammation. J. Oncol. *2010*, e201026.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature *410*, 1107–1111.

Singh, S., Sadanandam, A., and Singh, R.K. (2007). Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. Cancer Metastasis Rev. *26*, 453–467.

Srivastava, M.K., Zhu, L., Harris-White, M., Kar, U., Huang, M., Johnson, M.F., Lee, J.M., Elashoff, D., Strieter, R., Dubinett, S., et al. (2012). Myeloid Suppressor Cell Depletion Augments Antitumor Activity in Lung Cancer. PLoS ONE *7*, e40677.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell *139*, 871–890.

Tsujikawa, T., Yaguchi, T., Ohmura, G., Ohta, S., Kobayashi, A., Kawamura, N., Fujita, T., Nakano, H., Shimada, T., Takahashi, T., et al. (2013). Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *132*, 2755–2766.

Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. J. Clin. Invest. *107*, 135–142.

Yang, H., Wang, B., Wang, T., Xu, L., He, C., Wen, H., Yan, J., Su, H., and Zhu, X. (2014). Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. PloS One *9*, e109980.

Yu, L., Wang, L., and Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. J. Cell. Mol. Med. *14*, 2592–2603.

Yu, L.-X., Yan, L., Yang, W., Wu, F.-Q., Ling, Y., Chen, S.-Z., Tang, L., Tan, Y.-X., Cao, D., Wu, M.-C., et al. (2014). Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein. Nat. Commun. *5*, 5256.

Zhao, S., Zhang, Y., Zhang, Q., Wang, F., and Zhang, D. (2014). Toll-like receptors and prostate cancer. Tumor Immun. *5*, 352.

Zhao, Z., Cheng, X., Wang, Y., Han, R., Li, L., Xiang, T., He, L., Long, H., Zhu, B., and He, Y. (2014). Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis. PloS One *9*, e95884.

Zimmerman, M., Hu, X., and Liu, K. (2010). Experimental metastasis and CTL adoptive transfer immunotherapy mouse model. J. Vis. Exp. JoVE.

INTERNET

La ligue contre le Cancer. (2009). *Les cancer du Poumon.* Récupéré sur http://www.ligue-cancer.net/sites/default/files/brochures/cancers-poumon%5B1%5D.pdf

National Cancer Institute. (2014). *Lo que necesita saber sobre el cancer de pulmon.* Récupéré sur http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/educacion-para-pacientes/wyntk-pulmon.pdf

Oncoprof. (2011). Récupéré sur http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/Complements/g09_comp24.php

GLOBOCAN IARC. (2012). Récupéré sur http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

NanoString® Technologies, I. (s.d.). *GEN2 Prep Station User Manual.* Récupéré sur http://www.nanostring.com/media/pdf/MAN_nCounter_Prep_Station_GEN2.pdf

COURS

N Yousfi (2015). Formation des Métastases. UE Cancérologie EPHE. Dijon, France. 26-30 janvier 2015.

8. ANNEXES

8.1. ANNEXE 1: Dual roles of TLR7 in the lung cancer microenvironment

8.2. ANNEXE 2: - Trial Watch - Immunostimulation with Toll-like receptor agonists in cancer therapy

8.3. ANNEXE 3: TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer.

8.4. ANNEXE 4: Calreticulin expression by non-small-cell lung cancer correlates with signs of immunosurveillance and favorable prognosis.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Rôle du TLR7 dans la progression tumorale et le développement des métastases du Cancer du Poumon.

Cristina Iribarren Osinaga

Soutenu le 11 mars 2016

RÉSUMÉ

Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer au monde. Au laboratoire, il a été observé que les cellules tumorales de 70% des patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules expriment le TLR7 et qu'une forte expression de ce récepteur est associée à un mauvais pronostic en terme de survie. *In vitro* et *in vivo,* il a été montré que la stimulation de ce récepteur induit une augmentation de la croissance tumorale, ainsi qu'une résistance à la chimiothérapie. Au vu des complications dû aux métastases dans ce type de cancer, nous avons voulu étudier l'impact de l'expression de TLR7 sur le développement des métastases.

Par différentes approches, j'ai pu montrer dans plusieurs modèles murins que la stimulation de TLR7 conduisait à une augmentation du nombre de métastases pulmonaires ainsi que de la taille des ganglions lymphatiques. J'ai également démontré que ce mécanisme semblait impliquer un recrutement d'une population myéloïde immunosuppressive (MDSC) au sein de la tumeur. Sur une cohorte de patients atteints de cancer du poumon, j'ai mis en évidence qu'une forte expression de TLR7 est associée à une diminution de l'E-cadhérine au niveau des cellules tumorales.

Enfin, j'ai étudié l'effet de l'administration prophylactique et thérapeutique d'un antagoniste de TLR7 (IRS661) dans nos modèles murins de cancer du poumon. J'ai observé que lors du traitement prophylactique, l'administration de l'antagoniste de TLR7 induit un effet anti-tumoral seulement en présence d'agoniste de TLR7. En revanche, lors du traitement thérapeutique par l'antagoniste de ce récepteur, j'obtiens une disparition totale de l'effet pro-tumoral associé à la stimulation de TLR7.

Ces résultats montrent que la stimulation de TLR7 joue un rôle dans la formation de tumeurs secondaires impliquant un recrutement des MDSC et la transition épithelio-mésenchymateuse. Enfin, au vu de résultats obtenus lors du traitement thérapeutique avec l'antagoniste de TLR7, ce récepteur pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour les patients atteints de cancer du poumon exprimant fortement TLR7 afin d'augmenter leur espérance de vie.

MOTS-CLÉS : TLR7, métastases, cancer du poumon, IRS661, TEM, MDSC