

---

## La réponse antitumorale des macrophages dirigée contre les cellules de mésothéliome pleural malin

**Auteur :** Hoyos, Clotilde

**Promoteur(s) :** Willems, Luc

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2016-2017

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/3047>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

# **LA REPONSE ANTITUMORALE DES MACROPHAGES DIRIGEE CONTRE LES CELLULES DE MESOTHELIOME PLEURAL MALIN**

**CLOTILDE HOYOS**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017**

**PROMOTEUR: LUC WILLEMS**

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique<sup>1</sup> de Gembloux Agro-Bio Tec.

Le présent document n'engage que son auteur.

---

<sup>1</sup> L'autorité académique est représentée par le promoteur, membre du personnel enseignant de GxABT (L.Willems)

**LA REPONSE ANTITUMORALE DES  
MACROPHAGES DIRIGEE CONTRE LES  
CELLULES DE MESOTHELIOME PLEURAL  
MALIN**

**CLOTILDE HOYOS**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017**

**PROMOTEUR: LUC WILLEMS**

# Institution d'accueil

Ce travail de fin d'études a été réalisé dans le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de Gembloux Agro-Bio Tech (Université de Liège).

## Remerciements

Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail de fin d'études.

Tout d'abord, j'aimerais remercier Monsieur Luc Willems de m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon travail de fin d'études au sein de son laboratoire. Je tiens également à le remercier pour son écoute, ses conseils et son esprit critique tout au long de ce travail de fin d'études.

Je remercie également Monsieur Malik Hamaidia pour son encadrement, ses encouragements et ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce mémoire.

Je tiens également à remercier Monsieur Arsène Burny d'avoir pu apporter son esprit critique lors de la relecture de ce manuscrit.

Je remercie aussi Jean-Rock Jacques, Rugi Safari et Alix de Brogniez pour leur écoute et leur soutien tout au long de ce travail de fin d'études.

Je remercie également tous les membres du laboratoire de Microbiologie et Génomique pour leur gentillesse. Je tiens également à les remercier de m'avoir permis d'utiliser leur spectrophotomètre.

Merci à ma famille et mes amis de m'avoir soutenue tout au long de ce travail.

# Résumé

Le mésothéliome pleural malin est un cancer rare qui affecte les cellules mésothéliales de la plèvre. Actuellement, les traitements conventionnels incluant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie s'avèrent peu efficaces et ne permettent d'allonger la durée de vie des patients que de quelques mois. Les macrophages sont des cellules immunitaires de l'environnement tumoral qui constituent une première ligne de défense contre le mésothéliome. En plus de leur activité phagocytaire, les macrophages ont la capacité d'exercer une activité cytotoxique envers les cellules tumorales. Les objectifs de ce travail de fin d'études consistent d'une part, à caractériser l'activité cytotoxique des macrophages envers les cellules de mésothéliome et d'autre part, à comprendre les mécanismes impliqués. Les résultats ont montré que les surnageants de macrophages (activité cytotoxique indirecte) ainsi que les macrophages co-cultivés (activité cytotoxique directe) sont effectivement capables d'exercer une activité cytotoxique contre les cellules de mésothéliome lorsqu'ils sont activés par des lipopolysaccharides. Cette activité cytotoxique pourrait être exploitée comme nouvelle approche thérapeutique en vue d'améliorer le traitement du mésothéliome.

# Abstract

Malignant pleural mesothelioma is a rare cancer affecting mesothelial cells in the pleura. At the moment, the conventional treatments including surgery, radiotherapy and chemotherapy are inefficient and only slightly prolong survival. Macrophages are immune cells of the tumor environment acting in frontline against mesothelioma. Besides their phagocytic activity, macrophages are able to exert a cytotoxic activity against tumor cells. The objectives of this master's thesis are to determine the cytotoxic activity of macrophages against mesothelioma cells and to characterize the mechanisms involved. Results show that supernatants of macrophages (indirect cytotoxic activity) and co-cultured macrophages (direct cytotoxic activity) can exert a cytotoxic activity against mesothelioma cells when they are activated by lipopolysaccharides. This cytotoxic activity may be exploited as a novel therapeutic approach in order to improve the treatment of mesothelioma.

# Liste des abréviations

Abréviation	Signification
<b>1400 W</b>	N-(3-(Aminométhyl)benzyl)acetamidine
<b>%</b>	Pourcentage
<b>-L</b>	Ligand
<b>AB-1</b>	Lignée de mésothéliome pleural malin d'origine murine
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BAP1</b>	BRCA1 associated protein-1
<b>BH4</b>	(6R-)5,6,7,8-tetrahydro-L-bioptérine
<b>bFGF</b>	Facteur basique de croissance des fibroblastes
<b>C</b>	Cystéine
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>Carboxy-PTIO</b>	2-(4-Carboxyphényl)-4,4,5,5-tetraméthylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
<b>CCL</b>	Chemokine (C-C motif) ligand
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>COX</b>	Cyclooxygénase
<b>CP</b>	Cavité pleurale
<b>CSF</b>	Colony stimulating factor
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4
<b>CXCL</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular pattern
<b>DC</b>	Cellule dendritique
<b>DISC</b>	Death-inducing signaling complex
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DR6</b>	Death receptor 6
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>EGF</b>	Facteur de croissance épidermique
<b>EGFR</b>	Récepteur de facteur de croissance épidermique
<b>EPZ</b>	Embryonic ectoderm development
<b>EZH2</b>	Enhancer of zeste homolog 2
<b>FAD</b>	Flavine adénine dinucléotide
<b>FAS</b>	Cluster of differentiation 95
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FGF</b>	Facteur de croissance fibroblaste
<b>FITC</b>	Fluorescéine isothiocyanate
<b>FMN</b>	Flavine mononucléotide
<b>FP</b>	Feuillet pariétal

<b>FV</b>	Feuillet viscéral
<b>g</b>	Gramme
<b>GC-MS</b>	Gas chromatography-mass spectrometry
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
<b>h</b>	Heure
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>H3K27</b>	Lysine n° 27 située sur la queue amino-terminale de l'histone 3
<b>HGF</b>	Facteur de croissance hépatocyte
<b>HMGB1</b>	High mobility group box-1 protein
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>IGF</b>	Facteur de croissance de type insuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IARC</b>	International agency for research on cancer
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<b>I</b>	Isoleucine
<b>iNOS</b>	Inducible nitric oxide synthase
<b>IFN</b>	Interféron
<b>K</b>	Lysine
<b>L</b>	Leucine
<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>L-NMMA</b>	L-N <sup>G</sup> -monomethyl arginine citrate
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>LTCD4<sup>+</sup></b>	Lymphocyte T helper
<b>LTCD8<sup>+</sup></b>	Lymphocyte T cytotoxique
<b>m</b>	Milli
<b>M</b>	Molarité
<b>M1</b>	Macrophage activé de manière classique
<b>M2</b>	Macrophage activé de manière alternative
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>Mock</b>	Condition non traitée
<b>MPM</b>	Mésothéliome pleural malin
<b>mRNA</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>n</b>	Nano
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NFκB</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NO<sub>2</sub></b>	Dioxyde d'azote
<b>O<sub>2</sub></b>	Dioxygène
<b><sup>•</sup>O<sub>2</sub></b>	Ion superoxyde
<b><sup>•</sup>OH</b>	Radical hydroxylé
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	Peroxynitrite
<b>PD-1</b>	Programmed death-1



<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern
<b>PBS</b>	Tampon phosphate salin
<b>PDGF</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>PI</b>	Iodure de propidium
<b>PKH26</b>	Marqueur Paul Karl Horan 26
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor
<b>RAW 264.7</b>	Lignée de macrophages d'origine murine
<b>RNS</b>	Substance réactive azotée
<b>RONS</b>	Substance réactive oxygénée et azotée
<b>ROOH</b>	Hydro peroxyde
<b>ROOR'</b>	Peroxyde
<b>ROS</b>	Substance réactive oxygénée
<b>RPMI 1640</b>	Roswell park memorial institute 1640 medium
<b>SS1P</b>	Antimesothelin immunotoxin SS1(dsFv) PE38
<b>SV40</b>	Simien virus 40
<b>TAA</b>	Antigène associé aux tumeurs
<b>TAM</b>	Macrophage associé aux tumeurs
<b>TGF</b>	Facteur de croissance transformant
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF</b>	Facteur de nécrose tumorale
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>TRAMP</b>	TNF-related apoptosis-mediating protein
<b>Treg</b>	Lymphocyte T régulateur
<b>μ</b>	Micro
<b>VEGF</b>	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
<b>Y</b>	Tyrosine
<b>YY1</b>	Facteur de transcription Yin Yang 1

# Liste des figures

Figure 1 A. Représentation schématique de la plèvre. B. Représentation schématique d'une plèvre saine et d'une plèvre atteinte de MPM. ....	2
Figure 2. Estimation de l'augmentation croissante annuelle du MPM à travers le monde .....	4
Figure 3. Familles d'amiante .....	5
Figure 4. Représentation schématique illustrant la voie prise par les particules d'amiante pour atteindre la plèvre. ....	8
Figure 5. A. Représentation schématique de la phagocytose frustrée. B. Phagocytose frustrée observée au microscope électronique.....	10
Figure 6 A. Radiographie d'un patient atteint de MPM. B. Image d'un patient présentant une extension pleurale.....	11
Figure 7. Théorie de l'immunosurveillance .....	14
Figure 8. Phagocytose non opsonique d'une bactérie par un macrophage .....	18
Figure 9. Production du NO par l'enzyme iNOS .....	20
Figure 10. Production d'espèces réactives oxygénées et azotées .....	21
Figure 11. Oxydation des guanines .....	22
Figure 12. Polarisation des macrophages .....	26
Figure 13. Immunothérapie basée sur l'utilisation du bevacizumab, un anticorps monoclonal bloquant les VEGF.....	28
Figure 14. Activité cytotoxique indirecte des macrophages RAW 264.7 envers les cellules de mésothéliome AB-1.....	37
Figure 15. Activité cytotoxique directe des macrophages RAW 264.7 en contact avec les cellules de mésothéliome AB-1 (Microscopie confocale) .....	39
Figure 16. Activité cytotoxique directe des macrophages RAW 264.7 envers les cellules de mésothéliome AB-1 (Cytométrie en flux).....	41
Figure 17. Quantification des nitrites produits par les macrophages RAW 264.7 stimulés ou non avec du LPS.....	42
Figure 18. Activité métabolique des RAW 264.7 en fonction de la concentration de L-NMMA.....	43
Figure 19. Implication du monoxyde d'azote dans l'activité cytotoxique indirecte des macrophages RAW 264.7 envers les cellules de mésothéliome AB-1 .....	45
Figure 20. Implication du monoxyde d'azote dans l'activité cytotoxique directe des macrophages RAW 264.7 envers les cellules de mésothéliome AB-1 .....	47

Figure 21. Influence du L-NMMA sur la production de nitrites.....	49
Figure 22. Représentation schématique de la réaction enzymatique menée par l'enzyme iNOS, du mode d'action des différents inhibiteurs de NO et de la méthode de dosage utilisée pour doser le NO.....	53
Figure 23. Représentation schématique de l'activité cytotoxique indirecte des macrophages par le biais des peroxynitrites (ONOO <sup>-</sup> ) en induisant des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines par des réactions de déamination, de peroxydation, d'oxydation, de nitration et de nitrosylation.....	55
Figure 24. Représentation schématique de l'activité cytotoxique directe des macrophages sur les cellules de mésothéliome .....	57

# Table des matières

Objectifs du travail de fin d'études .....	1
Introduction .....	2
1. Le mésothéliome pleural malin .....	2
1.1. Histologie .....	2
1.2. Cas de cancers .....	3
1.3. Le mésothéliome pleural malin .....	3
1.4. Epidémiologie du mésothéliome .....	4
1.5. Étiologie du mésothéliome .....	4
1.6. Tumorigenèse .....	8
1.7. Diagnostic et traitement .....	11
2. Le système immunitaire .....	13
2.1. La réaction inflammatoire .....	13
2.2. Les macrophages et le système immunitaire .....	16
3. Immunothérapie du mésothéliome .....	27
3.1. Immunothérapie basée sur l'utilisation de cytokines .....	27
3.2. Immunothérapie basée sur l'utilisation d'anticorps .....	28
3.3. Inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs des facteurs de croissance épithéliaux... ..	29
3.4. Immunothérapie cellulaire .....	29
3.5. Immunothérapie basée sur la régulation épigénétique .....	29
Matériel et méthodes .....	31
1. Culture cellulaire .....	31
2. Traitements des cellules .....	31
3. Quantification de la viabilité cellulaire des RAW 264.7 en présence de L-NMMA ....	32
4. Dosage des nitrites .....	33

5. Test de cytotoxicité .....	33
5.1. Culture d'AB-1 en présence de surnageant de RAW 264.7 .....	33
5.2. Co-culture d'AB-1 et de RAW 264.7 .....	33
5.3. Quantification de l'apoptose et de la nécrose. ....	34
6. Microscopie confocale .....	34
6.1. Culture des cellules .....	34
6.2. Marquage des cellules .....	34
6.3. Fixation et analyse au microscope confocal .....	34
7. Analyses statistiques .....	35
Résultats .....	36
1. Activité cytotoxique des macrophages.....	36
1.1. Cytotoxicité indirecte .....	36
1.2. Cytotoxicité directe .....	38
2. Implication du NO dans l'activité cytotoxique indirecte et directe .....	42
2.1. Dosage des nitrites produits par les macrophages RAW 264.7 .....	42
2.2. Effet du L-NMMA sur l'activité métabolique des macrophages RAW 264.7 .....	43
2.3. Implication du NO dans la cytotoxicité indirecte .....	44
2.4. Implication du NO dans la cytotoxicité directe .....	46
2.5. Effet du L-NMMA sur la production de nitrites .....	48
Discussion et perspectives.....	50
Conclusion.....	58
Bibliographie.....	59

# Objectifs du travail de fin d'études

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer rare qui affecte les cellules mésothéliales de la plèvre. L'origine de ce cancer est le plus souvent associée à l'exposition à l'amiante. Après exposition, le mésothéliome met en moyenne 25 à 45 ans à se développer. Le temps de survie des patients a été évalué en moyenne entre 8 à 18 mois. En Europe, 250.000 nouveaux cas ont été prédits dans les 40 prochaines années. A ce jour, le mésothéliome pleural malin est incurable et les traitements conventionnels ne permettent que d'allonger le temps de survie des patients de quelques mois. De nombreuses études ont été mises en place afin de trouver de nouveaux moyens de traitement contre le mésothéliome, mais ces derniers restent peu efficaces. C'est pourquoi il devient important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de traiter ce cancer.

Le développement du mésothéliome est contrôlé par le système immunitaire qui va développer une immunité antitumorale. Amplifier l'immunité antitumorale au moyen de l'immunothérapie constitue une nouvelle approche intéressante pour le traitement du mésothéliome. Au sein du système immunitaire, les macrophages constituent une première ligne de défense contre les cellules de mésothéliome. Parmi ceux-ci, les macrophages M1 présentent une activité antitumorale qui pourrait être exploitée comme nouvelle approche thérapeutique.

Le premier objectif de ce travail de fin d'études a consisté à caractériser l'activité antitumorale des macrophages contre les cellules de mésothéliome. Le deuxième a consisté à étudier l'implication du monoxyde d'azote dans l'activité antitumorale associée aux macrophages.

Les résultats seront présentés selon deux aspects :

- L'activité antitumorale indirecte, qui étudie l'effet des surnageants de macrophages, contenant les médiateurs solubles produits par les macrophages, sur les cellules de mésothéliome. Ceci permettra de comprendre l'importance des composés cytotoxiques produits par les macrophages dans cette activité.
- L'activité antitumorale directe qui étudie l'effet de la co-culture de macrophages sur les cellules de mésothéliome. Ceci permettra de comprendre l'importance du contact qui se déroule entre les macrophages et les cellules tumorales.

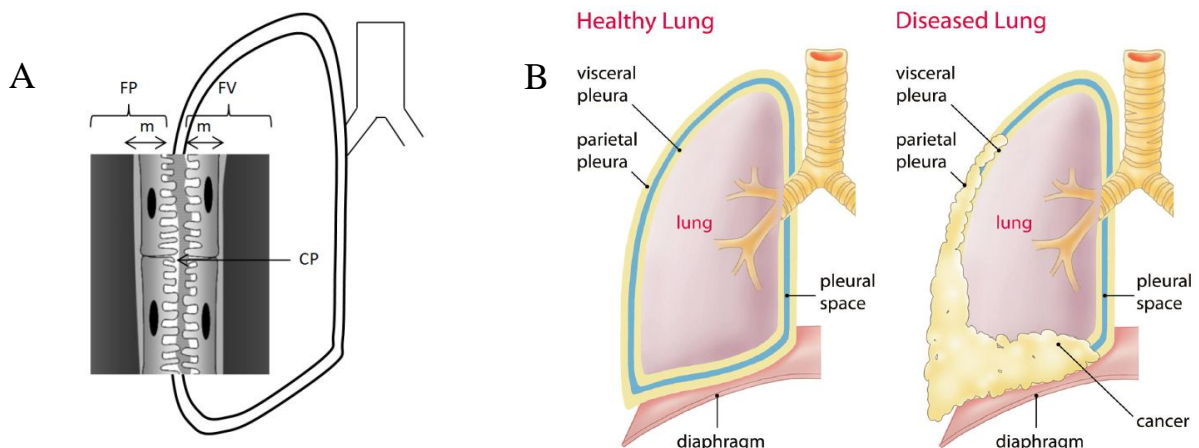
# Introduction

## 1. Le mésothéliome pleural malin

### 1.1. Histologie

La plèvre, le péritoine et le péricarde sont des séreuses qui engainent respectivement les poumons, les organes pelviens et abdominaux (système digestif), et le cœur. Ces séreuses ont pour rôle de limiter les frottements issus des mouvements des organes grâce au liquide qu'elles produisent (Kierszenbaum, 2006; Schulte et al., 2017).

La plèvre est constituée d'un feuillet viscéral et d'un feuillet pariétal qui délimite une cavité pleurale contenant le liquide pleural. Ces deux feuillets sont formés d'un épithélium pavimenteux simple constitué de cellules mésothéliales polarisées, qui présentent un pôle apical orienté vers la cavité pleurale et un pôle basal à l'extrémité opposée (**Figure 1, panneau A**) (Kierszenbaum, 2006; Aubier et al., 2009; Schulte et al., 2017). Cette couche de cellules mésothéliales est disposée sur une lame basale laquelle repose sur un tissu conjonctif lâche emprisonnant des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Kierszenbaum, 2006; Donaldson et al., 2010). Le liquide pleural est un liquide interstitiel issu des capillaires sub-pleuraux. Ce liquide est enrichi de glycoprotéines produites par les cellules mésothéliales. De plus, le liquide pleural est constamment évacué par les stomates situés sur le feuillet pariétal avant de rejoindre les vaisseaux lymphatiques (Donaldson et al., 2010).



**Figure 1 A. Représentation schématique de la plèvre.** La plèvre est une séreuse qui engaine les poumons. Elle est constituée de deux feuillets, le feuillet pariétal (FP) et le feuillet viscéral (FV) qui délimitent la cavité pleurale (CP). Les deux feuillets sont formés d'une couche de cellules mésothéliales (m) (Donaldson et al., 2010). **B. Représentation schématique d'une plèvre saine et d'une plèvre atteinte de MPM.** Le MPM est un cancer qui affecte la plèvre (Opitz, 2014).

## 1.2. Cas de cancers

En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancers enregistrés à travers le monde a été estimé à 14,1 millions, pour lesquels le nombre de décès s'élève à 8.2 millions. Les origines les plus fréquentes de décès liés à ces cancers sont le cancer du poumon, qui touche le plus souvent les hommes (8.000 nouveaux cas en Belgique en 2016) et le cancer du sein, qui touche essentiellement les femmes (10.466 nouveaux cas en Belgique en 2014) (Fondation contre le Cancer, 2017). En Belgique, le mésothéliome a affecté 286 personnes en 2012 (Fondation contre le cancer, 2017).

## 1.3. Le mésothéliome pleural malin

Le mésothéliome malin est un cancer rare qui affecte les cellules mésothéliales de la plèvre, du péritoine et du péricarde (**Figure 1, panneau B**). Ce cancer est le plus souvent associé à l'exposition à l'amiante et est reconnu comme une maladie professionnelle (Yang et al., 2008; Izzi et al., 2012; Neumann et al., 2013; Bonelli et al., 2017; Chen et al., 2017).

Le mésothéliome pleural représente plus de 80% des cas de mésothéliome suivi du mésothéliome péritonéal (10%). Les mésothéliomes affectant le péricarde (6%) ainsi que la tunique vaginale (< 5%) sont beaucoup plus rares (Attanoos et al., 1997; Eren et al., 2002; Spiess et al., 2005; Yang et al., 2008; Neumann et al., 2013).

Le MPM peut se présenter selon différents sous-types histologiques. Les trois sous-types les plus connus sont l'épithéloïde (50 à 70%), le sarcomatoïde (20-35%) et le biphasique (10-20%). Le sous-type épithéloïde est constitué de cellules de grande taille de forme cubique ou polygonale (durée moyenne de survie de 18 mois). Le sous-type sarcomatoïde est observé à un stade avancé de la maladie et est caractérisé par la présence de cellules fusiformes regroupées en faisceaux (durée moyenne de survie de 8 mois). Enfin, le sous-type biphasique constitue un intermédiaire entre les deux premières formes (durée moyenne de survie de 11 mois) (Yang et al., 2008; Vandermeers et al., 2009; Carbone, Ly, et al., 2012; Izzi et al., 2012; Bonelli et al., 2017).



## 1.4. Épidémiologie du mésothéliome

Le MPM n'était pas connu avant la deuxième moitié du 20<sup>e</sup> siècle (Carbone et al., 2003). Entre 1988 et 2002, 120.544 cas avaient déjà été détectés selon l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC) dont 58% étaient issus d'Amérique du Nord, 33% d'Europe, 5% d'Océanie et 3% d'Asie (Yang et al., 2008; Remon et al., 2015). L'incidence du MPM a continué d'augmenter en raison de l'utilisation massive d'amiante au cours des dernières années (Carbone, Ly, et al., 2012). Les incidences croissantes annuelles les plus élevées ont été estimées à 30 cas par million d'habitants pour l'Australie et pour la Grande-Bretagne et 29 cas par million d'habitants pour la Belgique contre 9 cas par million d'habitants pour les Etats-Unis (Bianchi et al., 2007) (**Figure 2**). Des pics d'incidence ont pu être estimés en fonction du niveau d'utilisation de l'amiante (Remon et al., 2015). En Europe, le pic d'incidence atteindra son maximum entre 2015 et 2020, soit 250.000 nouveaux cas dans les 40 prochaines années (Yang et al., 2008; Bonelli et al., 2017). De plus, le mésothéliome semble impacter plus souvent les hommes que les femmes pour des raisons d'exposition professionnelle (Yang et al., 2008).



**Figure 2. Estimation de l'augmentation croissante annuelle du MPM à travers le monde.** ■ > 20 cas par million d'habitants; ■ 11-20 cas par million d'habitants; ■ < 11 cas par million d'habitants; □ Données non disponibles (Bianchi et al., 2007).

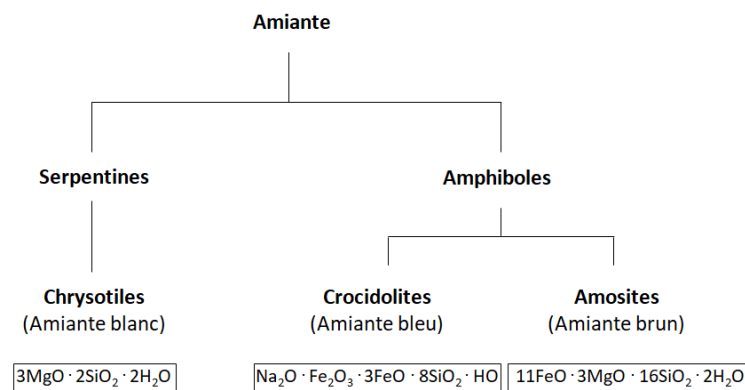
## 1.5. Étiologie du mésothéliome

L'origine du MPM est majoritairement associée à l'amiante. Cependant, d'autres facteurs ont également été liés au développement de ce cancer tels que le virus simien 40, l'érieronite, des facteurs génétiques et les rayons ionisants (Yang et al., 2008; Chen et al., 2017).

### 1.5.1. Amiante

Le terme « amiante », autrement appelé « asbeste » vient du grec signifiant « inextinguible », autrement dit « qu'il est impossible d'éteindre » (Yang et al., 2008). Il regroupe un ensemble de silicates hydratés constitués de fer, de magnésium, de calcium et/ou de sodium cristallisés (Carbone & Yang, 2012; Leong et al., 2015).

Il existe deux familles d'amiante qui se distinguent par leur composition chimique et leur structure cristalline. Les serpentines constituent la première famille et se composent de chrysotiles (amiante blanc) qui correspondent à 95% de l'amiante présent dans le monde (Carbone & Yang, 2012). La deuxième famille est l'amphibole dans laquelle les crocidolites (amiante bleu) et les amosites (amiante brun) sont retrouvées (**Figure 3**) (Yang et al., 2008; Mossman et al., 2013).



**Figure 3. Familles d'amiante.** Il existe deux familles d'amiante : les serpentines et les amphiboles. Les serpentines se composent de chrysotiles (Carbone & Yang, 2012). Les amphiboles sont constituées des crocidolites et des amosites (Yang et al., 2008; Mossman et al., 2013).

À ce jour, le lien entre les fibres d'amiante issues de la famille des amphiboles et le mésothéliome a été reconnu par la communauté scientifique, ce qui n'est pas le cas pour les chrysotiles. Néanmoins, certaines hypothèses considèrent que les chrysotiles peuvent être à l'origine du mésothéliome. Selon une étude menée par Hodgson and Darnton, il y a 500 fois plus de risque de développer le mésothéliome avec une exposition aux crocidolites et 100 fois plus de risque de le développer avec une exposition aux amosites qu'avec une exposition aux chrysotiles (Hodgson et al., 2000; Yang et al., 2008).

L'amiante est très connu pour ses propriétés de résistance à l'acide, à la friction, à la chaleur et au feu. L'amiante est utilisé comme matériau isolant dans la construction de bateaux et de bâtiments. Il est également incorporé dans le ciment pour former du fibrociment (Gibbs et al., 1998; Yang et al., 2008; Toyokuni, 2014).

L'amiante a été un matériau très abondamment utilisé entre 1940 et 1979 aux Etats-Unis et en Europe (Yang et al., 2008). En 1987, l'IARC a décrété que l'amiante est un carcinogène de groupe 1 (Toyokuni, 2014). L'Union Européenne décide donc de le bannir en 2005. L'amiante a été proscrit dans 55 pays bien qu'il soit toujours utilisé pour des raisons économiques en Chine, Russie, Kazakhstan et Inde car les alternatives à l'amiante sont coûteuses (Harris et al., 2003; Toyokuni, 2014; Leong et al., 2015; Remon et al., 2015).

Différents points peuvent caractériser la nocivité des fibres d'amiante :

- Le type d'exposition

L'incidence du MPM augmente proportionnellement à la dose d'amiante inhalée et avec le temps d'exposition (Attanoos et al., 1997; Carbone, Ly, et al., 2012).

- La dimension de la fibre

Une longueur de plus de 8  $\mu\text{m}$  peut être à l'origine d'une inflammation chronique pouvant être initiatrice d'une cancérogenèse (Attanoos et al., 1997).

- La durabilité

Des études ont montré que les fibres d'amphiboles subsistent plus longtemps au sein des poumons que les chrysotiles. En effet, les amphiboles peuvent persister pendant des décennies au sein des poumons et peuvent dès lors être à l'origine de plus de dommages. Ces différences suggèrent des effets plus cancérogènes que les serpentines (Attanoos et al., 1997).

- Les propriétés liées à la surface des fibres

Les crocidolites ont une plus grande surface de contact et présentent une plus grande quantité d'ions ferreux que les chrysotiles. Ces ions ferreux catalysent la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) pouvant être à l'origine d'oxydations. Ceci confère aux fibres de crocidolite une plus grande toxicité et augmente donc leur capacité à causer le MPM (Attanoos et al., 1997; Pass et al., 2005; Toyokuni, 2014).

### 1.5.2. Virus simien 40 (SV40)

Le SV40 est un virus à ADN, nommé polyomavirus, véhiculé par un singe, le macaque rhésus (Carbone et al., 2003; Carbone, Ly, et al., 2012). Ce virus a la caractéristique d'être plus cancérogène chez d'autres espèces et est, par exemple, capable de provoquer des tumeurs chez les hamsters et certaines souches de souris (Carbone et al., 2003). La transmission du SV40 du singe à l'homme s'est faite à travers des vaccins contre la poliomyélite entre les années 1954 et 1978 (Carbone et al., 2003; Carbone, Ly, et al., 2012). Des études, menées sur des hamsters, ont déterminé que le SV40 a causé le mésothéliome chez tous les hamsters ayant été

inoculés par voie péritonéale et chez 60% des hamsters inoculés par voie intracardiaque (Carbone, Ly, et al., 2012). L'implication du virus SV40 dans l'origine du MPM est néanmoins très contestée (Yang et al., 2008; Carbone, Ly, et al., 2012).

### 1.5.3. Erionite

L'ériionite est une fibre minérale qui a été retrouvée dans les matériaux de construction d'un village turc, Cappadocien, dans lequel un haut pourcentage de mésothéliome a été recensé (Attanoos et al., 1997). L'ériionite a été détectée dans les poumons de 50% des villageois de Cappadocien décédés du mésothéliome (Yang et al., 2008). Cette fibre minérale possède des propriétés physiques proches que celle des crocidolites, mais semble avoir un plus haut potentiel que l'amphibole à provoquer le cancer (Attanoos et al., 1997). Une étude a été menée sur deux lots de 40 rats ayant reçu une injection d'ériionite ou d'amiante. Sur les 40 rats injectés avec de l'ériionite, tous ont été touchés par le mésothéliome alors que seulement 19 rats en contact avec l'amiante ont présenté la maladie. Le caractère cancérogène de l'ériionite a ainsi pu être démontré (Yang et al., 2008).

### 1.5.4. Génétique

Une origine génétique du cancer a également été soupçonnée dès lors qu'aucun profil de dose réponse entre l'injection de fibres minérales et l'occurrence du MPM ne pouvait être démontré. Un lien entre la prédisposition génétique et le MPM a été démontré dans le village de Cappadocien. Certaines familles étaient affectées plus souvent par le MPM que d'autres (Yang et al., 2008; Carbone, Ly, et al., 2012). Les gènes mutés les plus fréquemment retrouvés dans le mésothéliome malin sont les gènes BAP1 et TP53 (Carbone & Yang, 2012; Scherpereel, 2017). Le gène BAP1 exprime une enzyme qui présente une activité "suppresseur de tumeur" en régulant les modifications post-traductionnelles liées à la réparation de l'ADN, au cycle cellulaire, à l'apoptose et à la nécrose (Carbone & Yang, 2012). Le gène suppresseur de tumeur TP53, quant à lui, est un facteur de transcription qui joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle liée au cycle cellulaire, à la réparation de l'ADN, à l'apoptose et à l'angiogénèse (Greenblatt et al., 1994; Guimaraes et al., 2002). Les mutations de ces gènes ont été retrouvées dans plusieurs familles qui ont été atteintes de mésothéliomes malins (Greenblatt et al., 1994; Guimaraes et al., 2002; Carbone & Yang, 2012; Mossman et al., 2013).

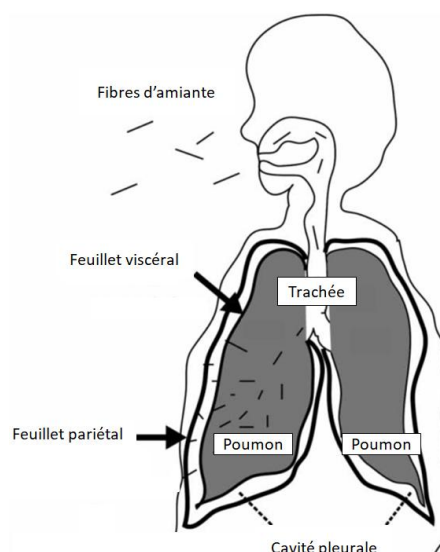
### 1.5.5. Radiation

Les rayons ionisants de la radiothérapie sont également associés au mésothéliome pleural et péritonéal. Des études ont montré que la période de latence entre le traitement radiothérapeutique et la maladie varie entre 7 et 36 ans (Attanoos et al., 1997; Carbone, Ly, et al., 2012).

## 1.6. Tumorigenèse

### 1.6.1. Impact des fibres d'amiante sur les cellules mésothéliales

La voie utilisée par les particules d'amiante pour atteindre la plèvre reste peu connue (**Figure 4**) (Donaldson et al., 2010). Les fibres d'amiante, inhalées par la voie nasale ou par la bouche, vont circuler le long de la trachée et des poumons et traverser le tissu conjonctif pour atteindre l'espace pleural (Toyokuni, 2014). Les fibres de taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$  peuvent sortir par les stomates situés sur la plèvre pariétale pour atteindre la lymphe alors que les fibres de taille supérieure à 5  $\mu\text{m}$  vont rester au sein de l'espace pleural (Donaldson et al., 2010). Les cellules mésothéliales qui tapissent la plèvre pariétale et viscérale ont pour caractéristique de pouvoir absorber les substances solides, liquides ou gazeuses et vont ainsi incorporer les fibres d'amiante (Toyokuni, 2014). La toxicité des fibres d'amiante va être à l'origine d'une inflammation, caractérisée par une effusion pleurale, et du recrutement de cellules immunitaires (Hamaidia et al., 2016).

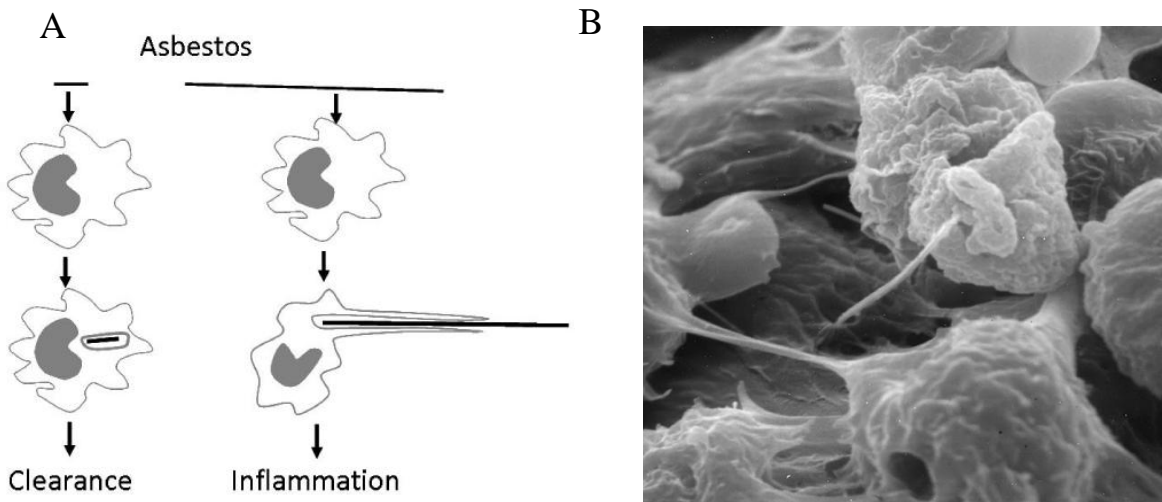


**Figure 4. Représentation schématique illustrant la voie prise par les particules d'amiante pour atteindre la plèvre.** Les fibres d'amiante sont d'abord inhalées par la voie nasale ou la bouche. Ensuite, elles circulent le long de la trachée et des poumons avant d'atteindre la plèvre (Donaldson et al., 2010; Toyokuni, 2014).

La relation entre les fibres d'amiante et le développement de la maladie semble liée à des mécanismes directs et indirects (Carbone, Ly, et al., 2012).

Les fibres d'amiante peuvent exercer un stress génotoxique sur les cellules mésothéliales (Yang et al., 2008). En effet, les fibres d'amiante peuvent altérer le cycle cellulaire de ces cellules en interférant directement avec la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (Carbone & Yang, 2012). Les fibres d'amiante peuvent également endommager l'ADN indirectement par la réaction de Fenton au cours de laquelle les ions ferreux présents à la surface des fibres vont exercer une activité redox. Cette activité va catalyser la production de ROS à la surface des fibres (Attanoos et al., 1997; Pass et al., 2005; Toyokuni, 2014). Ces ROS vont causer des stress oxydatifs à l'ADN initiant la tumorigenèse des cellules mésothéliales (Greenblatt et al., 1994; Pass et al., 2005; Yang et al., 2008; Thanan et al., 2015). De plus, les ROS peuvent également exercer un stress toxique sur les cellules mésothéliales. Ce stress cytotoxique va provoquer la mort nécrotique (une mort cellulaire prématurée et non programmée) et apoptotique (une mort cellulaire génétiquement programmée) des cellules mésothéliales (Hamaidia et al., 2016). Le stress oxydatif à l'origine des substances réactives est expliqué ultérieurement dans le manuscrit (pages 21 et 22).

Les macrophages interagissent également avec les fibres d'amiante. Les fibres d'amiante de taille  $< 15 \mu\text{m}$  peuvent être éliminées par les macrophages grâce à la phagocytose (Donaldson et al., 2010). À l'inverse, les fibres de taille supérieure ne peuvent pas être entièrement incorporées par les macrophages, générant une phagocytose frustrée (**Figure 5, panneaux A et B**). Au cours de cet événement, le contenu des phagosomes, riche en ROS et en substances réactives azotées (RNS) destiné à détruire les fibres, va être libéré dans le milieu extracellulaire. Ces substances réactives vont être à l'origine de dommages oxydatifs à l'ADN provoquant des mutations (expliqué page 21). Ces mutations sont susceptibles d'être à l'origine d'une activation d'oncogènes et d'une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, amenant à des processus carcinogènes (Hamaidia et al., 2016). De plus, ces substances réactives vont également être à l'origine de dommages aux lipides et aux protéines (expliqué page 22) (Wiseman et al., 1996; Prolo et al., 2014; Thanan et al., 2015).



**Figure 5. A. Représentation schématique de la phagocytose frustrée.** Les fibres d'amiante  $< 15 \mu\text{m}$  peuvent être éliminées par les macrophages grâce à la phagocytose. À l'inverse, les fibres de taille supérieure ne peuvent pas être entièrement englouties par les macrophages, subissant une phagocytose frustrée (Donaldson et al., 2010; Hamaidia et al., 2016). **B. Phagocytose frustrée observée au microscope électronique** (Pass et al., 2005).

### 1.6.2. Importance des voies de signalisation dans la prolifération tumorale

Au cours de la tumorigenèse, les fibres d'amiante induisent l'expression de récepteurs de facteurs de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les cellules mésothéliales et les macrophages. Ceci a pour conséquence d'activer la voie facteur nucléaire-kappa B (NF- $\kappa$ B), qui inhibe l'apoptose et permet aux cellules tumorales de proliférer (Yang et al., 2008; Carbone & Yang, 2012). De plus, les fibres d'amiante vont engendrer l'activation des protéines kinases activées par les agents mitogènes (MAPK). Ces MAPK sont impliquées dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire (Cargnello et al., 2011). L'activation des MAPK permet ainsi de jouer un rôle dans la prolifération des cellules de mésothéliome (Carbone & Yang, 2012).

Divers facteurs de croissance et cytokines vont également être impliqués dans la prolifération des cellules de mésothéliome:

- les facteurs de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ),
- les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF),
- les facteurs de croissance de type insuline (IGF),
- les interleukines-6 et -8 (IL-6 et IL-8),
- les facteurs de croissance des hépatocytes (HGF) (Yang et al., 2008).

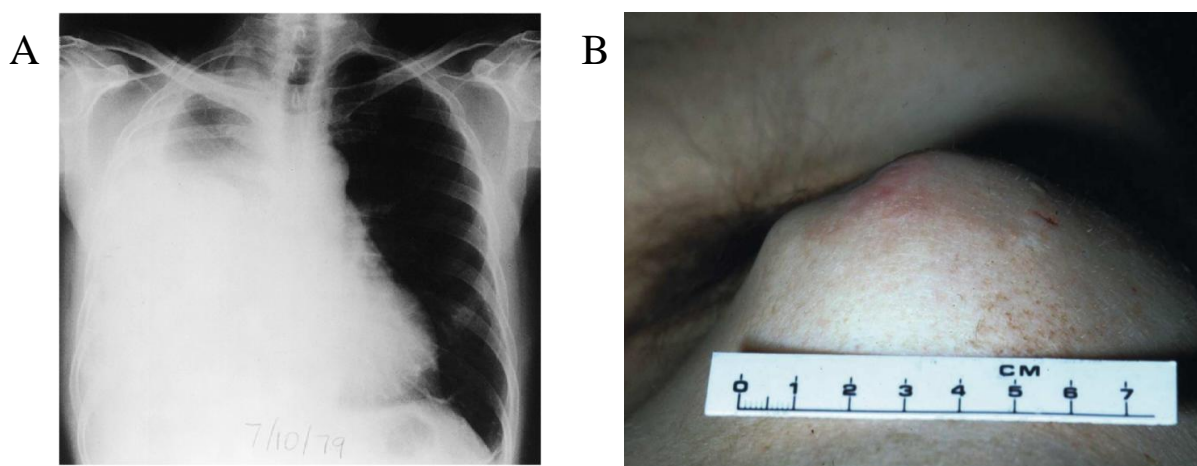
Enfin, les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) vont également jouer un rôle dans la stimulation de l'angiogenèse tumorale (Yang et al., 2008).

## 1.7. Diagnostic et traitement

### 1.7.1. Diagnostic

Le MPM est caractérisé par un temps de latence élevé (25-45 ans) entre l'exposition à l'amiante et son apparition (Yang et al., 2008; Carbone, Ly, et al., 2012).

Le diagnostic du mésothéliome est tardif et est basé sur des critères cytologiques, histologiques et immunohistochimiques (Attanoos et al., 1997; Robinson et al., 2005). Les patients atteints de MPM présentent le plus souvent des douleurs thoraciques et une détresse respiratoire. De plus, ils peuvent également présenter une masse dans l'espace pleural et/ou au niveau de la paroi thoracique ainsi que des invasions locales, telles qu'une compression œsophagienne et une étendue de la tumeur au-delà de la peau (**Figure 6, panneaux A et B**) (Robinson et al., 2005).



**Figure 6 A. Radiographie d'un patient atteint de MPM.** La radiographie présente une effusion pleurale dans le poumon droit (Pass et al., 2005). **B. Image d'un patient présentant une extension pleurale** (Robinson et al., 2005).

### 1.7.2. Traitements conventionnels

À l'heure actuelle, le MPM est incurable et les moyens de traitement mis en place ne permettent d'allonger la durée de vie des patients que de quelques mois (Friedberg et al., 2017).

Les techniques de chirurgie sont essentiellement utilisées à des fins curatives, visant la guérison, et palliatives, ne visant qu'à soulager le patient (Robinson et al., 2005; Suryanarayana Deo et al., 2013).

En ce qui concerne l'approche curative, la pneumonectomie extrapleurale, constitue la méthode chirurgicale la plus agressive (Robinson et al., 2005; Mossman et al., 2013). Elle est



basée sur l'ablation de l'enveloppe pleurale et de tout son contenu, incluant le lobe pulmonaire ipsilatéral, le diaphragme et une portion du péricarde (Weder et al., 2004; Mossman et al., 2013). Cette technique est souvent combinée avec une approche radiothérapeutique (Weder et al., 2004).

La pleurectomie partielle avec pleurodèse constitue une approche palliative (Robinson et al., 2005; Mossman et al., 2013). La pleurectomie consiste en l'enlèvement de la plèvre ainsi que toutes les tumeurs macroscopiques et peut également être nommée "étendue" ou "radicale" selon que le diaphragme et le péricarde sont excisés (Mossman et al., 2013). La pleurodèse, quant à elle, permet un drainage du fluide pleural suivi de l'instillation d'un irritant, tel que du talc stérile, en vue de clôturer l'espace pleural (symphyse pleurale) (Mossman et al., 2013).

La radiothérapie est une technique qui envoie des rayons ionisants dans les régions du corps touchées par le cancer. La radiothérapie n'est utilisée qu'à des fins palliatives et permet d'avoir un meilleur contrôle de l'étendue du cancer avant d'effectuer une pneumonectomie (Mossman et al., 2013). Utilisées seules, les techniques radiothérapeutiques s'avèrent très décevantes. En revanche, lorsqu'elles sont combinées avec la pneumonectomie extrapleurale, les résultats présentent un meilleur succès, bien que les patients meurent de maladies métastatiques (Robinson et al., 2005). Un essai clinique de phase 2 qui administre un traitement radiothérapeutique après une pneumonectomie extrapleurale a présenté une médiane de survie de 17 mois (Rimner et al., 2012).

La chimiothérapie anticancéreuse est une technique destinée à inhiber la croissance tumorale par l'utilisation de médicaments interférant dans la synthèse protéique ou bloquant la division cellulaire. Cette approche permet de limiter la progression tumorale (Chauvergne et al., 2001). Actuellement, il existe deux types de traitements principaux.

Le premier traitement consiste à mettre les patients en présence de deux agents chimiothérapeutiques : le pemetrexed et le cisplatine. Le pemetrexed est un antifolate qui agit en inhibant la thymidylate synthase nécessaire à la synthèse de l'ADN. Le cisplatine est un complexe composé d'une molécule de platine sur laquelle sont fixés du chlore et de l'ammoniac. Le cisplatine est capable de se lier avec les guanines par des liaisons covalentes, formant un pontage à l'ADN et inhibant ainsi sa réplication (Fuertes et al., 2003; Robinson et al., 2005). Des études cliniques ont montré que la combinaison du cisplatine avec le pemetrexed permettait d'avoir une meilleure efficacité que le cisplatine seul (Robinson et al., 2005). En effet, le taux moyen de survie est de 12.1 mois au moyen d'un traitement utilisant

les deux molécules et de 9,3 mois pour le cisplatine seul (Szulkin et al., 2013; Bonelli et al., 2017). Ce premier moyen de traitement chimiothérapique constitue la seule thérapie approuvée par la US Food and Drug Administration (FDA) (Bonelli et al., 2017). De plus, une autre étude a démontré que l'utilisation du valproate, un inhibiteur de déacétylase (enzyme impliquée dans la déacétylation des histones), en combinaison avec le cisplatine et le pemetrexed permettait d'améliorer l'efficacité du traitement du mésothéliome en augmentant le pourcentage de mortalité par apoptose des cellules de mésothéliome (Vandermeers et al., 2009).

Une deuxième approche utilise la gemcitabine couplée au cisplatine. La gemcitabine est un analogue de nucléotide qui empêche la polymérisation de l'ADN. Ce moyen de traitement ne peut être utilisé en première intention avant de passer par un essai clinique de phase 3 (Bonelli et al., 2017).

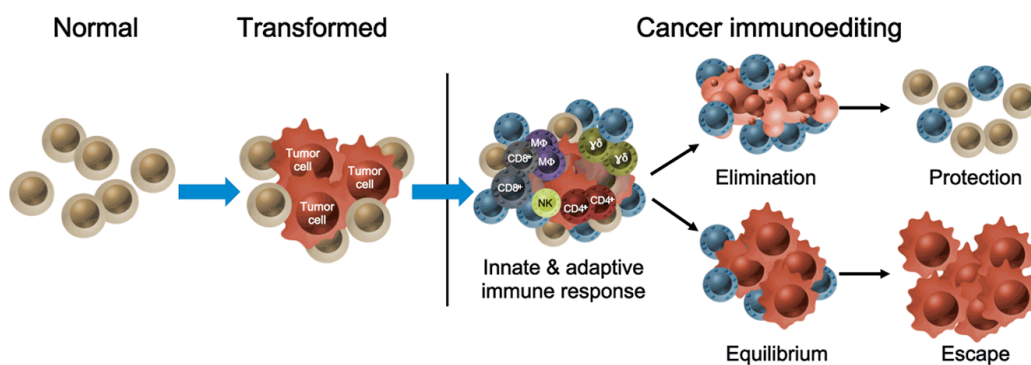
## 2. Le système immunitaire

### 2.1. La réaction inflammatoire

Le rôle du système immunitaire est de maintenir l'intégrité de l'organisme (le soi) en luttant contre des agressions d'origine exogène (micro-organismes, substances toxiques) et endogène (cellules cancéreuses). L'inflammation est une réponse coordonnée du système immunitaire face à l'agression. Lorsque le corps est agressé, des cellules immunitaires interviennent dans la reconnaissance de cette agression et libèrent des cytokines et d'autres médiateurs chimiques. S'ensuivent, la dilatation des vaisseaux et la migration d'autres cellules vers le site de l'agression. Par l'effet des cytokines sur les vaisseaux sanguins, la réponse inflammatoire est caractérisée par les quatre signes suivants : douleur, rougeur, chaleur et gonflement (Janeway et al., 1997; Owen et al., 2013).

Les cellules tumorales sont des cellules du soi modifiées qui portent des anomalies morphologiques, biochimiques (modification de la prolifération cellulaire), et biologiques (acquisition de phénotypes) (Lacave et al., 2005). Les cellules immunitaires ont la capacité de reconnaître des antigènes associés aux tumeurs (TAA). Les TAAs sont des macromolécules exprimées par les cellules tumorales qui sont capables de déclencher une réponse immunitaire (Owen et al., 2013). Au cours de la tumorigenèse, le système immunitaire va développer une immunité antitumorale suivant la théorie de l'immunosurveillance (**Figure 7**). Cette théorie

est caractérisée par trois étapes. Dans un premier temps, sur base de la reconnaissance des TAAs, les cellules immunitaires vont reconnaître les cellules tumorales et vont pouvoir les éliminer. Ensuite, les cellules tumorales vont développer des mécanismes d'échappement immunitaire qui vont réduire l'efficacité de l'immunité antitumorale (production de cytokines anti-inflammatoires, réduction de l'expression des TAAs, ...) (Finn, 2012). De cette manière, il va se dérouler une phase d'équilibre au cours de laquelle le système immunitaire n'élimine plus qu'une partie des cellules tumorales qui vont ainsi pouvoir continuer à croître. Finalement, les cellules tumorales vont échapper aux mécanismes de surveillance du système immunitaire permettant ainsi leur progression (Dunn et al., 2002; Lamagna et al., 2006; Finn, 2012).



**Figure 7. Théorie de l'immunosurveillance.** En présence de cellules tumorales, le système immunitaire va développer une immunité antitumorale. Dans un premier temps, le système immunitaire peut éliminer complètement la tumeur. Néanmoins, les cellules tumorales peuvent développer des mécanismes d'échappement immunitaire ne permettant plus au système immunitaire de supprimer complètement la tumeur, c'est la phase d'équilibre (Dunn et al., 2002; Finn, 2012). Finalement, les cellules tumorales vont complètement échapper à l'immunité antitumorale permettant leur progression (AMGEN Oncology taking on the toughest cancers. Redirecting T Cells. Consulté le 06/07/17).

Le système immunitaire est subdivisé en deux branches interconnectées : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif (Janeway et al., 1997; Lamagna et al., 2006; Owen et al., 2013).

### 2.1.1. L'immunité innée

L'immunité innée est impliquée dans la réaction immédiate en réponse à une agression. L'immunité innée comprend quatre types de barrières défensives :

- la barrière anatomique (la peau, les muqueuses),
- la barrière chimique (les sécrétions acides),
- la barrière cellulaire (les cellules épithéliales, les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes),

- la barrière humorale (les facteurs du complément) (Janeway et al., 1997; Owen et al., 2013).

L'immunité innée est initiée par la reconnaissance de motifs conservés, exprimés par des pathogènes, les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) et par la reconnaissance de ligands produits par des cellules mortes ou en stress et par des cellules tumorales, les *Damage-associated molecular pattern ou alarmine* (DAMPs) (Akira et al., 2013; Owen et al., 2013). La détection de ces motifs s'effectue grâce à l'expression d'un panel de récepteurs membranaires et cytosoliques appartenant à la famille des *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) qui sont exprimés par les cellules immunitaires (Janeway et al., 1997).

Un exemple de PRR est le récepteur Toll Like receptor 4 (TLR-4) qui est exprimé par la plupart des cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques) (Lorenz et al., 2002). Le TLR-4 est impliqué dans la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS), un composant exprimé au niveau de la membrane des bactéries GRAM<sup>-</sup>, mais aussi dans la reconnaissance des DAMPs tels que les high mobility group box-1 protein (HMGB1) et les ténascines qui sont exprimées par les cellules de MPM (Lorenz et al., 2002; Kaarteenaho-Wiik et al., 2003; Hamaidia et al., 2016; Chen et al., 2017). L'engagement du TLR-4 va induire une cascade de signalisations intracellulaires qui va activer plusieurs facteurs de transcription (RelA, RelB, c-Rel, NFκB1, NFκB2, IRF3). Ces facteurs de transcription vont induire l'expression de gènes pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-12, iNOS, interféron de type 1 (IFN)...) (Xagorari et al., 2002; Foell et al., 2007; Kawai et al., 2010; Brown et al., 2011; Perry et al., 2014).

### 2.1.2. L'immunité adaptative

À l'inverse de l'immunité innée, l'immunité adaptative prend plus de temps à s'activer et met en moyenne 5 à 6 jours à se mettre en place. De plus, l'immunité adaptative est plus spécifique, car les récepteurs impliqués dans cette immunité ont une spécificité unique contre les antigènes associés aux cellules de MPM. L'immunité adaptative est également caractérisée par une mémoire immunologique qui permet d'avoir une réponse plus rapide et efficace lors de la seconde rencontre avec le même pathogène (Janeway et al., 1997; Owen et al., 2013).

L'immunité adaptative est initiée par les cellules présentatrices d'antigène et menée par les lymphocytes. Les lymphocytes sont des cellules issues de la lignée lymphoïde qui trouvent leur origine dans la moelle osseuse et représentent 20 à 40% des globules blancs circulant

dans le sang. Il existe deux types de lymphocytes : les lymphocytes T (LT) liés à la réponse cellulaire et les lymphocytes B (LB) liés à la réponse humorale (Owen et al., 2013).

Les LT comprennent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou helper (LT CD4<sup>+</sup>) qui expriment les *clusters of differentiation 4* et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (LT CD8<sup>+</sup>) ou cytotoxiques qui expriment les *clusters of differentiation 8*. Afin d'être activés et de pouvoir assurer leurs fonctions effectrices, les lymphocytes doivent d'abord interagir avec des cellules présentatrices d'antigène (Janeway et al., 1997; Owen et al., 2013). Les LT CD4<sup>+</sup> ont un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire et vont permettre d'activer les LB, les macrophages et les LT CD8<sup>+</sup>. Les LT CD8<sup>+</sup> ont un rôle dans l'élimination de pathogènes intracellulaires tels que les cellules infectées par un virus ou les cellules tumorales en induisant une réponse de mort cellulaire programmée (Owen et al., 2013; Prendergast et al., 2013).

Parallèlement aux LT, une fois activés, une partie des LB se différencient en plasmocytes. Ces plasmocytes sécrètent une grande quantité d'anticorps spécifiques des TAAs (anti-p53, anti-mésothéline...) dans l'environnement. Les anticorps constituent des immunoglobulines solubles formées par deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques. Chacune de ces chaînes est subdivisée en régions constantes et régions variables. Les régions variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère sont constituées de paratopes, les zones de l'anticorps qui vont reconnaître spécifiquement les zones particulières de l'antigène, dites épitopes (Janeway et al., 1997; Owen et al., 2013). Les anticorps vont jouer un rôle dans la fixation des pathogènes ou de leurs toxines afin d'empêcher leur entrée dans les cellules (neutralisation), dans la liaison avec des agents pathogènes afin de les rendre plus reconnaissables (opsonisation) et dans l'activation du système du complément en se liant aux facteurs du complément. Finalement, ils vont également pouvoir recruter des cellules Natural Killer (NK) qui vont s'armer d'anticorps, leur conférant une spécificité contre les TAAs et jouant ainsi un rôle dans l'induction d'apoptose (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) (Owen et al., 2013).

## 2.2. Les macrophages et le système immunitaire

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée d'origine myéloïde ayant une localisation tissulaire. Ils sont nommés différemment en fonction des tissus : les macrophages alvéolaires (poumons), les cellules de Kupffer (foie), les ostéoclastes (os) (Murray et al.,

2011). Les macrophages ont un rôle important dans la surveillance du soi et dans les différentes phases de la réponse inflammatoire (Murray et al., 2011; Duque et al., 2014). De plus, ils ont la particularité de jouer un rôle d'intermédiaire entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Owen et al., 2013). Les macrophages constituent une première ligne de défense contre les cellules tumorales et font partie des cellules immunitaires les plus présentes dans le MPM, suscitant donc leur intérêt scientifique (Ahsan et al., 2002; Lamagna et al., 2006; Izzi et al., 2009).

### 2.2.1. L'origine des macrophages

Les macrophages sont produits dans la moelle osseuse, à partir des cellules souches hématopoïétiques qui sont caractérisées par leur capacité d'autorenouvellement et de différenciation cellulaire (Owen et al., 2013). Ces cellules souches hématopoïétiques vont se différencier en progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes. Exposés à des cytokines, telles que le « colony stimulating factor 1 (CSF-1) », qui est impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire, les progéniteurs myéloïdes vont se différencier en monocytes dans la moelle osseuse. Les monocytes vont ensuite migrer dans le sang en réponse à des facteurs chimioattractants (C-C motif ligand-2 (CCL-2) et les C-C motif ligand-5 (CCL-5)) (Lamagna et al., 2006; Duque et al., 2014). Il existe trois sous-populations de monocytes circulants qui se distinguent par l'expression différentielle de récepteurs CD14 et CD16 :

- les monocytes classiques (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>),
- les monocytes non classiques (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup>),
- les monocytes intermédiaires (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) (Mandl et al., 2014; Hamaidia et al., 2016).

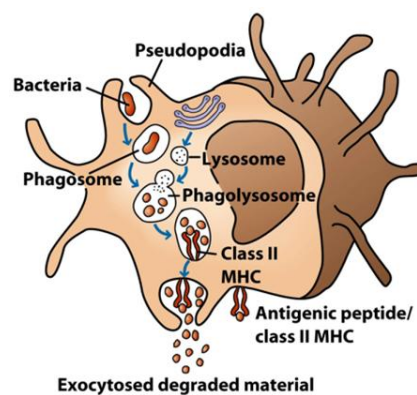
Les monocytes classiques expriment le CD14 mais pas le CD16. Ils représentent les monocytes majoritaires et initient l'immunité antitumorale. Les monocytes non classiques expriment le CD14 et expriment fortement le CD16. Enfin, les monocytes intermédiaires expriment le CD14 et le CD16 (Stansfield et al., 2015; Hamaidia et al., 2016).

Finalement, les monocytes se différencient en macrophages lors de leur passage à travers l'endothélium pour rejoindre le site d'inflammation (Hamaidia et al., 2016).

## 2.2.2. Rôles des macrophages

### 2.2.2.1. Phagocytose

La phagocytose est un processus cellulaire au cours duquel des phagocytes internalisent du matériel particulaire (Owen et al., 2013). Il existe deux types de phagocytose : l'une dite opsonique et l'autre non opsonique. La phagocytose opsonique est basée sur la reconnaissance de protéines solubles, telles que les anticorps (opsonines), qui recouvrent la surface des micro-organismes par les récepteurs des phagocytes (Aderem et al., 1999; Owen et al., 2013). L'interaction avec ces opsonines va induire la phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM des récepteurs engagés (Aderem et al., 1999). Les motifs ITAM correspondent à deux séquences conservées de quatre acides aminés Y-X-X-L/I, espacées par 6 à 7 acides aminés et sont exprimées par les cellules du système immunitaire (Isakov, 1997; Aderem et al., 1999). La phosphorylation des tyrosines de ces motifs ITAM va être à l'origine de la polymérisation de l'actine sous la membrane plasmique (Aderem et al., 1999). La phagocytose non opsonique, quant à elle, est basée sur la reconnaissance directe des PAMPs (composants glucidiques, LPS) au moyen des PRRs présents à la surface des phagocytes (**Figure 8**). Cette reconnaissance va également induire la polymérisation de l'actine sous la membrane plasmique et va être à l'origine d'une phagocytose par invagination au cours de laquelle des pseudopodes vont se former pour internaliser les agents pathogènes et générer un phagosome. Le phagosome va ensuite fusionner avec un lysosome formant un phagolysosome. Ce lysosome contient tout le matériel de dégradation incluant des protéines et peptides antimicrobiens (défensines), un pH bas, des enzymes hydrolytiques (protéases), et finalement des radicaux oxygénés et azotés, permettant une attaque oxydative (Aderem et al., 1999; Owen et al., 2013).



**Figure 8. Phagocytose non opsonique d'une bactérie par un macrophage.** Après reconnaissance des PAMPs par les PRRs des cellules immunitaires, celles-ci vont invaginer les agents pathogènes grâce aux pseudopodes qu'elles forment et forment un phagosome. Le phagosome fusionne avec un lysosome qui contient tout le matériel de dégradation protéique (Owen et al., 2013).

### 2.2.2.2. Cellules présentatrices d'antigène

Les macrophages jouent un rôle clé à l'interface de l'immunité innée et adaptative. Après l'étape de capture antigénique par phagocytose, les macrophages présentent le peptide antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II aux LT. La coopération macrophage/LT appelée synapse immunologique va induire la survie, l'activation et la prolifération (expansion clonale) des LT. Les LT CD4<sup>+</sup> vont libérer des cytokines pro-inflammatoires qui vont soutenir l'activation des LT CD8<sup>+</sup> et la production d'anticorps par les LB spécifiques de l'antigène (Owen et al., 2013).

### 2.2.2.3. Production de substances réactives

Au cours de la phagocytose, les macrophages vont produire des substances réactives oxygénées et azotées (RONS) en réponse à des cytokines pro-inflammatoires et/ou à une stimulation au LPS.

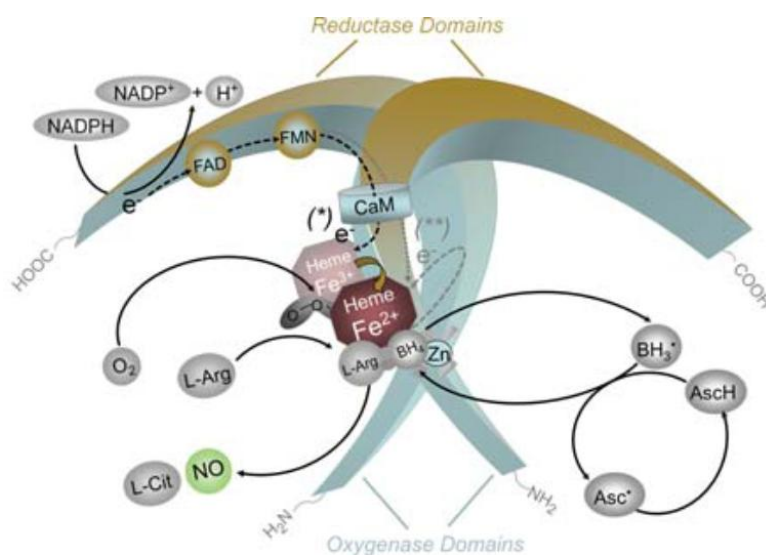
#### 2.2.2.3.1. Substances réactives oxygénées (ROS)

Les ROS englobent, d'une part, les ions superoxydes ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) et les radicaux hydroxylés ( $\bullet\text{OH}$ ), des composés possédant un électron non apparié qui est responsable de leur grande instabilité et de leur grande susceptibilité de réaction (Lomas et al., 2001; Eruslanov et al., 2010). D'autre part, les ROS englobent les peroxydes ( $\text{ROOR}'$ ), les hydro peroxydes ( $\text{ROOH}$ ) ainsi que les peroxydes d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Eruslanov et al., 2010). La production de ROS est réalisée par un complexe enzymatique membranaire appelé la NADPH oxydase (Segal, 2008; Eruslanov et al., 2010). La NADPH oxydase est formée d'un complexe protéique (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, Rac2 et gp91<sup>phox</sup>) qui s'assemble au niveau de la membrane lors de la reconnaissance des PAMPS (Segal, 2008). L'oxygène à l'origine de ces radicaux oxygénés est fourni par un processus métabolique appelé explosion oxydative. Lors de la phagocytose, la NADPH oxydase transforme cet oxygène en ion superoxyde. L'ion superoxyde est ultérieurement transformé en d'autres dérivés oxygénés tels que le peroxyde d'hydrogène au moyen de la superoxyde dismutase (Owen et al., 2013). Des cellules ont la capacité de se protéger des ROS au moyen de la superoxyde dismutase, qui détoxifie le  $\text{O}_2^-$ , de la catalase et de la glutathion peroxydase qui détoxifie le  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Day, 2009; Dunning et al., 2013).



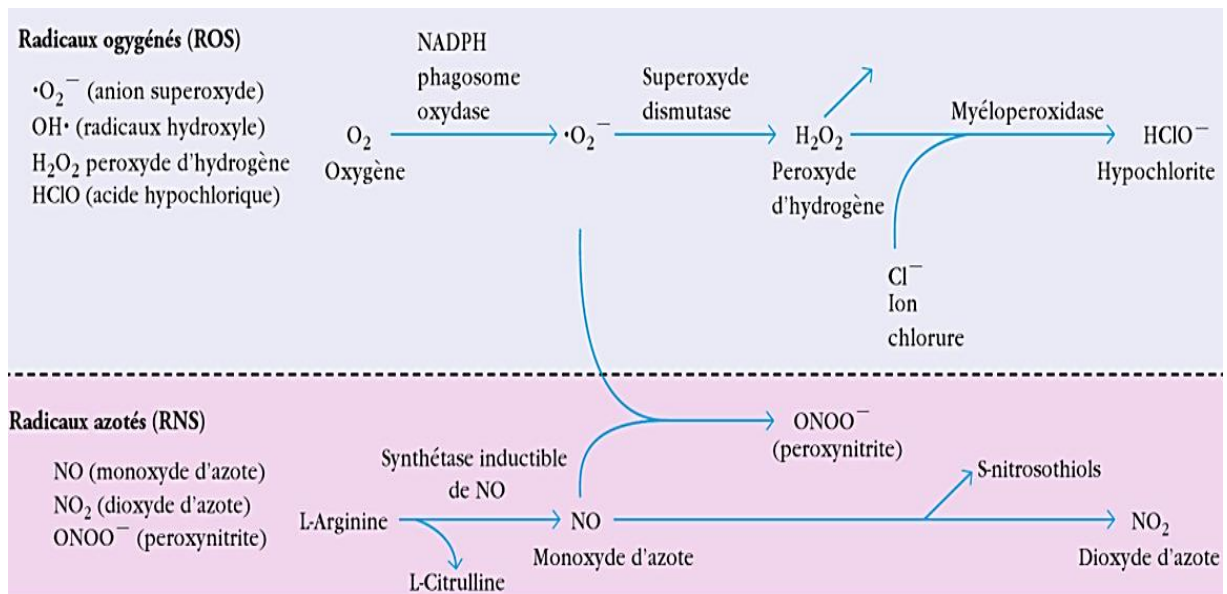
### 2.2.2.3.2. Substances réactives azotées (RNS)

Les RNS incluent les monoxydes et dioxydes d'azote (NO et NO<sub>2</sub>). Elles sont formées par la *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS), également activée lors de la reconnaissance de pathogènes par les macrophages (Owen et al., 2013; Thanan et al., 2015). iNOS est une enzyme constituée de deux monomères qui contiennent un domaine réductase et un domaine oxygénase (**Figure 9**). iNOS utilise la L-arginine comme substrat et le NADPH et l'O<sub>2</sub> comme co-substrat. Les co-facteurs, flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN) et (6R-)5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterine (BH<sub>4</sub>) sont également nécessaires à la réaction. Au cours de celle-ci, les électrons, à l'origine de l'oxydation du NADPH, sont transférés de la partie carboxy-terminale des domaines réductases via le FAD et le FMN vers les noyaux hèmes situés dans la partie amino-terminale des domaines oxygénases. Parallèlement à cela, lorsque les domaines oxygénases contiennent suffisamment de L-arginine et de BH<sub>4</sub>, l'enzyme iNOS couple ses noyaux hèmes. Au sein des noyaux hèmes, les électrons sont utilisés afin de réduire l'oxygène et ainsi d'oxyder le L-arginine en L-citrulline et NO (Olken et al., 1994; Förstermann et al., 2012).



**Figure 9. Production du NO par l'enzyme iNOS.** Au cours de la réaction, les électrons venant de NADPH sont transférés de la partie carboxy-terminal des domaines réductases via le FAD et le FMN vers les noyaux hèmes dans la partie amino-terminale des domaines oxygénases. Au sein des noyaux hèmes, les électrons sont utilisés afin de réduire l'oxygène et ainsi oxyder le L-arginine en L-citrulline et NO (Förstermann et al., 2012).

De plus, les ions superoxydes peuvent également se lier au monoxyde d'azote pour former des peroxynitrites (ONOO<sup>-</sup>), molécules plus réactives (**Figure 10**) (Thanan et al., 2015).

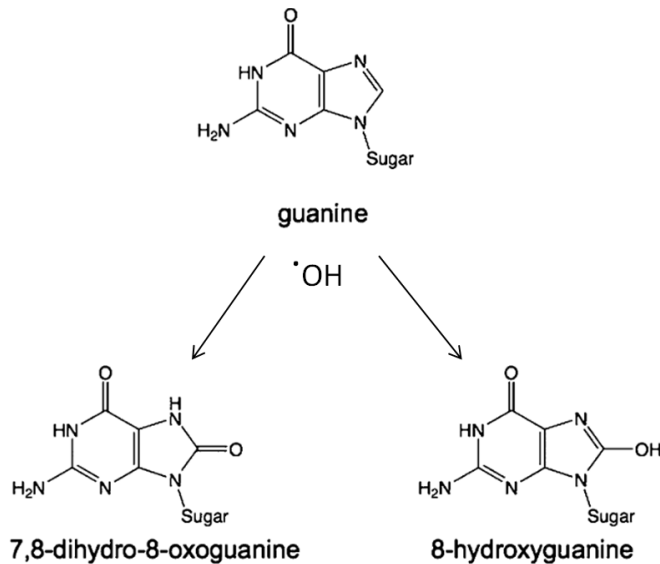


**Figure 10. Production d'espèces réactives oxygénées et azotées.** Les macrophages ont la capacité de produire des radicaux oxygénés et azotés. La NADPH oxydase produit des ions superoxydes et la synthétase inductible de NO produit des monoxydes et dioxydes d'azote. Les ions superoxydes peuvent également se lier avec les monoxydes d'azote pour former des peroxynitrites (Owen et al., 2013).

### 2.2.2.3.3. Rôles des RONS

Les RONS agissent comme agents antimicrobiens très toxiques en altérant l'ADN, les lipides et les protéines des agents pathogènes (Owen et al., 2013). De plus, ces substances réactives sont de plus en plus reconnues pour jouer un rôle clé dans les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson) et dans le développement de cancers tels le mésothéliome (Wiseman et al., 1996; Munn, 2017).

Alors que les RNS altèrent l'ADN par des réactions de nitration, nitrosylation et déamination de bases, les ROS vont être à l'origine de stress oxydatifs à l'ADN (Thanan et al., 2015; Hamaidia et al., 2016). Les ROS vont notamment oxyder les guanines en 8-hydroxyguanines et en 7,8 dihydro-8-oxoguanines, des composés capables de former des liaisons hydrogènes avec des deoxycytidines ou deoxyadenines, introduisant ainsi des mutations lors de la réplication de l'ADN (**Figure 11**) (Wiseman et al., 1996; Hamaidia et al., 2016). La 8-hydroxyguanine va également altérer une enzyme catalysant la méthylation des cytosines, importante dans la régulation de l'expression des gènes (Wiseman et al., 1996). Les stress générés par les RONS vont générer des cassures simples ou doubles brins de l'ADN, des substitutions, des délétions, des réarrangements et des insertions de bases (Greenblatt et al., 1994; Pass et al., 2005; Yang et al., 2008; Thanan et al., 2015).



**Figure 11. Oxydation des guanines.** Les ROS oxydent les guanines en 8-hydroxyguanines et en 7,8 dihydro-8-oxoguanines (Wiseman et al., 1996; Wells et al., 2009; Hamaidia et al., 2016).

Les RONS peuvent également altérer les lipides par des réactions d'oxydation et de nitration (Prolo et al., 2014; Thanan et al., 2015). En effet, leurs radicaux libres peuvent attaquer les acides gras libres présents dans la bicouche lipidique des membranes biologiques altérant ainsi les propriétés membranaires et générant des intermédiaires instables ( $\text{LOO}^\circ$ - LOOH) qui vont être à l'origine d'une réaction en chaîne (Prolo et al., 2014). Les RONS vont également générer des oxystérols par l'oxydation du cholestérol et réaliser des réactions de nitration des acides gras libres par le biais des peroxy-nitrites. Ces modifications chimiques vont ainsi altérer les fonctions biologiques des lipides nécessaires au bon fonctionnement cellulaire (Prolo et al., 2014; Thanan et al., 2015).

De plus, les RONS exercent un rôle important dans l'altération des protéines. Ces altérations peuvent se faire par des réactions d'oxydation des groupements prosthétiques métalliques et des groupements thiols sur les résidus cystéines et méthionines, par des réactions de nitration sur les résidus tyrosines et tryptophanes et par des réactions de S-nitrosylation des groupements thiols et amines (Rahat et al., 2013). Ces altérations peuvent affecter la conformation et la fonctionnalité des protéines et peuvent également interférer avec les voies de signalisation. Par exemple, la nitration des protéines du cytosquelette peut altérer leur structure et induire leur protéolyse (Albina et al., 1998). De plus, la nitration et la nitrosylation des tyrosines par les peroxy-nitrites empêchent leur phosphorylation, indispensable à la transduction du signal (Wiseman et al., 1996, 2012; Albina et al., 1998).

#### 2.2.2.4. Production de cytokines

Les cytokines sont des protéines ayant généralement une masse moléculaire inférieure à 30kDa. Elles assurent la communication entre les cellules du système immunitaire. La plupart des cytokines sont solubles bien qu'il y ait une faible proportion qui existe sous forme membranaire. Les cytokines sont produites principalement par des cellules immunitaires en réponse à des stimuli et agissent en se liant aux récepteurs des cellules. De cette manière, les cytokines déclenchent les voies de signalisation et induisent l'expression de gènes (Owen et al., 2013).

Les cytokines sont caractérisées par des propriétés de pléiotropie, lorsqu'elles exercent une action différente en fonction de la nature de la cellule cible (IL-4), de redondance, lorsqu'elles exercent des fonctions semblables (IL-2, IL-4 et IL-5) et des propriétés antagonistes, lorsqu'elles compensent les effets d'autres cytokines (IL-4 et IFN- $\gamma$ ). Elles peuvent également présenter des propriétés de synergie, lorsque l'effet de deux cytokines combinées est plus grand que l'addition des effets de chaque cytokine (IL-4 et IL-5) et des propriétés d'induction en cascade lorsque les cellules cibles se mettent également à produire des cytokines (Owen et al., 2013).

Les cytokines peuvent être définies comme paracrines, autocrines ou endocrines en fonction de la distance entre la cellule sécrétrice de cytokines et la cellule cible. Les cytokines sont dites paracrines si l'action est limitée à un environnement proche, autocrines si les cytokines agissent sur les propres récepteurs de la cellule sécrétrice et endocrines si l'action de la cytokine est étendue à un environnement éloigné (Owen et al., 2013; Duque et al., 2014).

Selon leur structure et fonction, les cytokines ont été subdivisées en six familles : les IL-1, les hématopoïétines, les IFN, les TNF, les IL-17 et enfin les chimiokines (Owen et al., 2013). De plus, les cytokines sont également subdivisées en cytokines pro-inflammatoires telles que les TNF, IL-1, IL-6, IL-18... et en cytokines anti-inflammatoires telles que les IL-10, facteurs de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-8 (Duque et al., 2014)...

Quand les macrophages sont présents dans un environnement inflammatoire, ils sécrètent des cytokines, dont les TNF, les IL-1, IL-6, IL-8 et IL-12. Les TNF correspondent à des glycoprotéines connues pour leur capacité à induire la nécrose dans certaines tumeurs (Duque

et al., 2014). Les IL-1 induisent l'augmentation de la perméabilité des capillaires et de la migration des leucocytes au site de l'infection, amplifiant ainsi la réponse pro-inflammatoire (Owen et al., 2013; Duque et al., 2014). Les IL-6 sont des cytokines qui amplifient la différenciation des cellules B en plasmocytes, activent les cellules T cytotoxiques. Les IL-8 constituent des chimioattractants pour les neutrophiles et induisent des dégranulations et des changements morphologiques. Finalement, les IL-12 sont des molécules hétérodimériques permettant d'amplifier l'immunité à médiation cellulaire en stimulant les lymphocytes T<sub>H1</sub>. De plus, elles ont des propriétés synergiques avec les TNF et d'autres cytokines pro-inflammatoires qui induisent une production de IFN- $\gamma$  et l'activation des NK et des LT CD8<sup>+</sup> (Duque et al., 2014).

### 2.2.3. Plasticité des macrophages

Les macrophages ont la particularité de présenter différents états d'activation en fonction des stimuli produits dans l'environnement dans lequel ils se trouvent. Ces états d'activation sont étroitement associés à la polarisation des lymphocytes T<sub>H1</sub> et des lymphocytes T<sub>H2</sub>. Les lymphocytes T<sub>H1</sub> augmentent l'activité cytolytique des macrophages et des LT CD8<sup>+</sup> et protègent contre les pathogènes intracellulaires alors que les lymphocytes T<sub>H2</sub> induisent la sécrétion d'anticorps par les LB et protègent contre les pathogènes extracellulaires. Ces états d'activation se répartissent entre deux phénotypes extrêmes (**Figure 12**) :

- les macrophages activés de manière classique (M1)
- les macrophages activés de manière alternative (M2).

La différenciation des macrophages vers un phénotype est appelée « polarisation ». Cette différenciation est dépendante de l'expression des gènes à l'origine de M1 ou de M2 et peut être modulée par des mécanismes épigénétiques (Ivashkiv, 2013). Alors que les macrophages M1 sont impliqués au cours de l'inflammation précoce et sont associés à une activité antitumorale, les macrophages M2 sont impliqués dans l'arrêt de l'inflammation et sont associés à une activité pro-tumorale (Murray et al., 2011; Quatromoni et al., 2012; Owen et al., 2013; Duque et al., 2014; Chéné et al., 2016).

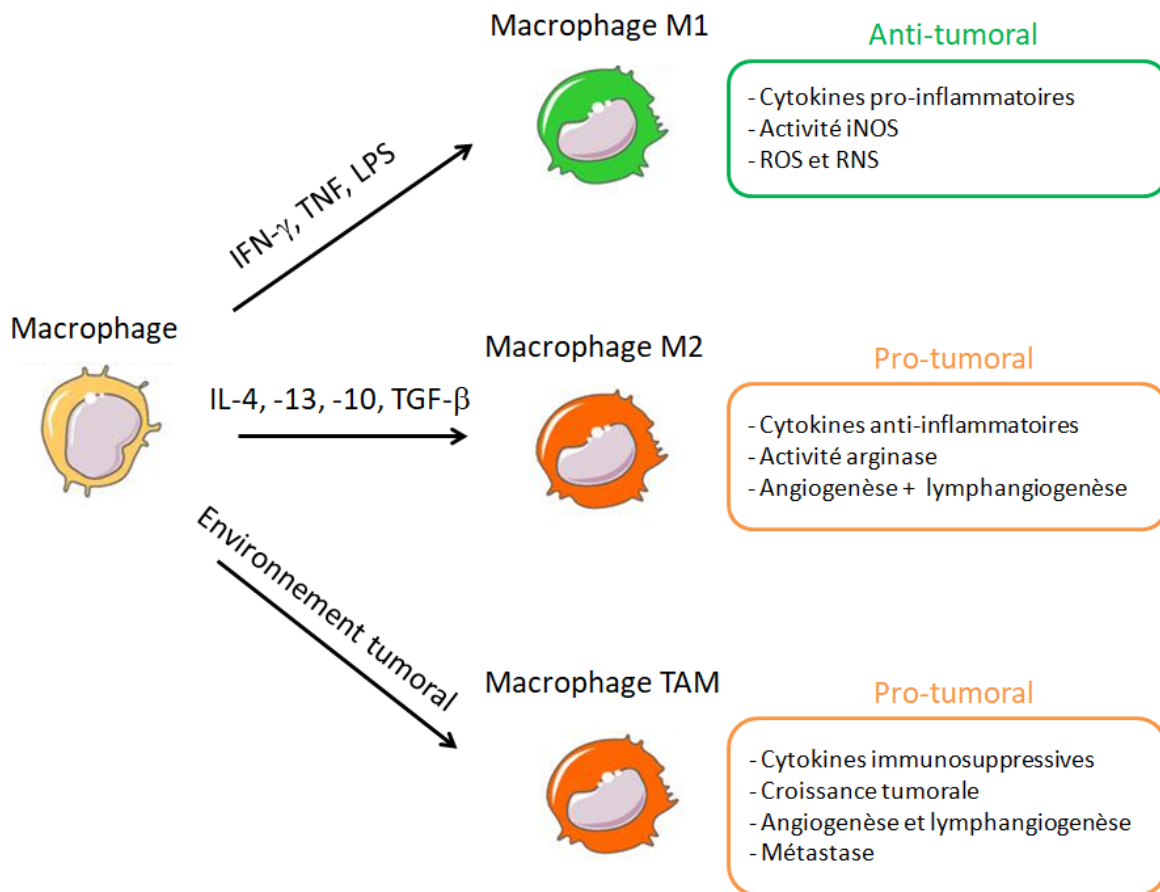
Les macrophages sont polarisés en phénotypes M1 lorsqu'ils sont en présence d'IFN- $\gamma$ , de TNF ou de LPS. Une fois induits en M1, ces macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23. Les M1 sont caractérisés par l'expression élevée de iNOS qui métabolise la L-arginine en L-citrulline et en monoxyde d'azote (Duque

et al., 2014; Rath et al., 2014). Les macrophages M1 produisent des RONS qui permettent de tuer les agents pathogènes et les cellules tumorales (Lamagna et al., 2006). De par ces propriétés, les M1 sont caractérisés par une activité antitumorale (Quatromoni et al., 2012).

Les macrophages sont polarisés en phénotypes M2 en présence d'IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$ , de glucocorticoïdes et de complexes immunitaires (Ivashkiv, 2013). Les macrophages M2 produisent des IL-10 qui ont des propriétés anti-inflammatoires (Duque et al., 2014; Chéné et al., 2016). Ces cytokines sont impliquées d'une part, dans la suppression de l'expression des CMH-II, inhibant la présentation d'antigènes et d'autre part, dans l'inhibition de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T<sub>H1</sub> et NK. En produisant des IL-10, les M2 diminuent l'activité microbicide (Duque et al., 2014). Les M2 sont également caractérisés par une activité arginase très élevée, métabolisant la L-arginine en urée et en L-ornithine, un précurseur de polyamines et de collagènes. Ceci permet aux M2 de participer à la guérison des blessures (Mosser et al., 2008). De plus, les M2 sécrètent des métalloprotéases, des enzymes capables de digérer la matrice extracellulaire, jouant un rôle dans le remodelage tissulaire (Mosser et al., 2008). Les macrophages M2 favorisent également l'angiogenèse et la lymphangiogenèse via la production de facteurs de croissance tels que les VEGF. À l'inverse des macrophages M1, les macrophages de type M2 présentent une activité pro-tumorale (Murray et al., 2011; Ivashkiv, 2013; Chéné et al., 2016).

En plus des macrophages M1 et M2, des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont retrouvés dans l'environnement tumoral. Ces macrophages sont apparentés au phénotype M2 (Mantovani et al., 2013). Leur présence dans l'environnement tumoral est corrélée à un faible pronostic de survie des patients (Quatromoni et al., 2012). Les macrophages TAM ont la particularité de sécréter des cytokines immunosuppressives dont l'IL-10 et des TGF- $\beta$  qui inhibent l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et des NK. Ils favorisent également la polarisation lymphocytaire en T<sub>H2</sub> et en lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Treg sont impliqués dans l'inhibition de la réponse immunitaire (Owen et al., 2013; Duque et al., 2014). Les macrophages TAM participent à la croissance tumorale par la production de TGF- $\alpha$ , de TGF- $\beta$ 1, de facteurs de croissance épidermique (EGF), de PDGF, de HGF et de facteurs basiques de croissance des fibroblastes (bFGF). Les TAMs sécrètent également des métalloprotéases qui favorisent la propagation tumorale (Miselis et al., 2008; Quatromoni et al., 2012; Mantovani et al., 2013; Duque et al., 2014). De plus, les TAMs soutiennent

l'angiogenèse et la lymphangiogenèse par la production de VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-8, bFGF et par l'expression d'enzymes dont la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Lewis et al., 2006). Finalement, les TAMs jouent un rôle dans la progression métastatique via TNF- $\alpha$  (Quatromoni et al., 2012).



**Figure 12. Polarisation des macrophages.** En fonction de l'environnement en cytokines, les macrophages se répartissent entre deux phénotypes extrêmes lesquels sont : macrophages activés de manière classique "M1" et macrophages activés de manière alternative "M2". Parmi les phénotypes M1 et M2, des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont retrouvés dans l'environnement tumoral et sont souvent apparentés au phénotype M2 (Mantovani et al., 2013).

#### 2.2.4. L'importance des macrophages dans le mésothéliome

Les macrophages ont différents niveaux d'implication tant favorables que défavorables au développement du mésothéliome.

Tout d'abord, ils ont un rôle important dans l'élimination d'une majorité des fibres d'amiantes permettant de limiter l'effet de ces fibres dans la plèvre (Donaldson et al., 2010). Cependant, au sein de cette plèvre, la taille trop élevée de certaines de ces fibres empêche les macrophages de les phagocyter correctement, ce qui va être à l'origine de deux conséquences

importantes. D'une part, les macrophages relarguent les fibres cytotoxiques dans la cavité pleurale, lesquels peuvent interagir à nouveau avec les cellules mésothéliales. D'autre part, en échouant à phagocyter ces fibres, les macrophages libèrent en permanence leur contenu cytotoxique sur les cellules mésothéliales. Ces deux conséquences ont pour effet d'entraîner des stress génotoxiques et cytotoxiques sur les cellules mésothéliales pouvant être à l'origine du cancer (Hamaidia et al., 2016).

Finalement, bien que les macrophages soient capables de produire des substances cytotoxiques pouvant nuire aux cellules de mésothéliome, le phénotype des macrophages retrouvés au sein de l'environnement tumoral présente une activité pro-tumorale associée à un faible pronostic de survie des patients (Miselis et al., 2008; Quatromoni et al., 2012).

### 3. Immunothérapie du mésothéliome

L'immunothérapie est une approche thérapeutique qui consiste à activer ou à améliorer la réponse antitumorale du système immunitaire (Cornelissen et al., 2012).

#### 3.1. Immunothérapie basée sur l'utilisation de cytokines

Parmi, les différentes stratégies immunothérapeutiques, une première consiste à injecter au patient de l'IL-2 (Adesleukin) à forte dose (Grégoire, 2010). L'IL-2 est un facteur de croissance produit par les LT CD4<sup>+</sup> qui permet l'activation, la prolifération, la survie et la fonction effectrice des LT anti-tumoraux (Grégoire, 2010; Wayteck et al., 2014). L'IL-2 a montré une aptitude à limiter la prolifération des cellules de mésothéliome (Grégoire, 2010). De plus, des essais cliniques, basés sur l'injection d'IL-2 de manière intrapleurale, intraveineuse et sous-cutanée, ont montré une médiane de survie allant de 8 à 13.6 mois (Grégoire, 2010).

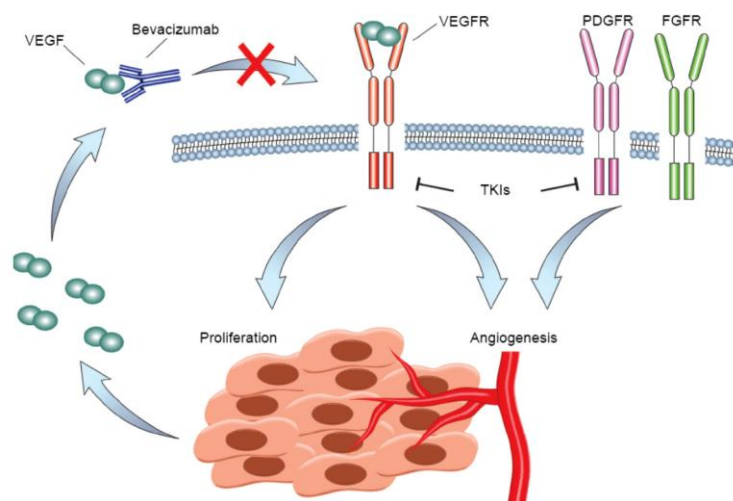
Les IFNs ont également montré un potentiel dans le traitement du mésothéliome (Wong et al., 2014). Ces IFNs ont un rôle dans l'activation du système immunitaire. Des essais cliniques, consistant à injecter des IFNs, ont été menés et ont présenté une médiane de survie de 29,2 mois (Grégoire, 2010).



### 3.2. Immunothérapie basée sur l'utilisation d'anticorps

Une autre approche consiste à utiliser des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes tels que la mésothéline, une glycoprotéine de surface exprimée par les cellules de mésothéliome. Une thérapie basée sur l'utilisation d'immunotoxine SS1P a donné des résultats très prometteurs. Le SS1P est un anticorps anti-mésothéline fusionné à une exotoxine A de *Pseudomonas*. En se liant à la mésothéline, l'immunotoxine internalisée inhibe la synthèse des protéines et induit la mort cellulaire. Une étude menée sur 34 patients, dont 21 souffrant du mésothéliome, a permis de stabiliser la tumeur chez 19 patients (Grégoire, 2010; Wong et al., 2014; Hassan et al., 2016).

Il est également possible d'utiliser des anticorps dirigés contre les facteurs de croissance ou leur récepteur agoniste, bloquant dès lors la prolifération des cellules de mésothéliome. Parmi ces anticorps, il existe le cetuximab qui bloque les récepteurs EGF et le bevacizumab qui bloque les VEGF (**Figure 13**). Un essai clinique en phase 3 réalisé sur 448 patients a montré que l'addition du bevacizumab au traitement chimiothérapeutique à base de pemetrexed et de cisplatine permettait d'augmenter le taux moyen de survie à 18,8 mois (Zalcman et al., 2016; Bonelli et al., 2017).



**Figure 13. Immunothérapie basée sur l'utilisation du bevacizumab, un anticorps monoclonal bloquant les VEGF.** Lorsque le bevacizumab interagit avec les VEGFs, ces derniers ne peuvent plus se lier avec leur récepteur présent à la surface des cellules de mésothéliome. Cette stratégie thérapeutique permet d'empêcher la prolifération et l'angiogenèse du mésothéliome (Levin et al., 2017).

De plus, une autre stratégie consiste à bloquer les récepteurs cellulaires qui jouent un rôle dans la suppression de la réponse immunitaire, tels que les *cytotoxic T lymphocyte associated protein 4* (CTLA-4) et *programmed cell death-1* (PD-1) (Remon et al., 2015). L'engagement du CTLA-4, un récepteur principalement exprimé par les Treg, diminue l'activation des cellules T (Hamaidia et al., 2016; Bonelli et al., 2017). L'engagement du PD-1,

principalement exprimé par les lymphocytes T et B effecteurs maintient les cellules dendritiques (DC) à un stade immature et induit la mort des cellules effectrices. L'utilisation d'anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD-1 permet par conséquent de bloquer ces réponses immunosuppressives (Hamaidia et al., 2016; Bonelli et al., 2017).

### 3.3. Inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs des facteurs de croissance épithéliaux

Parallèlement aux anticorps, il existe également des inhibiteurs pharmacologiques des activités tyrosines kinases induites sur les récepteurs de facteurs de croissance épithéliale tels que l'ergotinib, le getinib, l'afatinib et le lapatinib. En se liant au site de liaison de l'ATP, le lapatinib bloque la phosphorylation des récepteurs EGF et par conséquent leur activation. Cette interaction empêche la transduction des signaux des voies Ras/Raf MAPK et PI3K/Akt amenant à une augmentation de l'apoptose et à une diminution de la prolifération cellulaire (Geyer et al., 2006; Lorusso et al., 2012; Nelson et al., 2013; Bonelli et al., 2017).

### 3.4. Immunothérapie cellulaire

Une autre approche consiste à incuber en ex-vivo des cellules dendritiques dérivées de monocytes de patients atteints de MPM, avec des antigènes associés aux MPM et/ou un lysat de tumeur. Ces cellules dendritiques chargées en antigènes sont ensuite injectées au patient pour développer une réponse lymphocytaire spécifique du MPM. La capture antigénique par la DC peut aussi s'effectuer au moyen de vecteurs viraux, tels les lentivirus et adénovirus qui codent pour l'antigène (Wayteck et al., 2014).

### 3.5. Immunothérapie basée sur la régulation épigénétique

Une autre approche consiste à moduler l'expression de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et la tolérance immune au moyen de régulations épigénétiques (Hamaidia et al., 2016). L'épigénétique est basée sur des modifications post-traductionnelles (la méthylation de l'ADN ainsi que la méthylation et l'acétylation des histones) qui vont moduler l'accessibilité des gènes au cours de leur transcription permettant ainsi de contrôler l'expression de gènes (Ivashkiv, 2013; Vandermeers et al., 2013). Ces modifications sont réalisées par le biais d'enzymes qui vont réagir d'une part avec l'ADN et d'autre part avec les lysines ou les arginines présentes sur les queues amino-terminales des histones. En fonction du type de

modifications, ces enzymes sont nommées DNA méthyltransférases, histone acétyltransférases / déacétylases, / méthyltransférases / déméthylases (Hamaidia et al., 2016).

De cette manière, un nouveau moyen de traitement consiste à combiner un inhibiteur de DNA méthyltransférase, appelé 5-aza-2'-deoxycytidine et un inhibiteur d'histones déacétylases, appelé valproate. Par sa fonction d'inhibition de la méthylation de l'ADN, le 5-aza-2'-deoxycytidine induit l'expression de gènes silencieux dont l'expression d'antigènes tumoraux des cellules de mésothéliome. Le valproate, quant à lui, inhibe la déacétylation des histones, à l'origine de la compaction de l'ADN, induisant ainsi l'expression des gènes réprimés. Le valproate a la capacité de diminuer la progression tumorale en induisant l'arrêt des cycles cellulaires, la différenciation et l'apoptose (Vandermeers et al., 2009; Leclercq et al., 2011). Des études ont montré que le 5-aza-2'-deoxycytidine combiné avec le valproate permet d'induire la réponse des LT CD8<sup>+</sup> contre le mésothéliome (Hamaidia et al., 2016).

Parallèlement à ces recherches, d'autres études ont démontré que les macrophages M2, présentant un phénotype proche des TAMs, étaient caractérisés par des gènes pro-inflammatoires réprimés en raison de la triméthylation des H3K27 qui compacte l'ADN. Cette triméthylation est réalisée par une enzyme, l'histone méthyltransférase, appelée la EZH2 (Ivashkiv, 2013; Vandermeers et al., 2013). L'EZH2 est une sous-unité catalytique d'un complexe protéique appelé polycomb repressive complexe 2. Cette enzyme semble impliquée dans plusieurs cancers par sa capacité à être à l'origine de mutations, d'amplifications et/ou de surexpressions des gènes (Knutson et al., 2014).

Basée sur ces études, une autre stratégie consisterait donc à induire l'expression de ces gènes pro-inflammatoires au moyen de régulations épigénétiques dans le but d'améliorer l'immunité antitumorale. Pour ce faire, une approche consisterait à réduire la triméthylation de ces histones à partir d'inhibiteur d'histones méthyltransférases permettant ainsi l'expression de ces gènes. Une telle action peut se faire par l'inhibiteur d'histone méthyltransférase, l'EPZ005687 (EPZ) (Knutson et al., 2014).

# Matériel et méthodes

## 1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire RAW 264.7 est une lignée de macrophages d'origine murine (ATCC® TIB-71™). Les cellules RAW 264.7 sont cultivées dans un milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, BioWhittaker) supplémenté avec 10% de *Fetal Bovine Serum* (FBS, Gibco) et 1% de milieu complet de pénicilline (10 000 U/mL) et de streptomycine (10 000 U/mL) (BioWhittaker).

La lignée cellulaire AB-1 est une lignée de mésothéliome pleural malin d'origine murine (AB-1, ECACC, 10092305). Les cellules AB-1 ont été cultivées dans un milieu complet *Roswell Park Memorial Institute 1640 medium* (RPMI 1640, BioWhittaker) contenant 10% de FBS (Gibco) et 1% de milieu complet de pénicilline (10 000 U/mL) et de streptomycine (10 000 U/mL).

Les lignées cellulaires ont été maintenues en culture dans un incubateur thermostaté à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2. Traitements des cellules

Les cellules ont été traitées avec du L-N<sup>G</sup>-monométhyl arginine citrate (L-NMMA), du lipopolysaccharide (LPS), du paracétamol et du lapatinib.

Le L-NMMA (Sigma-Aldrich) est un inhibiteur de monoxyde d'azote qui a été utilisé pour réduire la production de substances réactives azotées. Il se présente sous forme de poudre. Des aliquots de 1 M ont été préparés dans de l'eau stérile et ont été conservés à -20°C. Lors du traitement, les macrophages RAW 264.7 ont été cultivés en présence de 1mM de L-NMMA pendant 48 heures.

Le LPS (*E.coli* ; O55 : B5, Sigma Aldrich) est un composant de la paroi des bactéries GRAM<sup>-</sup> qui est capable d'activer les macrophages à travers le récepteur TLR-4. Il se présente sous forme de poudre. Des aliquots de 1mg/mL ont été préparés dans de l'eau stérile et ont été

conservés à -20°C. Lors du traitement, les macrophages RAW 264.7 ont été cultivés en présence de 1µg/mL de LPS pendant 24 heures.

Le paracétamol (Teva Pharma Belgium) est un composé chimique présentant des propriétés anti-inflammatoires qui a été utilisé comme contrôle positif lors du dosage des nitrites. Il se présente sous forme de comprimé de 1g. Des aliquots de 20 mM ont été préparés dans de l'eau stérile et conservés à -20°C. Lors du traitement, les macrophages RAW 264.7 ont été cultivés en présence de 5mM de paracétamol pendant 48 heures.

Le lapatinib (Sigma-Aldrich) est un inhibiteur de tyrosine kinase qui a été utilisé comme contrôle positif lors des tests de cytotoxicité. Il se présente sous forme de poudre. Des aliquots de 100 mM ont été préparés dans de l'eau stérile et ont été conservés à -20°C. Lors du traitement, les cellules de mésothéliome AB-1 ont été cultivées en présence de 25 µM de lapatinib pendant 24 heures.

### 3. Quantification de la viabilité cellulaire des RAW 264.7 en présence de L-NMMA

La viabilité des macrophages RAW 264.7 en présence de L-NMMA a été déterminée en suivant les recommandations du kit *Celltiter 96 Aqueous One solution Cell proliferation assay Kit* (Promega). Ce kit est un test colorimétrique qui mesure l'activité enzymatique des déshydrogénases exprimées par les cellules vivantes, en quantifiant la NADPH produite par ces enzymes. Le principe consiste à ajouter 20 µL d'une solution de sel de tétrazolium au 100µL de culture de macrophages cultivés en présence de concentrations croissantes de L-NMMA. Grâce à l'activité enzymatique, le sel de tétrazolium est réduit en un colorant formazan hydrosoluble. L'intensité du colorant formazan est proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives. Chaque condition a été analysée en triplicat. La densité optique a été mesurée au moyen du spectrophotomètre *1420s Victor V Multilabel Counter* (Perkin Elmer) à 450 nm.

## 4. Dosage des nitrites

Des macrophages RAW 264.7 (20 000 cellules/puits) ont été cultivés dans une plaque de 96 puits à fond plat en présence de L-NMMA, de paracétamol et de LPS. Le dosage des nitrites a été réalisé dans 50µL de surnageant de macrophages RAW264.7 en utilisant le kit *Griess Reagent system* (Promega). Ce kit est un test colorimétrique qui dose les nitrites grâce à une réaction de diazotation qui se produit entre les nitrites, la sulfanilamide et le N-1-naphthylethylenediamine dihydrochlorure en condition acide. Chaque condition a été analysée en triplicat. Une droite d'étalonnage a été réalisée à partir de la solution de référence de nitrites (0,1M). La densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 532 nm au moyen du spectrophotomètre Multiskan™ GO Microplate (ThermoFisher Scientific). Le dosage des substances réactives azotées a pu être déterminé à partir de la densité optique des échantillons et de la droite d'étalonnage.

## 5. Test de cytotoxicité

### 5.1. Culture d'AB-1 en présence de surnageant de RAW 264.7

Des macrophages RAW 264.7 (50 000 cellules/puits) ont été cultivés dans une plaque de 24 puits à fond plat en présence de L-NMMA et de LPS. Les surnageants cellulaires ont été collectés puis centrifugés 5 min à 200 rpm. Finalement, les surnageants des macrophages RAW 264.7 ont été conservés à -20°C.

Des cellules de mésothéliome AB-1 (50 000 cellules /puits) ont été cultivées dans une plaque de 24 puits en milieu RPMI complet conditionné avec 25% de surnageant de macrophages RAW 264.7 pendant 48h.

### 5.2. Co-culture d'AB-1 et de RAW 264.7

Des macrophages RAW 264.7 (50 000 cellules/puits) ont été cultivés dans une plaque de 24 puits en présence de L-NMMA et de LPS. Les macrophages ont été co-cultivés avec des AB-1 (5000 cellules/puits) pendant 48h.

### 5.3. Quantification de l'apoptose et de la nécrose.

Les cellules (adhérentes et non adhérentes) ont été suspendues dans du tampon annexine V (Invitrogen), incubées avec de l'annexine V (BD Biosciences) et avec de l'iodure de propidium (PI) (5 µg/mL, Sigma Aldrich) puis incubées 15 min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'annexine V interagit avec les phosphatidylsérines qui sont externalisées lors de l'apoptose. L'iodure de propidium est un intercalant d'ADN qui est utilisé comme marqueur de nécrose. Des cellules AB-1 traitées avec du lapatinib ont servi de contrôle positif et les cellules AB-1 non traitées ont servi de contrôle négatif de l'expérience. Les cellules ont été analysées au cytomètre en flux BD FACSAria™ Cell Sorter (BD Biosciences) et au moyen du logiciel BD FACSDiva Software (BD Biosciences). Les résultats ont été analysés en pourcentage d'apoptose totale.

## 6. Microscopie confocale

### 6.1. Culture des cellules

Des macrophages RAW 264.7 (30 000 cellules/puits) ont été cultivés dans une plaque de 24 puits contenant des couvre-objets. Les macrophages RAW 264.7 ont été co-cultivés avec des cellules de mésothéliome AB-1 (30 000 cellules/puits), pendant 48 heures à 37°C en présence de LPS.

### 6.2. Marquage des cellules

Les cellules de mésothéliome AB-1 ont été marquées au PKH26, un marqueur fluorescent des lipides membranaires, selon le protocole *Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling* (Sigma Aldrich). De plus, les cellules (RAW 264.7 et AB-1) ont été marquées au DRAQ5, un intercalant d'ADN (1/1000).

### 6.3. Fixation et analyse au microscope confocal

Les cellules ont été lavées au PBS et fixées avec du paraformaldéhyde (4%) pendant 20 min à température ambiante en absence de lumière avant d'être à nouveau lavées au PBS. Les couvre-objets ont, ensuite, été montés sur lame en présence de Fluoroshield (Sigma Aldrich). Les lames ont été analysées grâce au microscope confocal Zeiss LSM 510 équipé d'un objectif 40X à immersion et au logiciel LSM Image Browser.

## 7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel Minitab<sup>®</sup> 17. Toutes les expériences ont été répétées indépendamment au minimum 5 fois et les moyennes ont été exprimées sous forme de moyenne + erreur standard de la moyenne. La normalité des distributions a été déterminée par un test de Kolmogorov-Smirnov. Des tests de Student appariés ont été utilisés afin de déterminer les différences statistiques entre deux échantillons appariés. Les différences statistiques ont été considérées comme non significatives (p-value > 0,05), significatives (\*) (p-value ≤ 0,05), hautement significatives (\*\*) (p-value ≤ 0,01) ou très hautement significatives (\*\*\*) (p-value ≤ 0,001).



# Résultats

## 1. Activité cytotoxique des macrophages

### 1.1. Cytotoxicité indirecte

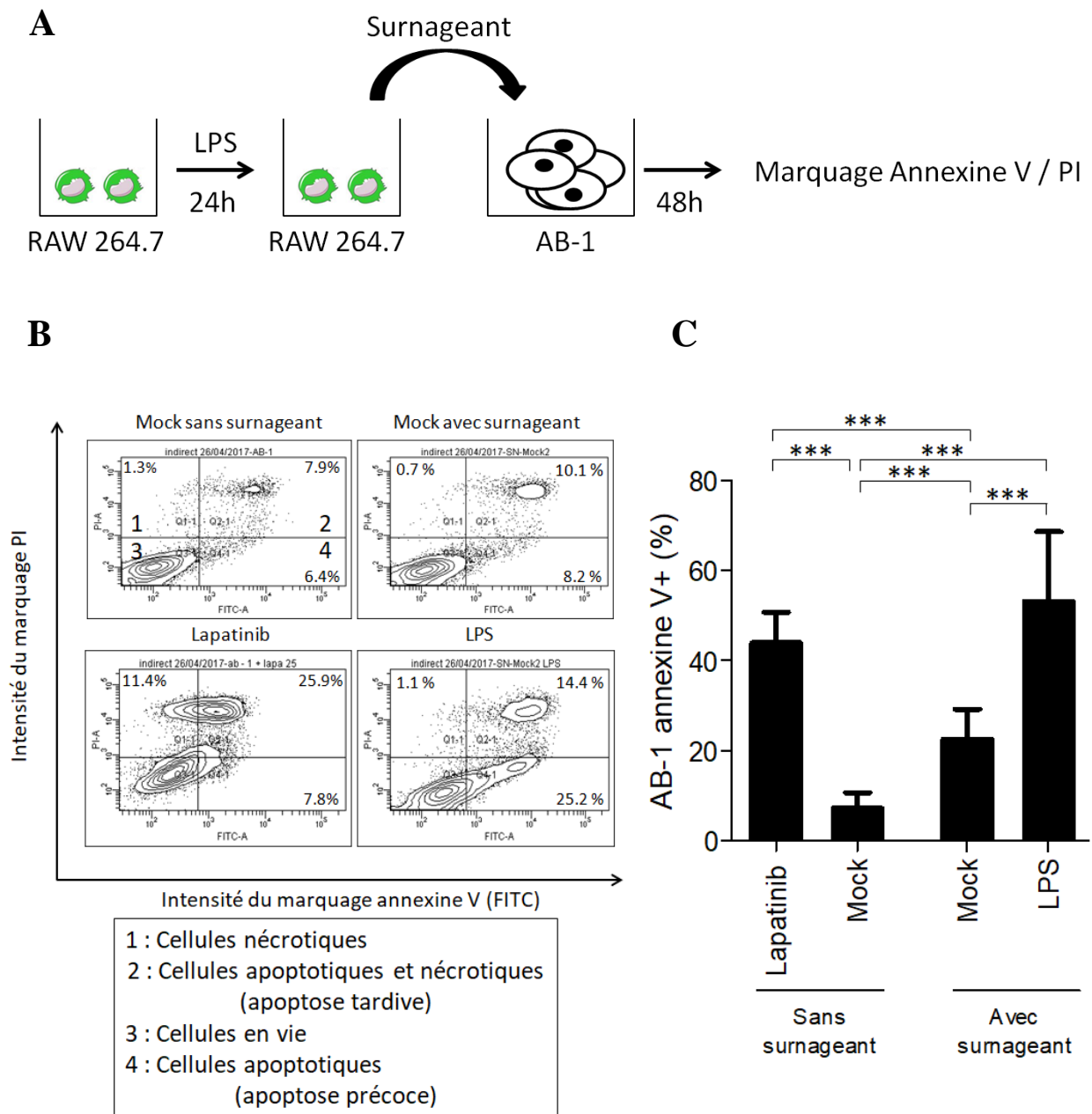
Afin d'étudier l'activité cytotoxique indirecte des macrophages contre les cellules de mésothéliome, les cellules AB-1 ont été cultivées en milieu conditionné contenant 25% de surnageant de macrophages RAW 264.7 stimulés ou non avec du LPS. Après 48 heures, le pourcentage d'apoptose des AB-1 a été évalué au cytomètre en flux (**Figure 14 panneau A**).

En tant que contrôle positif, l'inhibiteur de tyrosine kinase (lapatinib) induit une augmentation significative du pourcentage d'apoptose (44%) des cellules AB-1 par rapport au pourcentage d'apoptose des cellules AB-1 seules (Mock sans surnageant) (7,3%) (p-value = 0,001) (**Figure 14, panneaux B et C**).

Les cellules de mésothéliome AB-1 mises en présence de surnageant de macrophages RAW 264.7 non traités (Mock avec surnageant) présentent un pourcentage d'apoptose (22,5%) significativement plus élevé en comparaison aux cellules AB-1 seules (Mock sans surnageant) (7,3%) (p-value = 0,001) (**Figure 14, panneaux B et C**).

Lorsque les cellules de mésothéliome AB-1 sont mises en présence de surnageant de macrophages RAW 264.7 traités avec du LPS, le pourcentage d'apoptose (53,1%) est significativement plus élevé que lorsqu'elles sont mises en présence de surnageant de macrophages non traités au LPS (22,5%) (p-value = 0,001) (**Figure 14, panneaux B et C**).

Enfin, lorsque les cellules de mésothéliome AB-1 sont traitées avec du lapatinib, le pourcentage d'apoptose de 44% ne présente pas de différence significative par rapport au pourcentage d'apoptose des cellules AB-1 mises en présence de surnageant de macrophages traités avec du LPS (53,1%) (p-value = 0,266) (**Figure 14, panneaux B et C**).



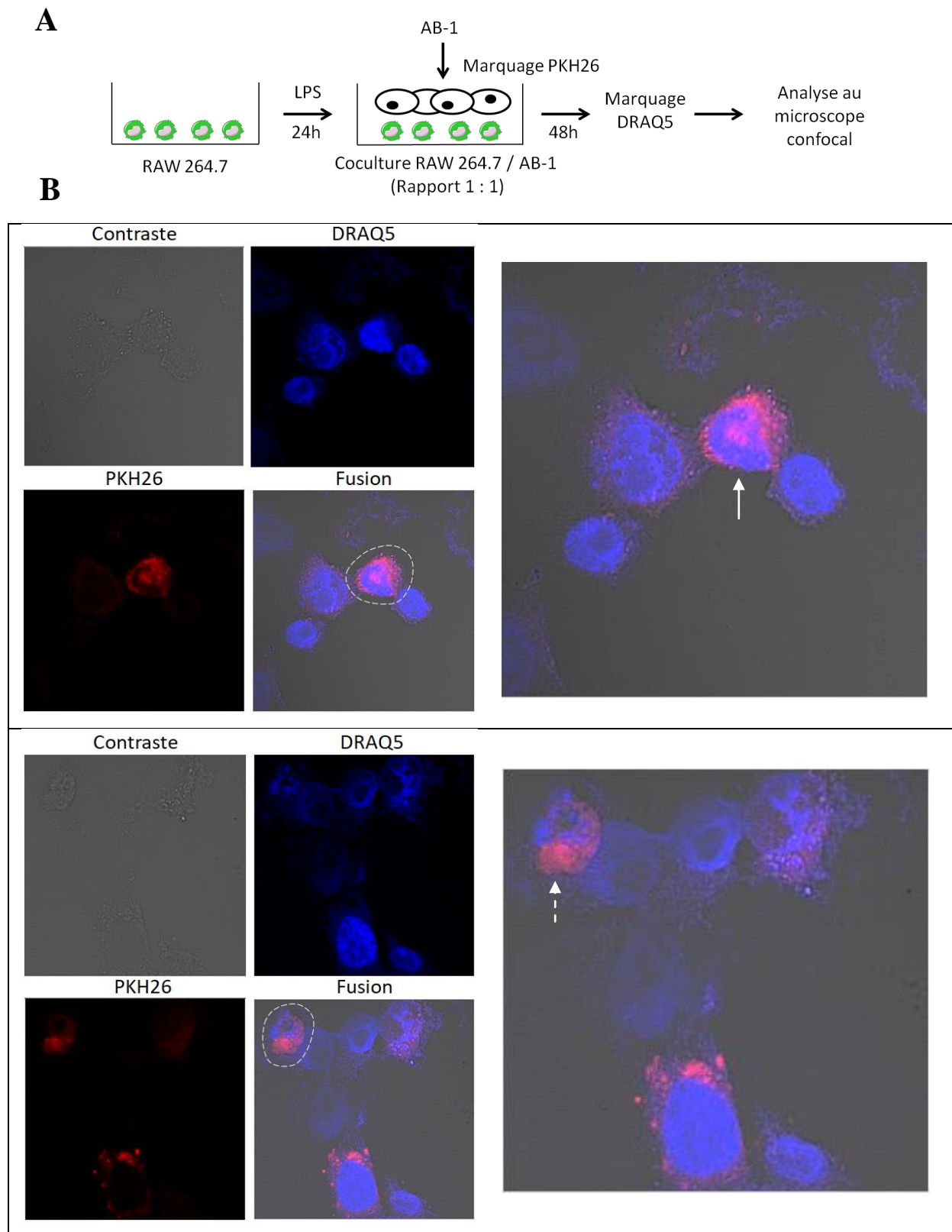
**Figure 14. Activité cytotoxique indirecte des macrophages RAW 264.7 envers les cellules de mésothéliome AB-1. A. Plan expérimental.** Les macrophages ont été incubés 24 heures en présence de LPS. Les surnageants des macrophages ont été récoltés. Les cellules de mésothéliome AB-1 ont été cultivées en présence de 25% de surnageant de macrophages RAW 264.7. Les cellules ont été marquées à l'annexine V (FITC) / PI et analysées au cytomètre en flux. **B. Graphiques représentant la population d'AB-1 apoptotique et nécrotique.** Le graphique représente le nombre d'évènements en fonction de l'intensité du marquage Annexine V (apoptose) et de l'intensité du marquage PI (nécrose). Les graphiques ont été obtenus pour les conditions mock sans surnageant (contrôle négatif), lapatinib (contrôle positif), mock avec surnageant et LPS. **C. Pourcentage d'AB-1 apoptotiques lorsqu'ils sont mis en contact avec le surnageant de macrophages RAW 264.7.** Moyennes et écarts-types de cellules AB-1 apoptotiques lorsqu'elles ont été incubées en présence de surnageant de macrophages traités ou non avec du LPS. Les résultats ont été analysés en pourcentage d'apoptose totale. L'expérience a été réalisée en huit répétitions indépendantes. Les statistiques ont été analysées par un test de Student apparié. Les \*\*\* signifient que les distributions présentent des différences très hautement significatives (p-value  $\leq 0,001$ ).

## 1.2. Cytotoxicité directe

### 1.2.1. Analyse morphologique

L'activité cytotoxique directe des macrophages a également été étudiée. Afin de mettre en évidence cette activité cytotoxique, une analyse morphologique de l'interaction entre les RAW 264.7 et les AB-1 a tout d'abord été réalisée au microscope confocal. Les macrophages RAW 264.7 ont été cultivés sur des couvre-objets en présence de LPS pendant 24 heures. Les macrophages ont ensuite été co-cultivés pendant 48 heures avec des cellules AB-1, marquées au PKH26, un marqueur fluorescent des lipides membranaires. Les cellules ont été lavées et fixées au paraformaldéhyde 4%, puis marquées au DRAQ 5, un intercalant d'ADN avant d'être analysées au microscope confocal (**Figure 15, panneau A**).

L'expérience a pu illustrer les interactions qui se produisent entre des macrophages et des cellules de mésothéliome. Sur la **figure 15, panneau B (haut)** la cellule tumorale entourée interagissant avec des macrophages présente un noyau non fragmenté. Sur la **figure 15, panneau B (bas)**, la cellule tumorale entourée interagissant avec un macrophage présente un noyau fragmenté, caractéristique d'une mort par apoptose.



**Figure 15. Activité cytotoxique directe des macrophages RAW 264.7 en contact avec les cellules de mésothéliome AB-1. A. Plan expérimental.** Les macrophages RAW 264.7 ont été cultivés sur des couvre-objets pendant 48 heures et traités avec du LPS pendant les dernières 24 heures. Les macrophages ont ensuite été co-cultivés pendant 48 heures en présence de cellules de mésothéliome AB-1, préalablement marquées au PKH26. Les cellules (RAW 264.7 et AB-1) ont été lavées et fixées avec du paraformaldéhyde 4 % et marquées au DRAQ5. Les couvre-objets ont ensuite été montés sur lame et analysés au microscope confocal. Le PKH26 est un marqueur fluorescent des lipides membranaires (en rouge). Le DRAQ5 est un intercalant d'ADN qui permet de marquer le noyau des cellules (en bleu). **B. Interaction entre des macrophages et des cellules de mésothéliome AB-1.** Certaines cellules tumorales présentent un noyau fragmenté (ex : flèche en pointillés) caractéristique de l'apoptose.

### 1.2.2. Quantification

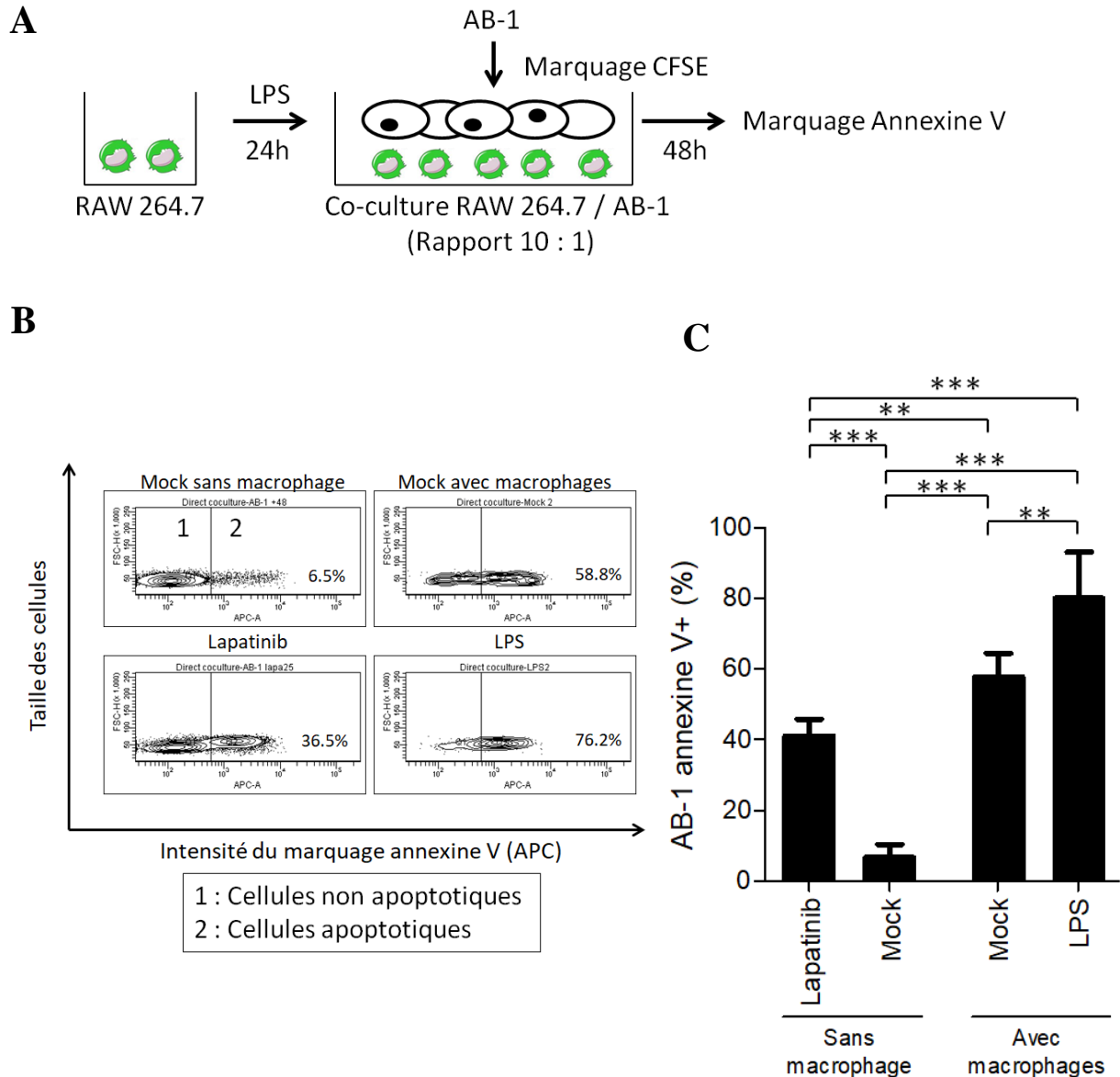
Une analyse quantitative de l'activité cytotoxique directe des macrophages a ensuite été réalisée. Afin d'étudier cette activité cytotoxique, les macrophages RAW 264.7 ont été stimulés avec du LPS pendant 24 heures avant d'être co-cultivés avec des AB-1, préalablement marqués au CFSE, un marqueur de protéines membranaires, pendant 48 heures. Les cellules (AB-1 et RAW 264.7) ont ensuite été marquées à l'annexine V (APC) et analysées au cytomètre en flux (**Figure 16, panneau A**).

Les cellules de mésothéliome AB-1 traitées avec du lapatinib présentent un pourcentage d'apoptose (41,1%) significativement plus élevé que celui des cellules AB-1 non traitées (Mock sans macrophage) (6,6%) (p-value = 0,001) (**Figure 16, panneaux B et C**).

Les cellules de mésothéliome AB-1 mises en présence de macrophages RAW 264.7 non traités (Mock avec macrophages) présentent un pourcentage d'apoptose (57,8%) significativement plus élevé que celui des cellules AB-1 seules (Mock sans macrophages) (6,6%) (p-value = 0,001) (**Figure 16, panneaux B et C**).

Lorsque les cellules de mésothéliome AB-1 sont cultivées en présence de macrophages RAW 264.7 stimulés préalablement avec du LPS, le pourcentage d'apoptose de 80,2% est significativement plus élevé que lorsqu'elles sont cultivées en présence de macrophages non stimulés (Mock avec macrophage) (57,8%) (p-value = 0,004) (**Figure 16, panneaux B et C**).

Enfin, les cellules de mésothéliome AB-1 mises en présence de macrophages, préalablement traités avec du LPS (80,2%), présentent un pourcentage d'apoptose significativement plus élevé que lorsqu'elles sont traitées avec du lapatinib (41,1%) (p-value = 0,001) (**Figure 16, panneaux B et C**).



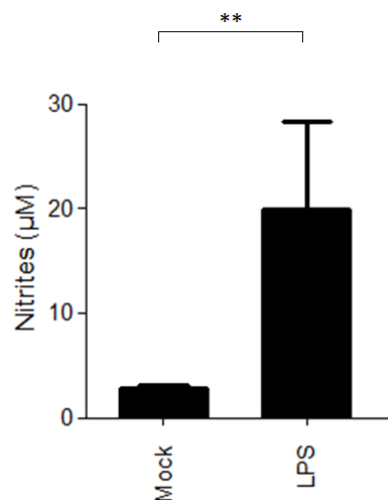
**Figure 16. Activité cytotoxique directe des macrophages RAW 264.7 envers les cellules de mésothéliome AB-1.** **A. Plan expérimental.** Les macrophages RAW 264.7 ont été incubés 24 heures en présence de LPS puis ont été co-cultivés avec des cellules de mésothéliome AB-1, préalablement marquées au CFSE selon le rapport (10 :1) pendant 48 heures. Les cellules ont été marquées à l'annexine V (APC) et analysées au cytomètre en flux. **B. Graphiques représentatifs de la population d'AB-1 apoptotiques.** Les graphiques représentent le nombre d'événements en fonction de l'intensité du marquage annexine V et de la taille des cellules. Les graphiques ont été obtenus pour les conditions mock sans macrophage (contrôle négatif), lapatinib (contrôle positif), mock avec macrophages et LPS. **C. Pourcentage d'AB-1 apoptotiques lorsqu'ils sont en contact direct avec RAW 264.7.** Moyennes et écarts types de cellules AB-1 apoptotiques lorsqu'elles ont été incubées en présence de surnageant de macrophages traités ou non avec du LPS. L'expérience a été réalisée en 6 répétitions indépendantes. Les statistiques ont été analysées par un test de Student apparié. Les \*\* et \*\*\* signifient que les distributions présentent respectivement des différences hautement significatives (p-value ≤ 0,01) et très hautement significatives (p-value ≤ 0,001).

## 2. Implication du NO dans l'activité cytotoxique indirecte et directe

### 2.1. Dosage des nitrites produits par les macrophages RAW 264.7

L'expérience suivante consiste à doser la production de monoxyde d'azote par les macrophages stimulés ou non avec du LPS via la production de nitrites, un composé dérivé du NO. Pour ce faire, des RAW 264.7 ont été stimulés avec du LPS pendant 24 heures. Le dosage des nitrites a été réalisé dans 50  $\mu$ L de surnageant de macrophages en utilisant le réactif de Griess.

La production de nitrites (19,9 $\mu$ M) augmente significativement lorsque les macrophages sont stimulés par du LPS par rapport aux macrophages non stimulés (2,7 $\mu$ M) (p-value = 0,009) (**Figure 17**).



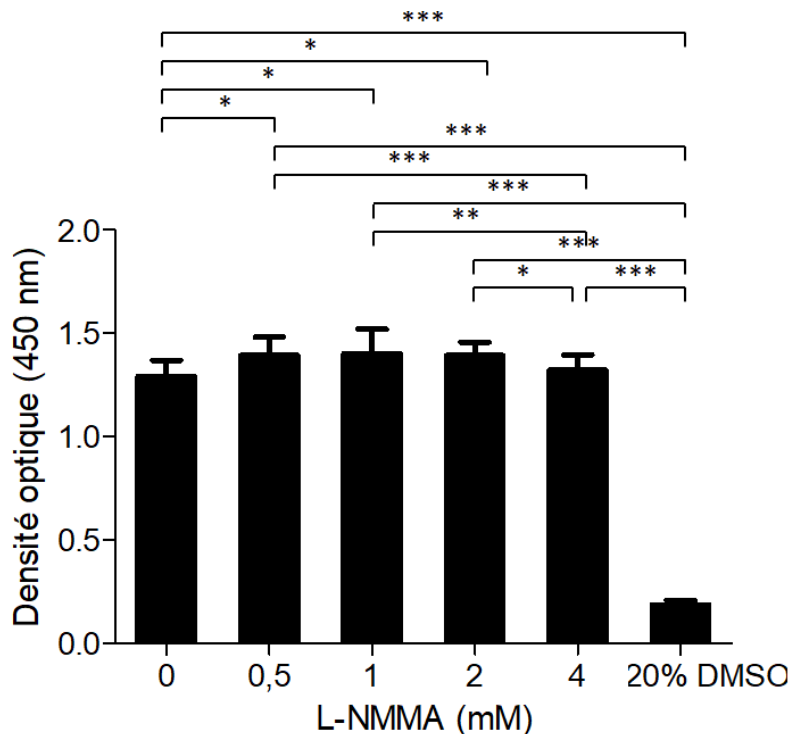
**Figure 17. Quantification des nitrites produits par les macrophages RAW 264.7 stimulés ou non avec du LPS.** Les macrophages RAW 264.7 ont été stimulés ou non par du LPS pendant 24 heures. Le dosage des nitrites a été réalisé dans 50  $\mu$ L de surnageant de macrophages RAW 264.7 en utilisant le réactif de Griess. La densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 532 nm au moyen d'un spectrophotomètre. L'expérience a été réalisée en 5 répétitions indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test de Student apparié. Les \*\* signifient que les distributions présentent des différences hautement significatives (p-value  $\leq$  0,01).

## 2.2. Effet du L-NMMA sur l'activité métabolique des macrophages RAW 264.7

Le L-NMMA est un inhibiteur compétitif non sélectif de monoxyde d'azote qui a été utilisé pour diminuer la synthèse des substances réactives azotées.

Dans un premier temps, un test MTS a été réalisé afin d'évaluer la cytotoxicité de l'inhibiteur L-NMMA sur les macrophages RAW 264.7. Ce test consiste à analyser l'activité métabolique de macrophages RAW 264.7, incubés en présence de concentrations croissantes de l'inhibiteur (0 - 0.5 - 1 - 2 - 4  $\mu$ M) pendant 48 heures.

La **figure 18** montre que la viabilité des macrophages RAW 264.7 traités avec du L-NMMA aux concentrations 0.5 - 1 - 2 - 4 mM n'est pas affectée. Par contre, la viabilité des macrophages RAW 264.7 diminue de 85,3% ( $100 - \frac{(0,19 \times 100)}{1,29}$ ) en présence de 20% de DMSO (0,19) par rapport aux cellules non traitées (1,29) (p-value = 0,001).



**Figure 18. Activité métabolique des RAW 264.7 en fonction de la concentration de L-NMMA.** Des macrophages RAW 264.7 ont été incubés avec des concentrations croissantes de L-NMMA (0 - 4 mM) pendant 48 heures. Des RAW 264.7 traités avec 20  $\mu$ L de diméthyl sulfoxyde ont été utilisés comme contrôle négatif. L'activité métabolique des RAW 264.7 a été mesurée au moyen du kit Celltiter 96 Aqueous One solution Cell proliferation assay Kit (Promega) et l'absorbance évaluée à 490 nm au moyen d'un spectrophotomètre. L'expérience a été réalisée en six répétitions indépendantes. Les analyses statistiques ont été évaluées par un test de Student apparié. Les \*, \*\*, \*\*\* signifient que les distributions présentent respectivement des différences significatives (p-value  $\leq$  0,05), hautement significatives (p-value  $\leq$  0,01) et très hautement significatives (p-value  $\leq$  0,001).



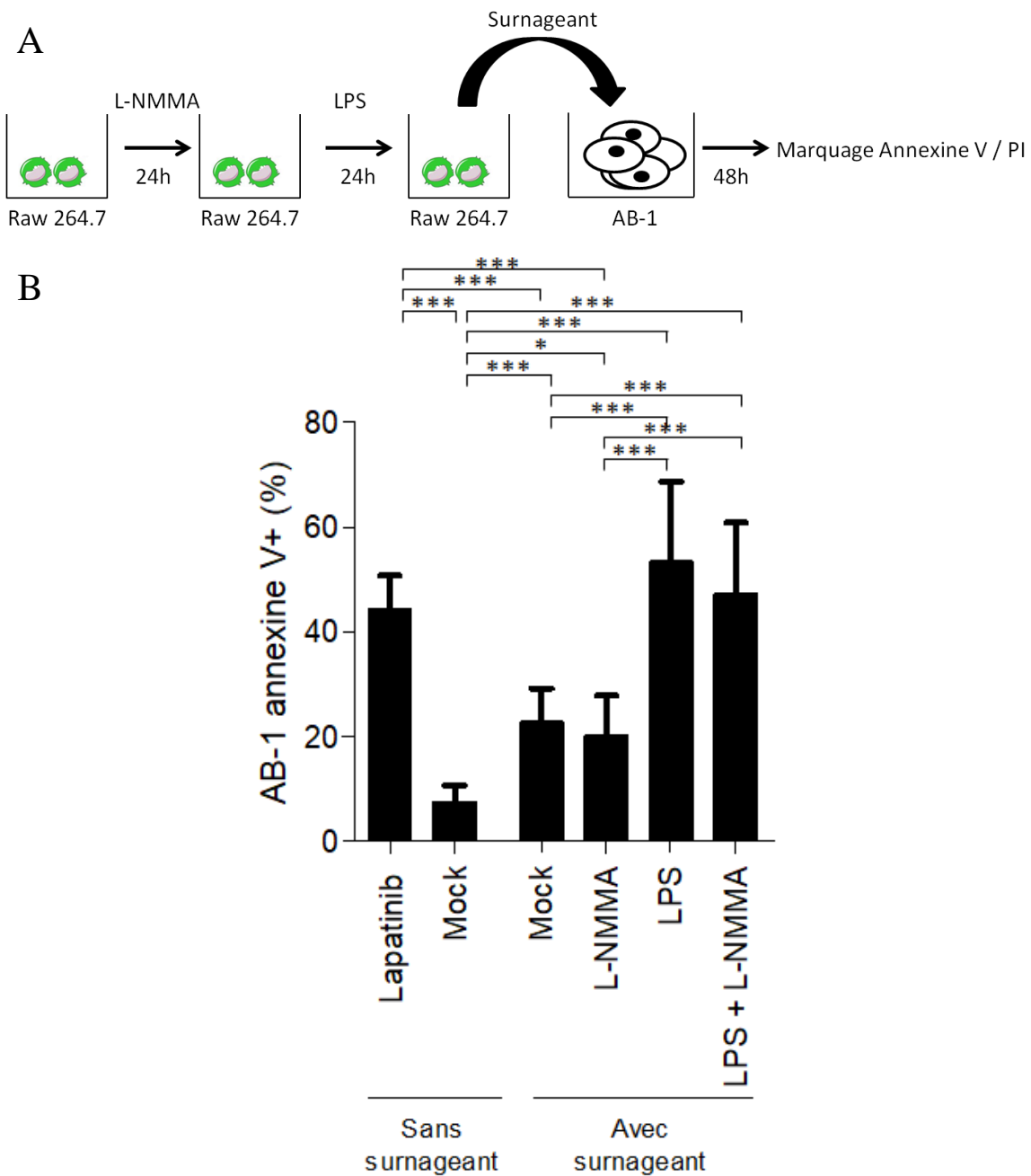
### 2.3. Implication du NO dans la cytotoxicité indirecte

L'effet du surnageant de macrophages, préalablement traités au L-NMMA, sur le pourcentage d'apoptose des cellules de mésothéliome, AB-1 a été évalué. Pour ce faire, les macrophages RAW 264.7 ont été mis en présence de l'inhibiteur L-NMMA pendant 48 heures et de LPS pendant 24 heures (**Figure 19, panneau A**). Des cellules de mésothéliome, AB-1, ont été co-cultivées en présence de 25% de surnageant de macrophages. Après 48 heures, les cellules ont été marquées à l'annexine V / PI, puis analysées au cytomètre en flux.

Lorsque les cellules de mésothéliome AB-1 sont mises en présence de surnageant de macrophages RAW 264.7 traités avec du L-NMMA (L-NMMA avec surnageant), le pourcentage d'apoptose (20%) n'est pas significativement différent du pourcentage d'apoptose des cellules AB-1 cultivées en présence de surnageant de macrophages non traités (Mock avec surnageant) (22,5%) (p-value = 0,208) (**Figure 19, panneau B**).

De plus, les cellules de mésothéliome AB-1 cultivées en présence de surnageant de macrophages RAW 264.7 traités avec du LPS et du L-NMMA sont caractérisées par un pourcentage d'apoptose (47,1%) qui ne présente également pas de différence significative par rapport au pourcentage d'apoptose des cellules AB-1 cultivées en présence de surnageant de macrophages traités uniquement avec du LPS (53,1%) (p-value=0,072) (**Figure 19, panneau B**).

Finalement, les pourcentages d'apoptose des cellules de mésothéliome AB-1 (7,3%) augmentent significativement de 12,7% (20% - 7,3%) lorsque celles-ci sont mis en présence de surnageant de macrophages RAW 264.7 traités uniquement avec du L-NMMA (20%) (p-value = 0,011) et de 39,8% (47,1% - 7,3%) lorsque celles-ci sont mis en présence de surnageant de macrophages RAW 264.7 traités avec du LPS et du L-NMMA (47,1%) (p-value = 0,001) (**Figure 19, panneau B**).



**Figure 19. Implication du monoxyde d'azote dans l'activité cytotoxique indirecte des macrophages RAW 264.7 envers les cellules de mésothéliome AB-1. A. Plan expérimental.** Les macrophages RAW 264.7 ont été traités avec du L-NMMA pendant 24 heures et stimulés avec du LPS pendant 24 heures. Le surnageant des macrophages a été récolté. Les cellules de mésothéliome AB-1 ont été cultivées en présence de 25% de surnageant. Des cellules AB-1 seules et traitées avec du lapatinib (25 $\mu$ M) pendant 24 heures ont servi respectivement de contrôles négatif et positif de l'expérience. Après 48 heures, les cellules ont été marquées à l'annexine V (FITC) et à l'iodure de propidium puis analysées au cytomètre en flux. **B. Pourcentage d'AB-1 apoptotiques lorsqu'ils sont en contact avec le surnageant des macrophages RAW 264.7.** Moyennes et écarts types du pourcentage d'apoptose des cellules AB-1 lorsqu'elles ont été incubées en présence de surnageant de macrophages traités ou non avec du LPS et du L-NMMA. Les résultats ont été analysés en pourcentage d'apoptose totale. L'expérience a été réalisée en huit répétitions indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test de Student apparié. Les \*, \*\*, \*\*\* signifient que les distributions présentent respectivement des différences significatives (p-value  $\leq$  0,05), hautement significatives (p-value  $\leq$  0,01) et très hautement significatives (p-value  $\leq$  0,001).

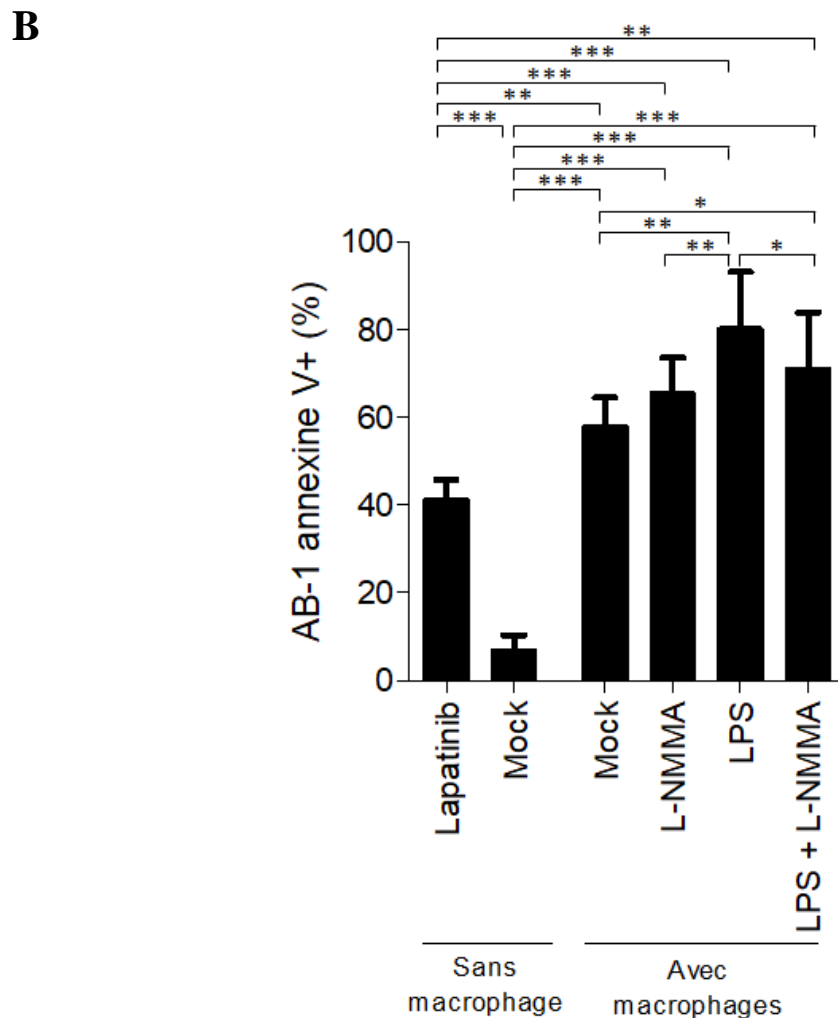
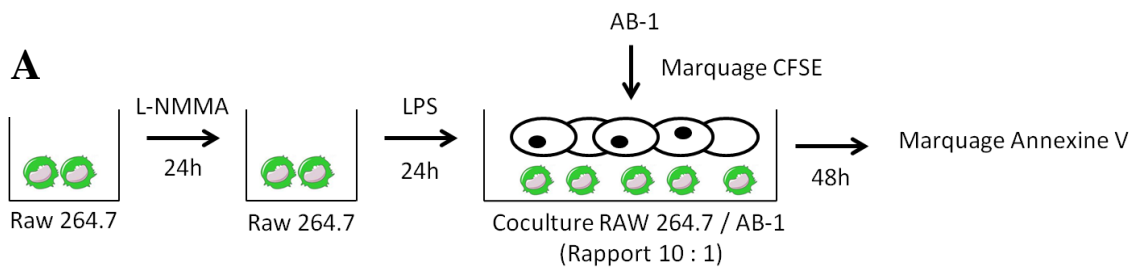
## 2.4. Implication du NO dans la cytotoxicité directe

L'effet des macrophages RAW 264.7, préalablement traités au L-NMMA, sur le pourcentage d'apoptose des cellules de mésothéliome lors d'une co-culture a été évalué. Pour ce faire, les macrophages RAW 264.7 ont été mis en présence de l'inhibiteur L-NMMA pendant 48 heures et ont été stimulés avec du LPS pendant les dernières 24 heures. Ensuite, les macrophages RAW 264.7 ont été co-cultivés avec des cellules de mésothéliome AB-1, préalablement marquées au CFSE, un marqueur de protéines membranaires, pendant 48 heures. Finalement, les cellules ont été marquées à l'annexine V et analysées au cytomètre en flux (**Figure 20, panneau A**).

Les résultats montrent que le pourcentage d'apoptose n'est pas significativement différent lorsque les cellules de mésothéliome AB-1 ont été directement mises en présence de macrophages traités avec du L-NMMA (65,3%) ou non (Mock avec macrophages) (57,8%) (p-value = 0,141) (**Figure 20, panneau B**).

De plus, les cellules de mésothéliome AB-1 mises en présence de macrophages RAW 264.7 traités avec du LPS présentent un pourcentage d'apoptose (80,1%) significativement plus élevé que lorsqu'elles sont mises en présence de macrophages RAW 264.7 traités avec du LPS et du L-NMMA (71,1 %) (p-value = 0,021) (**Figure 20, panneau B**).

Finalement, le pourcentage d'apoptose des cellules de mésothéliome AB-1 (6,6%) augmente significativement de 58,7 % (65,3% - 6,6%) lorsque celles-ci sont co-cultivées avec des macrophages RAW 264.7 traités uniquement avec du L-NMMA (65,3%) (p-value = 0,001) et de 64,5 % (71,1% - 6,6%) lorsqu'elles sont co-cultivées avec des macrophages traités avec du L-NMMA et du LPS (71,1%) (p-value = 0,001) (**Figure 20, panneau B**).



**Figure 20. Implication du monoxyde d'azote dans l'activité cytotoxique directe des macrophages RAW 264.7 envers les cellules de mésothéliome AB-1. A. Plan expérimental.** Les macrophages RAW 264.7 ont été traités avec du L-NMMA pendant 24 heures et stimulés avec du LPS pendant 24 heures. Les macrophages ont été co-cultivés avec des cellules de mésothéliome AB-1, préalablement marquées au CFSE, pendant 48 heures. Des cellules AB-1 seules et traitées avec du lapatinib (25 $\mu$ M) pendant 24 heures ont servi respectivement de contrôle négatif et positif de l'expérience. Les cellules ont été marquées à l'annexine V (APC) et analysées au cytomètre en flux. **B. Pourcentage d'AB-1 apoptotique en contact direct avec RAW 264.7.** Moyennes et écarts types du pourcentage de cellules AB-1 apoptotiques lorsqu'elles ont été co-cultivées avec des macrophages traités ou non avec du LPS et du L-NMMA. L'expérience a été réalisée en 6 répétitions indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test de Student apparié. Les \*, \*\*, \*\*\* signifient que les distributions présentent respectivement des différences significatives (p-value  $\leq$  0,05), hautement significatives (p-value  $\leq$  0,01) et très hautement significatives (p-value  $\leq$  0,001).

## 2.5. Effet du L-NMMA sur la production de nitrites

Un dosage de nitrites a été mis en place afin de vérifier l'influence de l'inhibiteur L-NMMA sur la production de monoxyde d'azote. Le dosage a été réalisé en traitant des macrophages RAW 264.7 avec du L-NMMA et du paracétamol (contrôle positif) pendant 48 heures et en stimulant les macrophages avec du LPS pendant les dernières 24 heures. Le dosage des nitrites a été réalisé dans 50  $\mu$ L de surnageant de macrophages en présence du réactif de Griess.

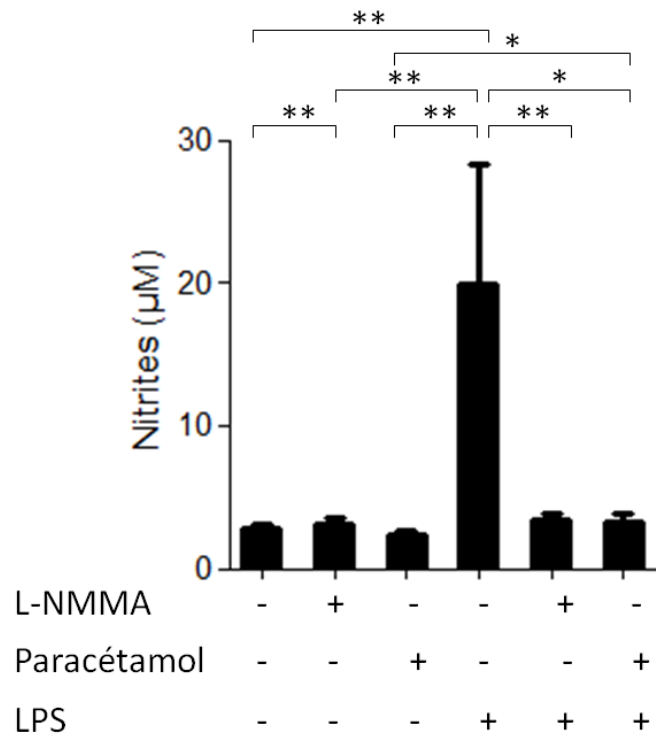
La concentration de nitrites augmente de manière significative (p-value= 0.009) lorsque les macrophages ont été traités avec LPS (19.9  $\mu$ M) en comparaison des macrophages non traités (Mock) (2.7  $\mu$ M) (**Figure 21**).

Les Mock présentent une production de nitrites similaire à celles des macrophages traités avec du paracétamol (p-value = 0,471), avec du LPS et du L-NMMA (p-value = 0,066) et avec du LPS et du paracétamol (p-value = 0,393) (**Figure 21**).

Les Mock présentent une production de nitrites significativement moins élevée (2,74  $\mu$ M) que les macrophages traités uniquement avec du L-NMMA (3,12  $\mu$ M), bien que la différence corresponde à 0,38  $\mu$ M en moyenne (p-value = 0,004) (**Figure 21**).

De plus, les RAW 264.7 traités avec du LPS produisent significativement plus de nitrites que les RAW 264.7 traités avec du LPS et du paracétamol (p-value = 0,012) (**Figure 21**).

Finalement, les résultats montrent que les macrophages activés en présence de LPS produisent significativement plus de nitrites (19,9  $\mu$ M) que les macrophages traités avec du LPS et du L-NMMA (3,5  $\mu$ M) (p-value = 0,009) (**Figure 21**).



**Figure 21. Influence du L-NMMA sur la production de nitrites.** Des macrophages RAW 264.7 ont été traités avec du L-NMMA ou du paracétamol pendant 48 heures et avec du LPS pendant 24 heures. Les nitrites ont été dosés au moyen du réactif de Griess et l'absorbance a été mesurée à 532 nm au moyen d'un spectrophotomètre. L'expérience a été réalisée en cinq répétitions. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test de Student apparié. Les \* et \*\* signifient que les distributions présentent respectivement des différences significatives (p-value  $\leq 0,05$ ) et hautement significatives (p-value  $\leq 0,01$ ).

# Discussion et perspectives

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée qui jouent un rôle important dans la reconnaissance d'agents étrangers, dans leur destruction en tant que cellules phagocytaires, et dans l'activation du système adaptatif en tant que cellules présentatrices d'antigène (Owen et al., 2013). Les macrophages sont retrouvés en abondance dans l'environnement tumoral et constituent une première ligne de défense contre les cellules tumorales (Ahsan et al., 2002; Lamagna et al., 2006; Izzi et al., 2009). Quelques études ont montré qu'en plus de l'activité phagocytaire, les macrophages avaient également la capacité d'exercer une activité cytotoxique envers les cellules tumorales (Zacharchuk et al., 1983; Cui et al., 1994; Albina et al., 1998; Rahat et al., 2013).

L'objectif global de ce travail de fin d'études consistait à étudier l'activité cytotoxique des macrophages dans le but de mieux comprendre les mécanismes qu'ils emploient pour tuer les cellules de mésothéliome, en vue de pouvoir ultérieurement les inclure dans un traitement thérapeutique.

## **Les RAW 264.7 exercent une activité cytotoxique sur les AB-1**

Le premier objectif de ce travail de fin d'études était de confirmer la capacité des macrophages RAW 264.7 à exercer une activité cytotoxique sur les cellules de mésothéliome AB-1. Les résultats ont montré que les macrophages induisent effectivement une mort par apoptose des cellules de mésothéliome (**Figures 14, 15 et 16**). Bien que la littérature relative aux activités de phagocytose des macrophages soit très étendue, leur activité cytotoxique n'est que très partiellement comprise (Piessens, 1977; Chapes et al., 1988; Albina et al., 1993; Cui et al., 1994; Jadus et al., 1996; Grisham et al., 1999; O'Sullivan et al., 2012; Rahat et al., 2013).

## **Importance de l'activation des RAW 264.7 dans l'activité cytotoxique**

Au cours de ce travail, l'effet de l'activation des macrophages au LPS sur l'activité cytotoxique a également été étudié. Le LPS est un composant de la paroi des bactéries GRAM<sup>-</sup> qui est capable d'activer les macrophages à travers le récepteur TLR-4 (Lorenz et al., 2002; Brown et al., 2011). Les résultats ont montré que l'activité cytotoxique était dépendante

de l'état d'activation des macrophages (**Figures 14 et 16**). En effet, bien que les macrophages exercent une activité cytotoxique faible, mais significative en conditions physiologiques normales, l'activation des macrophages en présence de LPS permet d'augmenter cette activité. Ceci peut être expliqué par le fait que les macrophages, en conditions physiologiques normales, produisent une quantité faible de médiateurs pro-inflammatoires tels que les substances réactives et les cytokines, mais suffisante pour induire l'apoptose des cellules de mésothéliome. De plus, une fois activés, les macrophages amplifient la production de ces composés présentant ainsi une activité cytotoxique accrue (**Figure 17**) (Albina et al., 1993; Meng et al., 1997; Grisham et al., 1999; Halaas et al., 2000; Galván-Peña et al., 2014).

## **Les RAW 264.7 exercent une activité cytotoxique directe et indirecte sur les AB-1**

Afin de déterminer quels mécanismes sont impliqués dans l'activité cytotoxique, deux modèles ont été considérés : (1) l'activité cytotoxique indirecte qui résulte de l'action de médiateurs cytotoxiques solubles et (2) l'activité cytotoxique directe qui détermine, en plus de l'implication des médiateurs solubles, l'importance d'un contact entre les macrophages et les cellules tumorales. Les résultats ont montré que les macrophages exerçaient une activité cytotoxique autant directe qu'indirecte.

## **L'activité cytotoxique des macrophages exercée par l'intermédiaire de médiateurs solubles**

Les macrophages ont la capacité de produire un ensemble de composés parmi lesquels certains ont le potentiel de jouer un rôle dans l'activité cytotoxique tels que les cytokines pro-inflammatoires, les protéases et les substances réactives oxygénées et azotées (Nathan, 1987; Albina et al., 1998; Perry et al., 2014). Dans le cadre de ce travail de fin d'études, les recherches se sont focalisées sur l'étude de l'implication du monoxyde d'azote dans l'activité cytotoxique.

Le NO est un composé non chargé, radicalaire produit par l'enzyme iNOS lors de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline et en monoxyde d'azote (Beckman et al., 1996; Albina et al., 1998; Owen et al., 2013). Le NO est une substance réactive connue pour avoir une activité antimicrobienne (Kong et al., 1996; Albina et al., 1998; Chen et al., 2015). De plus, le NO est très soluble dans un environnement hydrophobe, ce qui le rend capable de diffuser à travers



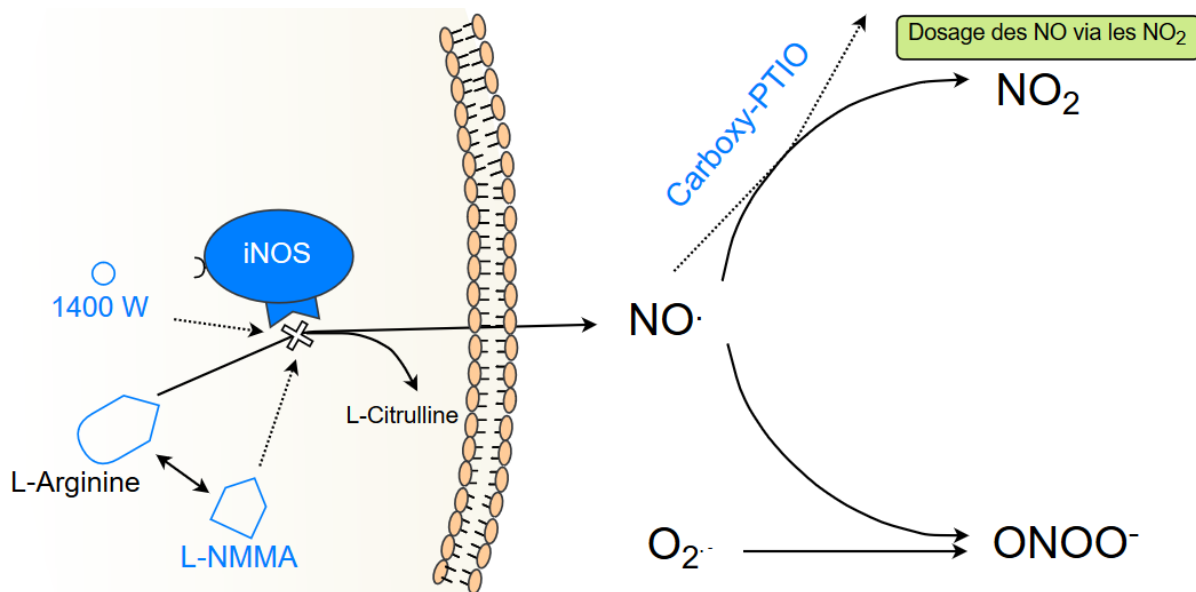
les membranes biologiques (Beckman et al., 1996; Hill et al., 2010). En raison de ces différentes propriétés, le NO semblait être un bon candidat pour être impliqué dans l'activité cytotoxique des macrophages. C'est pourquoi cette implication a été étudiée en utilisant un inhibiteur enzymatique.

Le L-NMMA, un inhibiteur compétitif non sélectif de NO, a dès lors été utilisé dans le but de réduire la synthèse de NO et de ses différents dérivés (Garvey et al., 1997; Vítěček et al., 2012). Les résultats montrent que le L-NMMA, utilisé à une concentration recommandée dans la littérature, permet effectivement de réduire la production de nitrites, un dérivé direct du NO, tout en n'affectant pas la viabilité des macrophages (**Figures 18 et 21**) (Swierkosz et al., 1995; Pekarova et al., 2013; Jin et al., 2015).

L'expérience consistant à cultiver les cellules tumorales en présence de surnageant de macrophages, incubés préalablement avec du L-NMMA, a permis de voir que l'inhibition de NO n'affecte pas ou peu l'activité cytotoxique des macrophages (**Figures 19 et 20**). Cette approche suggère que le monoxyde d'azote n'est dès lors pas impliqué dans cette activité cytotoxique.

Au vu de ces résultats, deux futures approches pourraient être faites.

Dans un premier temps, il pourrait être intéressant d'utiliser une autre méthode de quantification du NO afin de confirmer son inhibition par le L-NMMA. En effet, Le NO est un composé instable caractérisé par un temps de vie très faible (Hill et al., 2010). Il est donc difficile de le doser par une méthode spécifique et requiert ainsi l'utilisation de méthodes indirectes, telles que le dosage du NO par le biais du NO<sub>2</sub> (**Figure 22**). Cependant, il est important de souligner que le NO peut également se transformer en d'autres dérivés, tels que le ONOO<sup>-</sup>. La méthode de dosage du NO par le biais du NO<sub>2</sub> ne prenant pas en compte la formation de ces autres dérivés, il pourrait dès lors être intéressant de coupler plusieurs méthodes de quantification dans le but de confirmer l'inhibition du NO par le L-NMMA. Le ONOO<sup>-</sup> pourrait notamment être quantifié par des méthodes de GC-MS et de HPLC (Tsikas, 2011).



**Figure 22. Représentation schématique de la réaction enzymatique menée par l'enzyme iNOS, du mode d'action des différents inhibiteurs de NO et de la méthode de dosage utilisée pour doser le NO.** iNOS transforme la L-arginine (substrat) en L-citrulline et en NO. Le L-NMMA agit comme un inhibiteur compétitif de la L-arginine. Le 1400W inhibe iNOS en agissant sur un autre site de liaison que celui du substrat. Le Carboxy-PTIO induit l'oxydation du NO en NO<sub>2</sub>. Le NO a été dosé à partir de l'un de ses dérivés, le NO<sub>2</sub> (Amano et al., 1995; Garvey et al., 1997; Förstermann et al., 2012; Víteček et al., 2012).

De plus, afin de confirmer la non-implication du NO dans l'activité cytotoxique, il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres inhibiteurs de NO présentant un mode d'action ou une sélectivité différente. En effet, le manque de spécificité de la méthode de dosage du NO permet d'envisager que le L-NMMA puisse agir lentement ou soit peu performant, laissant suffisamment de temps à l'enzyme iNOS de produire du NO et que celui-ci se transforme préférentiellement en ONOO<sup>-</sup>, au détriment du NO<sub>2</sub>. Parmi les autres inhibiteurs, le 1400 W et le carboxy-PTIO seraient intéressants à étudier. Le 1400 W agit sur un autre site que celui du substrat en comparaison au L-NMMA (Garvey et al., 1997; Puttachary et al., 2016). Par ailleurs, le carboxy-PTIO agit comme un inhibiteur en oxydant le NO en un composé moins réactif, le nitrite (**Figure 22**) (Amano et al., 1995; Yokota et al., 2015).

Bien que la production de NO soit inhibée, les macrophages présentent néanmoins une activité cytotoxique (**Figures 19 et 20**). Comme expliqué plus haut, ceci suggère que le NO n'est pas impliqué dans l'activité cytotoxique des macrophages. Cependant, il est possible que des dérivés du NO, tels que le ONOO<sup>-</sup> soient incriminés. Dans ce contexte, des résultats préliminaires du laboratoire ont démontré l'implication des ROS et ONOO<sup>-</sup> dans l'activité cytotoxique des macrophages (Hamaidia, résultats non publiés). Il serait dès lors intéressant de déterminer les niveaux de ONOO<sup>-</sup> en présence d'inhibiteur de NO et de les corrélés avec l'activité cytotoxique. Par ailleurs, il est probable que d'autres composés solubles tels que les

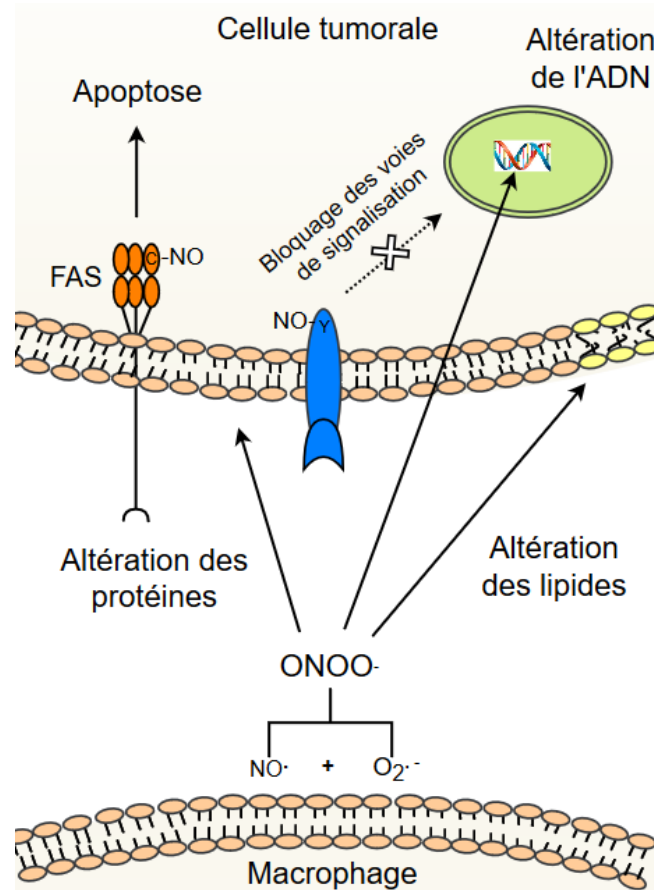
cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) jouent également un rôle cytotoxique (Zacharchuk et al., 1983; Cui et al., 1994; Tracey et al., 1994; Meng et al., 1997; Duque et al., 2014).

Le fait que des études aient démontré que les ONOO<sup>-</sup> soient impliqués dans l'activité cytotoxique et que la présente étude ait montré que les NO ne le soient pas, suggère que le NO soit une condition nécessaire, mais pas suffisante pour exercer une cytotoxicité (Albina et al., 1998; Hamaidia et al., 2016). Ainsi, les NO, composés instables, sont très vite transformés en dérivés plus stables tels que les peroxy-nitrites, responsables d'une cytotoxicité (Albina et al., 1998; Hill et al., 2010).

Les peroxy-nitrites sont des dérivés azotés produits lors de la réaction entre les NO et les O<sub>2</sub> (Beckman et al., 1996; Owen et al., 2013; Radi, 2013). Selon Beckman et al., ils peuvent être à l'origine de plus de dommages que les NO car, étant plus stables, ils peuvent diffuser plus loin et toucher plus de cibles (Beckman et al., 1996). Les ONOO<sup>-</sup> exercent une activité cytotoxique en induisant des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines par des réactions de déamination, de peroxydation, d'oxydation, de nitration et de nitrosylation (**Figure 23**) (Wiseman et al., 1996; Albina et al., 1998; Leon-Bollotte et al., 2011; Rahat et al., 2013; Prolo et al., 2014; Plenchette et al., 2015; Thanan et al., 2015). Ainsi, les peroxy-nitrites altèrent la structure et la fonction de ces composés, indispensables au bon fonctionnement cellulaire. Par exemple, la nitrosylation et la nitration des tyrosines inhibent leur phosphorylation, indispensable à la transduction des signaux (Wiseman et al., 1996, 2012; Albina et al., 1998; Feng et al., 2017). En réagissant avec les ions (fer et soufre) de la chaîne des transporteurs d'électrons, les ONOO<sup>-</sup> vont également inhiber la respiration mitochondriale (Albina et al., 1998; Wiseman et al., 2012). Un autre exemple est la S-nitrosylation de la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B présente sur le résidu cystéine 62 qui va réduire l'activité de NF- $\kappa$ B, impliquée dans une réponse anti-apoptotique (Rahat et al., 2013).

Les peroxy-nitrites vont également jouer un rôle important dans la régulation des récepteurs de mort (Rahat et al., 2013). Ces récepteurs, enchâssés dans la membrane cellulaire, induisent la mort lorsqu'ils sont activés par leur ligand respectif. Parmi ceux-ci, les plus connus sont les récepteurs Fas, TNF-R, TRAMP, TRAIL, DR6, CD30, (Daniel et al., 2001; Dabir et al., 2015). En nitrosylant les récepteurs de mort, les peroxy-nitrites peuvent augmenter leur expression et induire des changements conformationnels qui les rendent plus sensibles à leur

ligand agoniste. En nitrosylant l'inhibiteur YY1, les peroxy-nitrites vont réduire la répression de la transcription du promoteur Fas, ayant ainsi pour conséquence une expression accrue de ce récepteur (Rahat et al., 2013; Plenchette et al., 2015). De plus, la nitrosylation du résidu cystéine 304 du récepteur Fas induit sa trimérisation ainsi que la formation du complexe protéique, appelé DISC, impliqué dans la progression du signal apoptotique, rendant les cellules plus sensibles à l'apoptose en présence de leur ligand agoniste (Leon-Bollotte et al., 2011; Plenchette et al., 2015).



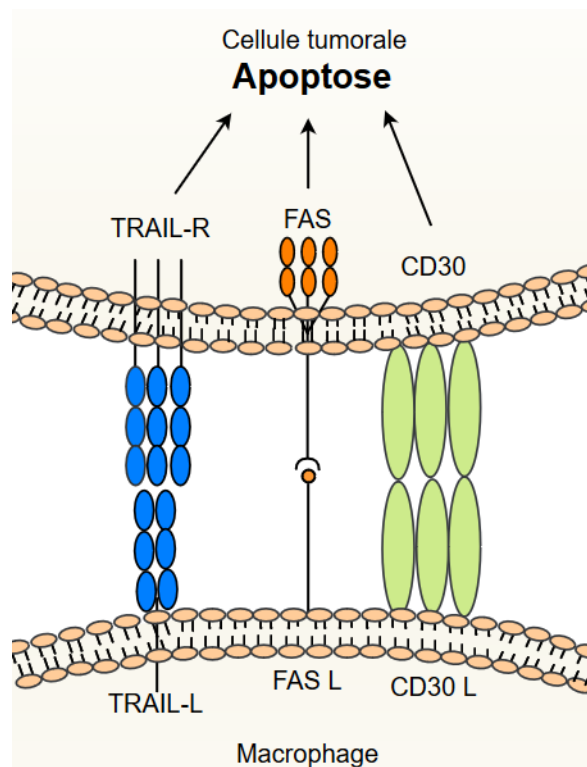
**Figure 23. Représentation schématique de l'activité cytotoxique indirecte des macrophages par le biais des peroxy-nitrites (ONOO<sup>-</sup>) en induisant des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines par des réactions de déamination, de peroxydation, d'oxydation, de nitration et de nitrosylation.** En réagissant avec l'ADN, les peroxy-nitrites sont capables de créer des cassures simple et double brins, des substitutions, des délétions, des réarrangements et des insertions de bases générant ainsi des mutations (Greenblatt et al., 1994; Pass et al., 2005; Yang et al., 2008; Thanan et al., 2015). Les ONOO<sup>-</sup> vont altérer les lipides par des réactions d'oxydation et de nitration générant des composés instables et altérant ainsi les propriétés membranaires (Prolo et al., 2014; Thanan et al., 2015). La réaction des peroxy-nitrites avec les protéines va également altérer leurs fonctions. Par exemple, la nitrosylation du résidu cystéine 304 du récepteur Fas induit sa trimérisation ainsi que la formation du complexe DISC, rendant les cellules plus sensibles à l'apoptose en présence de leur ligand agoniste (Leon-Bollotte et al., 2011; Plenchette et al., 2015). De plus, la nitrosylation des tyrosines présentes notamment sur les récepteurs EGFR empêche leur phosphorylation, bloquant ainsi la transduction du signal, la prolifération et la survie des cellules (Wiseman et al., 1996, 2012; Albina et al., 1998).

## **L'activité cytotoxique des macrophages exercée par l'intermédiaire d'un contact entre les macrophages RAW 264.7 et les cellules de mésothéliome AB-1**

Lors d'une co-culture, les macrophages font intervenir des médiateurs solubles dans l'activité cytotoxique, mais ils ont aussi la possibilité de pouvoir interagir directement avec les cellules tumorales. Cette interaction peut exercer une influence sur l'état d'activation des macrophages et sur l'activité cytotoxique qu'ils exercent. C'est pourquoi, afin de déterminer l'importance d'un contact dans l'activité cytotoxique, des macrophages RAW 264.7 ont été co-cultivés en présence de cellules de mésothéliome AB-1 et le pourcentage d'apoptose a été déterminé. Les résultats ont montré que l'activité cytotoxique des macrophages était plus importante lors d'une co-culture, suggérant l'importance d'un contact létal entre les macrophages et les cellules de mésothéliome dans l'activité cytotoxique qui n'implique pas la phagocytose (**Figures 16 et 20**) (Piessens, 1977; Chapes et al., 1988; Cui et al., 1994; O'Sullivan et al., 2012).

Dans la littérature, les contacts létaux sont le plus souvent associés aux LT CD8<sup>+</sup> ainsi qu'aux cellules NK (Schmid et al., 1986; Cohen et al., 1992; Cui et al., 1994; Topham et al., 2009; Olofsson et al., 2014; Gröschel et al., 2017). Des articles faisant référence à l'activité cytotoxique des macrophages envers les cellules tumorales illustrent l'implication d'effecteurs solubles tels que les peroxy-nitrites, TNF- $\alpha$  et l'importance d'un contact pour exercer une activité cytotoxique, sans pour autant approfondir les mécanismes pouvant être impliqués lors de ce contact (Zacharchuk et al., 1983; Chapes et al., 1988; Cui et al., 1994; Jadus et al., 1996; Albina et al., 1998; O'Sullivan et al., 2012; Rahat et al., 2013). Or, les macrophages peuvent également exprimer des molécules à la surface de leur membrane parmi lesquelles se trouvent les ligands agonistes aux récepteurs de mort précités. Ces ligands peuvent induire l'apoptose lorsque ceux-ci entrent en contact avec leur récepteur agoniste présent à la surface de cellules tumorales. Les macrophages expriment les ligands TNF- $\alpha$ , Fas L, TRAIL-L et CD30L (Halaas et al., 2000; Daniel et al., 2001; Matsumoto et al., 2015). Les cellules de mésothéliome, quant à elles, expriment les récepteurs de mort TNFR, FAS, TRAIL-R1/2 et CD30 (Stewart et al., 2002; Belyanskaya et al., 2007; Pasello et al., 2014; Dabir et al., 2015). Il est dès lors possible que l'activité cytotoxique exercée par les macrophages se fasse en partie par l'engagement de ces ligands à leur récepteur associé (**Figure 24**). Il pourrait être intéressant de vérifier ces hypothèses en analysant la transduction des signaux inducteurs d'apoptose dans les lignées cellulaires étudiées (RAW 264.7 et AB-1).

Utiliser ces récepteurs de mort comme nouvelle stratégie thérapeutique semble donc fort prometteur. Des chercheurs travaillant sur le récepteur Fas ont notamment démontré que les ligands de ces récepteurs étaient effectivement capables d'induire l'apoptose sur certaines lignées de mésothéliome (Stewart et al., 2002). Bien que d'autres lignées aient été réfractaires à la cytotoxicité de FasL, un prétraitement de ces cellules en présence de cisplatine et de cellules mononucléées activées par des lymphokines a permis de restaurer leur sensibilité au FasL (Stewart et al., 2002). Le récepteur CD30 a également montré des résultats encourageants par l'utilisation d'un anticorps anti-CD30 conjugué à une toxine, le monométhyl auristatin E (brentuximab vedotin). En effet, le brentuximab vedotin a permis de réduire la croissance cellulaire et la viabilité des cellules de mésothéliome (Dabir et al., 2015). De plus, une étude a montré que l'utilisation d'anticorps contre les récepteurs TRAIL (mapatumumab) permettait de réduire la viabilité des cellules tumorales (Pukac et al., 2005). Finalement, Belyanskaya, L.L. et al. a pu montrer que la combinaison du cisplatine et de deux anticorps (mapatumumab et lexatumumab) agissant respectivement contre les récepteurs TRAIL-R1 et -R2 présente un effet synergique sur l'induction d'apoptose des cellules de mésothéliome (Belyanskaya et al., 2007).



**Figure 24. Représentation schématique de l'activité cytotoxique directe des macrophages sur les cellules de mésothéliome.** Les macrophages expriment des Fas L, TRAIL-L et CD30L qui peuvent interagir avec les récepteurs de mort Fas, TRAIL et CD30 exprimés par les cellules de mésothéliome et ainsi induire l'apoptose (Halaas et al., 2000; Daniel et al., 2001; Stewart et al., 2002; Pasello et al., 2014; Dabir et al., 2015).

## **Le contact létal, une approche ancienne à redécouvrir...**

Comme expliqué précédemment, l'activité cytotoxique des macrophages est plus importante lors d'une co-culture, suggérant un contact létal. Ce contact létal est dès lors une voie cytotoxique qui pourrait être approfondie. C'est pourquoi il pourrait être intéressant de trouver de nouvelles approches qui permettraient d'amplifier ce contact. Quelques rares études assez anciennes ont été menées dans le but de mieux comprendre la reconnaissance des cellules tumorales par les macrophages ainsi que leur liaison dans la cytotoxicité directe (Piessens, 1977, 1978; Chapes et al., 1988). Ces études ont suggéré que les cellules tumorales pouvaient être reconnues par les macrophages en raison de leur membrane altérée suite à l'expression d'agents oncogènes. L'utilisation d'agents altérant la fluidité membranaire tels que la cytochalasin B a ainsi permis d'augmenter la mortalité des cellules tumorales (Chapes et al., 1988). De plus, les macrophages activés interagissent plus fortement avec les cellules tumorales, suggérant l'importance de cette force de liaison cellulaire dans l'activité cytotoxique (Piessens, 1977, 1978). De manière intéressante, l'ajout d'agents permettant d'augmenter la liaison entre les cellules tumorales et les macrophages, tels que la combinaison de neuraminidase et de galactose oxidase, a pu augmenter la mortalité des cellules tumorales (Piessens, 1977).

Ces études illustrent qu'il est effectivement possible d'augmenter l'activité cytotoxique des macrophages en modulant les mécanismes de reconnaissance et de liaison entre les macrophages et les cellules tumorales et constituent dès lors une voie de recherche à approfondir.

## **Conclusion**

En conclusion, ce travail de fin d'études a permis de démontrer que les macrophages étaient effectivement capables d'exercer une activité cytotoxique contre les cellules de mésothéliome par le biais de médiateurs solubles ainsi que via un contact létal direct.

# Bibliographie

- Aderem A. & Underhill D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623.
- Ahsan F., Rivas I.P., Khan M.A. & Suarez A.I.T., 2002. Targeting to macrophages : role of physicochemical properties of particulate carriers — liposomes and microspheres — on the phagocytosis by macrophages. *J. Control. Release* **79**, 29–40.
- Akira S., Misawa T., Satoh T. & Saitoh T., 2013. Macrophages control innate inflammation. *Diabetes, Obes. Metab.* **15**(Suppl.3), 10–18.
- Albina J.E., Cui S., Mateo R.B. & Reichner J.S., 1993. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **150**(11), 5080–5085.
- Albina J.E. & Reichner J.S., 1998. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev.* **17**(1), 39–53.
- Amano F. & Noda T., 1995. Improved detection of nitric oxide radical ( NO) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger , carboxy PTIO , and Griess reagent. *FEBS Lett.* **368**(3), 425–428.
- Attanoos R.L. & Gibbs A.R., 1997. Pathology of malignant mesothelioma. *Histopathology* **30**(5), 403–418.
- Aubier M., Crestani B., Fournier M. & Mal H., 2009. *Traité de pneumologie - 2e ed.*, Médecine Sciences Publications.
- Beckman J.S. & Koppenol W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* **271**(5 Pt 1), C1424–C1437.
- Belyanskaya L.L. et al., 2007. Human agonistic TRAIL receptor antibodies Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in malignant mesothelioma and act synergistically with cisplatin. *Mol. Cancer* **6**(66), 1–13.
- Bianchi C. & Bianchi T., 2007. Malignant Mesothelioma : Global Incidence and Relationship with Asbestos. *Ind. Health* **45**(3), 379–387.
- Bonelli M.A., Fumarola C., Monica S. La & Alfieri R., 2017. New therapeutic strategies for malignant pleural mesothelioma. *Biochem. Pharmacol.* **123**, 8–18.
- Brown J., Wang H., Hajishengallis G.N. & Martin M., 2011. TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases, and Cross-talk. *J. Dent. Res.* **90**(4), 417–427.
- Carbone M. et al., 2012. Malignant Mesothelioma: Facts, Myths and hypotheses. *J. Cell Physiol.* **227**(1), 44–58.
- Carbone M., Pass H.I., Miele L. & Bocchetta M., 2003. New developments about the association of SV40 with human mesothelioma. *Oncogene* **22**(33), 5173–5180.
- Carbone M. & Yang H., 2012. Molecular Pathways : Targeting Mechanisms of Asbestos and Erionite Carcinogenesis in Mesothelioma. *Clin. Cancer Res.* **18**(3), 598–604.
- Cargnello M. & Roux P.P., 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**(1), 50–83.
- Chapes S.K., Duffin D. & Paulsen A.Q., 1988. Characterization of macrophage recognition and killing of SV40-transformed tumor cells that are “ resistant ” or “ susceptible ” to contact-mediated killing. *J. Immunol.* **140**(2), 589–596.
- Chauvergne J. & Hoerni B., 2001. *Chimiothérapie anticancéreuse*, Elsevier / Masson.
- Chen T. et al., 2015. Nitric oxide as an antimicrobial molecule against *Vibrio harveyi* infection in the hepatopancreas of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **42**(1), 114–120.
- Chen Z. et al., 2017. Diagnostic and prognostic biomarkers for malignant mesothelioma: an update. *Transl. Lung Cancer Res.* **6**(3), 259–269.
- Chéné A.-L. et al., 2016. Pleural Effusions from Patients with Mesothelioma Induce



- Recruitment of Monocytes and Their Differentiation into M2 Macrophages. *J. Thorac. Oncol.* **11**(10), 1765–1773.
- Cohen J.J. & Duke R.C., 1992. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 267–293.
- Cornelissen R. et al., 2012. New Roads Open Up for Implementing Immunotherapy in Mesothelioma. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–13.
- Cui S., Reichner J.S., Mateo R.B. & Albina J.E., 1994. Activated Murine Macrophages Induce Apoptosis in Tumor Cells through Nitric or -independent Mechanisms. *Am. Assoc. Cancer Res.* **54**(9), 2462–2467.
- Dabir S. et al., 2015. CD30 is a potential therapeutic target in malignant mesothelioma. *Mol. Cancer Ther.* **14**(3), 740–746.
- Daniel P.T., Wieder T., Sturm I. & Schulze-Osthoff K., 2001. The kiss of death : promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* **15**(7), 1022–1032.
- Day B.J., 2009. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem. Pharmacol.* **77**(3), 285–296.
- Donaldson K., Murphy F.A., Duffin R. & Poland C.A., 2010. Asbestos , carbon nanotubes and the pleural mesothelium : a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura , inflammation and mesothelioma. *Part. Fibre Toxicol.* **7**(5), 1–17.
- Dunn G.P. et al., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**(11), 991–998.
- Dunning S. et al., 2013. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**(12), 2027–2034.
- Duque G.A. & Descoteaux A., 2014. Macrophage cytokines : involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* **5**(491), 1–12.
- Eren N.T. & Akar A.R., 2002. Primary pericardial mesothelioma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **3**(5), 369–373.
- Eruslanov E. & Kusmartsev S., 2010. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol.* **594**, 57–72.
- Feng C. et al., 2017. ROS: Crucial Intermediators in the Pathogenesis of Intervertebral Disc Degeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–12.
- Finn O.J., 2012. Immuno-oncology : understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann. Oncol.* **23**(Supplement 8), viii6-viii9.
- Foell D., Wittkowski H. & Roth J., 2007. Mechanisms of disease: a “DAMP” view of inflammatory arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **3**(7), 382–390.
- Fondation contre le Cancer, Mésothéliome – Généralités. <http://www.cancer.be/lescancers/types-de-cancers/m-soth-liome>, (06/07/17).
- Fondation contre le Cancer, Mésothéliome – Les cancers en chiffres. <http://www.cancer.be/les-cancers/le-cancer-en-chiffres>, (06/07/2017).
- Förstermann U. & Sessa W.C., 2012. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**(7), 829–837.
- Friedberg J.S. et al., 2017. Extended Pleurectomy-Decortication-Based Treatment for Advanced Stage Epithelial Mesothelioma Yielding a Median Survival of Nearly Three Years. *Ann. Thorac. Surg.* **103**(3), 912–919.
- Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C. & Pérez J.M., 2003. Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Curr. Med. Chem.* **10**(3), 257–266.
- Galván-Peña S. & O’Neill L.A.J., 2014. Metabolic reprogramming in macrophage polarization.

- Front. Immunol.* **5**, 1–6.
- Garvey E.P. et al., 1997. 1400W Is a Slow , Tight Binding , and Highly Selective Inhibitor of Inducible Nitric-oxide Synthase in Vitro and in Vivo \*. *J. Biol. Chem.* **272**(8), 4959–4963.
- Geyer C.E. et al., 2006. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *New Engand J. Med.* **355**(26), 2733–2743.
- Gibbs G. et al., 1998. Environmental Health Criteria 203: Chrysotile asbestos.
- Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M. & Harris C.C., 1994. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Perspect. Cancer Res.* **54**(18), 4855–4878.
- Grégoire M., 2010. What' s the place of immunotherapy in malignant mesothelioma treatments ? *Cell Adh. Migr.* **4**(1), 153–161.
- Grisham M.B., Jourdeuil D. & Wink D.A., 1999. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites:implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* **276**(2 Pt 1), G315–G321.
- Gröschel C. et al., 2017. Efficient Killing of Murine Pluripotent Stem Cells by Natural Killer (NK) Cells Requires Activation by Cytokines and Partly Depends on the Activating NK Receptor NKG2D. *Front. Immunol.* **8**, 1–13.
- Guimaraes D.P. & Hainaut P., 2002. TP53 : a key gene in human cancer. *Biochimie* **84**(1), 83–93.
- Halaas O., Vik R., Ashkenazi A. & Espevik T., 2000. Lipopolysaccharide Induces Expression of APO2 Ligand / TRAIL in Human Monocytes and Macrophages. *Scand J Immunol.* **51**(3), 244–250.
- Hamaidia M. et al., 2016. Improvement of Malignant Pleural Mesothelioma Immunotherapy by Epigenetic Modulators. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**(7), 1–11.
- Hamaidia M., 2017. L'inhibition de la méthyltransférase EZH2 du complexe répresseur polycomb favorise la réponse anti-tumorale des macrophages M2 dirigée contre les cellules du mésothéliome pleural malin.
- Harris L. V. & Kahwa I.A., 2003. Asbestos: Old foe in 21st century developing countries. *Sci. Total Environ.* **307**(1–3), 1–9.
- Hassan R., Alewine C. & Pastan I., 2016. New life for immunotoxin cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **22**(5), 1055–1058.
- Hill B.G. et al., 2010. What Part of NO Don' t You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *J. Biol. Chem.* **285**(26), 19699–19704.
- Hodgson J.T. & Darnton A., 2000. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann. Occup. Hyg.* **44**(8), 565–601.
- Isakov N., 1997. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. *J. Leukoc. Biol.* **61**(1), 6–16.
- Ivashkiv L.B., 2013. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol.* **34**(5), 216–223.
- Izzi V. et al., 2009. Differential effects of malignant mesothelioma cells on THP-1 monocytes and macrophages. *Int. J. Oncol.* **34**(2), 543–550.
- Izzi V. et al., 2012. Immunity and malignant mesothelioma : From mesothelial cell damage to tumor development and immune response-based therapies. *Cancer Lett.* **322**(1), 18–34.
- Jadus B.M.R. et al., 1996. Macrophages Can Recognize and Kill Tumor Cells Bearing the Membrane Isoform of Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood J.* **87**(12), 5232–5241.
- Janeway C.A., Murphy K., Travers P. & Walport M., 1997. *Immunobiologie*, De Boeck Supérieur.
- Jin S.E. et al., 2015. Traditional Herbal Formula Banhasasim-tang Exerts Anti-Inflammatory

- Effects in RAW 264 . 7 Macrophages and HaCaT Keratinocytes. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, 1–12.
- Kaarteenaho-Wiik R. et al., 2003. Over-expression of tenascin-C in malignant pleural mesothelioma. *Histopathology* **42**(3), 280–291.
- Kawai T. & Akira S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**(5), 373–384.
- Kierszenbaum A.L., 2006. *Histologie et biologie cellulaire Une introduction à l'anatomie pathologique*, De Boeck Supérieur.
- Knutson S.K. et al., 2014. Selective Inhibition of EZH2 by EPZ-6438 Leads to Potent Antitumor Activity in EZH2 -Mutant Non-Hodgkin Lymphoma. *Mol. Cancer Ther* **13**(4), 842–854.
- Kong S.K., Yim M.B., Stadtman E.R. & Chock P.B., 1996. Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH2 peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(8), 3377–3382.
- Lacave R., Larsen C.J. & Robert J., 2005. *Cancérologie fondamentale*, John Libbey Eurotext.
- Lamagna C., Aurrand-lions M. & Imhof B.A., 2006. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **80**(4), 705–713.
- Leclercq S. et al., 2011. A 5-aza-2 9 -deoxycytidine/valproate combination induces cytotoxic T-cell response against mesothelioma. *Eur. Respir. J.* **38**(5), 1105–1116.
- Leon-Bollotte L. et al., 2011. S-Nitrosylation of the death receptor Fas promotes Fas ligandmediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology* **140**(7), 2009–2018.
- Leong S.L., Zainudin R., Kazan-Allen L. & Robinson B., 2015. Asbestos in Asia. *Respirology* **20**(4), 548–555.
- Levin P.A. & Dowell J.E., 2017. Spotlight on bevacizumab and its potential in the treatment of malignant pleural mesothelioma : the evidence to date. *Onco Targets Ther.* **10**, 2057–2066.
- Lewis C.E. & Pollard J.W., 2006. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* **66**(2), 605–612.
- Lomas J.S., Richer J.-C., Ruasse M.-F. & Toullec J., 2001. *Glossaire des Termes Utilises en Chimie Organique Physique*, Techniques de l'Ingénieur.
- Lorenz E., Patel D.D., Hartung T. & Schwartz D.A., 2002. Toll-Like Receptor 4 (TLR4) - Deficient Murine Macrophage Cell Line as an In Vitro Assay System To Show TLR4-Independent Signaling of Bacteroides fragilis Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **70**, 4892–4896.
- Lorusso V. et al., 2012. Lapatinib , a TKI Dual Inhibitor of Her1 and Her2 Receptors : Review of the Literature. *J. Cancer Ther.* **3**(6), 1132–1139.
- Mandl M., Schmitz S., Weber C. & Hristov M., 2014. Characterization of the CD14 ++ CD16 + Monocyte Population in Human Bone Marrow. *PLoS One.* **9**(11), 1–6.
- Mantovani A. et al., 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* **229**(2), 176–185.
- Matsumoto H. et al., 2015. Membrane-bound and soluble Fas ligands have opposite functions in photoreceptor cell death following separation from the retinal pigment epithelium. *Cell Death Dis.* **6**(11), 1–9.
- Meng F. & Lowell C.A., 1997. Lipopolysaccharide (LPS)-induced Macrophage Activation and Signal Transduction in the Absence of Src-Family Kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* **185**(9), 1661–1670.
- Miselis N.R., Wu Z.J., Rooijen N. Van & Kane A.B., 2008. Targeting tumor-associated macrophages in an orthotopic murine model of diffuse malignant mesothelioma. *Mol Cancer Ther* **7**(4), 788–799.

- Mosser D.M. & Zhang X., 2008. Activation of Murine Macrophages. *In: Curr Protoc Immunol.* 1–9.
- Mossman B.T. et al., 2013. New Insights into Understanding the Mechanisms, Pathogenesis, and Management of Malignant Mesotheliomas. *Am. J. Pathol.* **182**(4), 1065–1077.
- Munn L.L., 2017. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **9**(2), 1–13.
- Murray P.J. & Wynn T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**(11), 723–737.
- Nathan C.F., 1987. Secretory Products of Macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**(2), 319–326.
- Nelson V., Ziehr J., Agulnik M. & Johnson M., 2013. Afatinib: emerging next-generation tyrosine kinase inhibitor for NSCLC. *Onco. Targets. Ther.* **6**, 135–143.
- Neumann V. et al., 2013. Malignant pleural mesothelioma: incidence, etiology, diagnosis, treatment, and occupational health. *Dtsch. Arztebl. Int.* **110**(18), 319–326.
- O’Sullivan T. et al., 2012. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J. Exp. Med.* **209**(10), 1869–1882.
- Olken N.M., Osawa Y. & Marletta M.A., 1994. Characterization of the inactivation of nitric oxide synthase by NG-methyl-L-arginine: evidence for heme loss. *Biochemistry* **33**(49), 14784–14791.
- Olofsson P.E. et al., 2014. Distinct migration and contact dynamics of resting and IL-2-activated human natural killer cells. *Front. Immunol.* **5**, 1–10.
- Opitz I., 2014. Management of malignant pleural mesothelioma — The European experience. *J. Thorac. Dis.* **6**(Suppl 2), S238–S252.
- Owen J.A., Punt J. & Stranford S.A., 2013. *Immunologie. Le cours de Janis Kuby*, Dunod.
- Pasello G. et al., 2014. Synergistic Antitumor Activity of Recombinant Human Apo2L/Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in Combination with Carboplatin and Pemetrexed in Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **9**(7), 1008–1017.
- Pass H.I., Vogelzang N. & Carbone M., 2005. *Malignant Mesothelioma: Pathogenesis, Diagnosis, and Translational Therapies*, New York: Springer, 854.
- Pekarova M. et al., 2013. Asymmetric dimethylarginine regulates the lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages by suppressing the activation of NF-kappaB and iNOS expression. *Eur. J. Pharmacol.* **713**(1–3), 68–77.
- Perry J. a et al., 2014. A macrophage-stimulating compound from a screen of microbial natural products. *J. Antibiot. (Tokyo).* **68**(1), 40–46.
- Piessens W.F., 1977. Increased binding and killing of neuraminidase-galactose oxidase-treated tumor cells by normal macrophages. *J. Immunol.* **119**(1), 167–172.
- Piessens W.F., 1978. Increased binding of tumor cells by macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators. *Cell. Immunol.* **35**(2), 303–317.
- Plenchette S., Romagny S., Laurens V. & Bettaieb A., 2015. S-nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: Implication in cancer. *Redox Biol.* **6**, 507–515.
- Prendergast G. & Jaffee E., 2013. *Cancer immunotherapy. Immune Suppression and Tumor Growth*, Academic Press.
- Prolo C., Álvarez M.N. & Radi R., 2014. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *Biofactors* **40**(2), 215–225.
- Pukac L. et al., 2005. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* **92**(8), 1430–41.
- Puttachary S. et al., 2016. 1400W, a highly selective inducible nitric oxide synthase inhibitor is a potential disease modifier in the rat kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **93**, 184–200.

- Quatromoni J.G. & Eruslanov E., 2012. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am. J. Transl. Res.* **4**(4), 376–389.
- Radi R., 2013. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J. Biol. Chem.* **288**(37), 26464–26472.
- Rahat M.A. & Hemmerlein B., 2013. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. *Front. Physiol.* **4**, 1–15.
- Rath M. et al., 2014. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* **5**(532), 1–10.
- Redirecting T Cells. Tumor Cells Are Often Recognized and Eliminated Through T-Cell-Mediated Immunosurveillance. <http://www.amgenoncology.com/diseasestateeducation/redirecting-t-cells.html>, (consulté le 06/07/17).
- Remon J., Reguart N., Corral J. & Lianes P., 2015. Malignant pleural mesothelioma: New hope in the horizon with novel therapeutic strategies. *Cancer Treat. Rev.* **41**(1), 27–34.
- Rimner A. & Rosenzweig K.E., 2012. Novel radiation therapy approaches in malignant pleural mesothelioma. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **1**(4), 457–461.
- Robinson B.W.S., Musk A.W. & Lake R.A., 2005. Malignant mesothelioma. *Lancet.* **366**(9483), 397–408.
- Scherpereel A., 2017. Chemotherapy for Malignant Pleural Mesothelioma: Past, Present and Future. *Curr. Pulmonol. Reports* **6**(2), 155–159.
- Schmid D.S., Tite J.P. & Ruddle N.H., 1986. DNA fragmentation: Manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting helper T-cell clones, and cell-free lymphotoxin-containing supernatant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**(6), 1881–1885.
- Schulte E., Schumacher U. & Schünke M., 2017. *Atlas d'anatomie Prométhée - Tome 3: Organes internes, Volume 3*, De Boeck Supérieur, 520.
- Segal A.W., 2008. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *Int J Biochem Cell Biol.* **40**(4), 604–618.
- Spieß P.E. et al., 2005. Malignant mesothelioma of the tunica vaginalis. *Urology* **66**(2), 397–401.
- Stansfield B.K. & Ingram D.A., 2015. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin. Transl. Med.* **4**, 1–10.
- Stewart J.H., Nguyen D.M., Chen G.A. & Schrupp D.S., 2002. Induction of apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells by activation of the Fas (Apo-1/CD95) death-signal pathway. *J. Thorac. Cardiovascular Surg.* **123**(2), 295–302.
- Suryanarayana Deo S. & Thejus T., 2013. Curative to palliative care-transition and communication issues: surgeons perspective. *Indian J. Palliat. Care* **19**(2), 120–123.
- Swierkosz T.A. et al., 1995. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br. J. Pharmacol.* **114**(7), 1335–1342.
- Szulkin A. et al., 2013. Variation in Drug Sensitivity of Malignant Mesothelioma Cell Lines with Substantial Effects of Selenite and Bortezomib, Highlights Need for Individualized Therapy. *PLoS One.* **8**(6), 1–14.
- Thanan R.S. and I.S.R. in N.D. and C. et al., 2015. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**(1), 193–217.
- Topham N.J. & Hewitt E.W., 2009. Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger? *Immunology* **128**(1), 7–15.
- Toyokuni S., 2014. Iron overload as a major targetable pathogenesis of asbestos-induced mesothelial carcinogenesis. *Redox Rep.* **19**(1), 1–7.
- Tracey K.J. & Cerami A., 1994. Tumor necrosis factor: A Pleiotropic Cytokine and

- Therapeutic Target. *Annu. Rev. Med.* **45**, 491–503.
- Tsikakos D., 2011. GC-MS and HPLC methods for peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup> and O15 NOO<sup>-</sup>) analysis: a study on stability, decomposition to nitrite and nitrate, laboratory synthesis, and formation of peroxynitrite from S-nitrosoglutathione (GSNO) and KO<sub>2</sub>. *Analyst*. **136**(5), 979–987.
- Vandermeers F. et al., 2009. Valproate, in Combination with Pemetrexed and Cisplatin, Provides Additional Efficacy to the Treatment of Malignant Mesothelioma. *Cancer Ther. Preclin.* **15**(8), 2818–2828.
- Vandermeers F. et al., 2013. The role of epigenetics in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* **81**, 311–318.
- Víteček J., Lojek A., Valacchi G. & Kubala L., 2012. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: Therapeutic potential and challenges. *Mediators Inflamm.* **2012**, 1–22.
- Wayteck L. et al., 2014. A personalized view on cancer immunotherapy. *Cancer Lett.* **352**(1), 113–125.
- Weder W. et al., 2004. Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Extrapleural Pneumonectomy in Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* **22**(17), 3451–3457.
- Wells P.G. et al., 2009. Oxidative stress in developmental origins of disease: Teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol. Sci.* **108**(1), 4–18.
- Wiseman D.A. & Thurmond D.C., 2012. The Good and Bad Effects of Cysteine S-nitrosylation and Tyrosine Nitration upon Insulin Exocytosis: A Balancing Act. *Curr. Diabetes Rev.* **8**(4), 303–315.
- Wiseman H. & Halliwell B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**, 17–29.
- Wong R.M. et al., 2014. Immunotherapy for Malignant Pleural Mesothelioma. Current Status and Future Prospects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**(5), 870–875.
- Xagorari A., Roussos C. & Papapetropoulos A., 2002. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *Br. J. Pharmacol.* **136**(7), 1058–1064.
- Yang H., Testa J.R. & Carbone M., 2008. Mesothelioma Epidemiology, Carcinogenesis and Pathogenesis. *Curr Treat Options Oncol.* **9**(2–3), 147–157.
- Yokota Y. et al., 2015. The bystander cell-killing effect mediated by nitric oxide in normal human fibroblasts varies with irradiation dose but not with radiation quality. *Int J Radiat Biol* **91**(5), 383–388.
- Zacharchuk C.M., Drysdale B., Mayer M.M. & Shin H.S., 1983. Macrophage-mediated cytotoxicity: Role of a soluble macrophage cytotoxic factor similar to lymphotoxin and tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **80**(20), 6341–6345.
- Zalcman G. et al., 2016. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **387**(10026), 1405–1414.