



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

T/NCY / Lach / 3.11
(Double)

2004/248

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE, SANTE, ENVIRONNEMENT



THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

Mention Biologie Cellulaire

présentée et soutenue publiquement

par

Frédéric MASSIN

Le 15 novembre 2004

**EXPRESSION DE TETRASPANINES ET D'INTEGRINES β 1,
ET IMMUNOMODULATION DANS LE CANCER DU
POUMON**

MEMBRES DU JURY

Directeur : Professeur MC BENE
Examineurs : Professeur GC FAURE
Docteur C BOUCHEIX
Rapporteurs : Professeur E SEILLES
Professeur J BERNARD

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury.

Madame Estelle Seilles et Monsieur Jacky Bernard qui ont accepté la tâche d'être rapporteurs de ce travail.

Monsieur Claude Boucheix qui a accepté d'examiner ce manuscrit et dont l'aide a permis sa réalisation.

Marie Christine Béné qui a encadré la réalisation de ce travail et Gilbert Faure qui m'a accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie également tous les membres du laboratoire, ainsi que les membres de l'EA 3443 qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Je remercie Eric Rubinstein qui a offert grand nombre des anticorps utilisés au cours cette étude.

Je tiens enfin à remercier ma famille au grand complet, composée et recomposée, ainsi que mes amis (ils se reconnaîtront) pour leur aide constante.



SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FICHES TECHNIQUES	7
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	8
1 Tétraspamines	9
1.1 Caractéristiques structurales et biochimiques	9
1.2 Distribution et fonctions	11
1.2.1 Généralités	11
1.2.2 Tétraspamines et cellules du système immunitaire	13
1.2.2.1 Tétraspamines et cellules de l'immunité innée	13
1.2.2.2 Tétraspamines et cellules de l'immunité adaptative	14
1.2.2.2.1 Tétraspamines et cellules présentatrices de l'antigène	14
1.2.2.2.2 Tétraspamines et cellules effectrices	15
1.2.2.2.2.1 Tétraspamines et cellules B	15
1.2.2.2.2.2 Tétraspamines et cellules T	16
1.2.3 Tétraspamines et cancer	18
2 La cascade métastatique	19
2.1 Invasion tumorale	22
2.1.1 Dissociation des cellules tumorales et différenciation	22
2.1.2 Migration active	25
2.1.2.1 Adhésion cellule-substrat	25
2.1.2.2 Protéolyse	28
2.1.2.3 Invasion tumorale : propriété temporaire	30
2.1.3 Induction de différenciation	30
2.2 Intravasation, arrêt des cellules tumorales et extravasation	31
2.3 Dormance tumorale	33
2.4 Manifestations cliniques de la métastase	33
3 Le cancer du poumon	34
TRAVAUX PERSONNELS	36
OBJECTIFS	37
RESULTATS	39
1. Comparaison des profils d'expression de tétraspamines et de l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ à la surface de cellules de lignées tumorales en fonction du mode de mise en suspension des cellules	39
2. Comparaison des profils d'expression de tétraspamines et de chaînes des intégrines à la surface de cellules de différentes lignées tumorales	44
3. Détermination du profil d'expression et de la localisation de tétraspamines et d'intégrines au niveau de cellules de lignées en conditions adhérentes	51
4. Détermination du profil d'expression et de la localisation de tétraspamines et de l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ au niveau de cellules saines	56
5. Expression des tétraspamines et de la chaîne $\beta 1$ des intégrines sur coupes à la congélation de tissus pulmonaires sains et tumoraux	60
6. Caractérisation de l'expression de la tétraspamine CD9 à la surface de cellules de lignées tumorales par immunoprécipitation	64

7. Comparaison de l'expression et de la localisation de tétraspanines et d'intégrines au niveau de cellules de la lignée tumorale A549 avec ou sans chélation des cations divalents	66
8. Comparaison des profils d'expression de tétraspanines et de chaînes des intégrines à la surface des cellules de la lignée tumorale A549 avec ou sans chélation des cations divalents	69
9. Sécrétion de cytokines par des cellules de lignées tumorales	72
10. Modulation de l'expression de tétraspanines et de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ à la surface de cellules de quatre lignées tumorales par quatre stimuli cytokiniques différents : TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-12	75
DISCUSSION	90
CONCLUSIONS – PERSPECTIVES.....	108
FICHES TECHNIQUES	111
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140
ARTICLES.....	157

LISTE DES ABREVIATIONS

BCR : B Cell Receptor

BSA : Bovine Serum Albumin

CD : Cluster de Différenciation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CRB : Centre de Ressources Biologiques

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

ECAM : Endothelial Cell Adhesion Molecule

ENA-78 : Epithelial Neutrophil-Activating 78

EST : Expressed Sequence Tag

FGF : Fibroblast Growth Factor

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

FS : Forward Scatter

GRO : Growth Related Oncogene

HLA : Human Leukocyte Antigen

HLDA : Human Leukocyte Differentiation Antigen

ICAM : Intracellular Cell Adhesion Molecule

Ig : Immunoglobuline

IFN : Interféron

IL : Interleukine

ILGF : Insulin Like Growth Factor

LCC : Large Cell Carcinoma

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MESF : Mean Equivalent of Soluble Fluorescein

MFI : Mean Fluorescence Intensity

MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein 1 α

MMP : Matrix MetalloProteinase

MT-MMP : Membrane Type MMP

NSCLC : Non Small Cell Lung Cancer
pro-MMP : pro-enzyme MMP
dNK : decidual Natural Killer cells
pNK : peripheral Natural Killer cells
PI3K : PhosphoInositol 3-OH Kinase
pro-uPA : pro-enzyme urokinase Plasminogen Activator
uPA : urokinase Plasminogen Activator
PAI : Plasminogen Activator Inhibitor
uPAR : urokinase Plasminogen Activator Receptor
PBS : Phosphate Buffered Saline
PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride
PVDF : PolyVinylidene Fluoride
RANTES : Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and presumably Secreted
SCLC : Small Cell Lung Cancer
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SS : Side Scatter
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TBS : Tris Buffered Saline
TCR : T Cell Receptor
Th1 : lymphocyte T helper de type 1
Th2 : lymphocyte T helper de type 2
TIMP : Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
TNF : Tumor Necrosis Factor
TS : Tissu Sain
TUM : Tumeur
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Schématisation de la structure des tétraspanines	10
Figure n°2 : Schématisation des différentes étapes de la cascade métastatique	21
Figure n°3 : Schématisation de la structure d'une cadhérine et des interactions avec le cytosquelette.....	23
Figure n°4 : Schématisation de la structure des intégrines	26
Figure n°5 : Représentation des différentes combinaisons $\alpha\beta$ des intégrines et de leurs ligands	26
Figure n°6 : Influence du mode de mise en suspension sur les cellules A549 et H596.....	42
Figure n°7 : Influence du mode de mise en suspension sur les cellules H661 et H2087.....	43
Figure n°8 : Expression de CD9 et de CD63 sur différentes lignées tumorales	47
Figure n°9 : Expression de CD81 et de CD82 sur différentes lignées tumorales	48
Figure n°10 : Expression de CD151 et de CD29 sur différentes lignées tumorales.....	49
Figure n°11 : Expression de CD49c sur différentes lignées tumorales	50
Figure n°12 : Marquages <i>in situ</i> des tétraspanines CD9, CD63 et CD151, et des chaînes CD29 et CD49c des intégrines.....	55
Figure n°13 : Marquages <i>in situ</i> des tétraspanines CD9, CD63, CD82 et CD151, et des chaînes CD29 et CD49c des intégrines	59
Figure n°14 : Expression de CD9 dans des tissus pulmonaires sains et tumoraux.....	63
Figure n°15 : Immunoprécipitation de la tétraspanine CD9 à partir des cellules des lignées pulmonaires tumorales A549, H596, H661, H2087.....	65
Figure n°16 : Marquages <i>in situ</i> de CD9, CD53, CD63, CD81, CD151 et Co-029 et des chaînes $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\beta 1$ des intégrines sur des cellules A549 adhérentes	68
Figure n°17 : Influence d'un chélateur sur l'expression de tétraspanines et d'intégrines à la surface des cellules A549.....	70
Figure n°18 : Etude de la sécrétion de différents facteurs par les cellules de 4 lignées tumorales d'origine pulmonaire par Cytokine array.	73
Figure n°19 : Histogrammes d'analyse en simple marquage en cytométrie de flux	117
Figure n°20 : Histogrammes d'analyse des billes de calibration Immuno-Brite.....	117
Figure n°21 : Histogrammes d'analyse du contenu en ADN en cytométrie de flux.....	139
Figure n°22 : Histogramme d'interprétation du cycle cellulaire	139

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Localisation cellulaire de tétraspanines et de chaînes des intégrines au niveau de cellules adhérentes de lignées tumorales.....	54
Tableau n°2 : Localisation cellulaire de tétraspanines et de chaînes des intégrines au niveau de cellules saines d'explants de trachée ou de larynx.....	58
Tableau n°3 : Données cliniques des patients étudiés.	61
Tableau n°4 : Ratios MESF des molécules étudiées exprimées par les cellules de la lignée A549 en présence ou non d'un chélateur.	71
Tableau n°5 : Récapitulatif des résultats obtenus lors de l'étude de la sécrétion de différents facteurs par les cellules de 4 lignées tumorales d'origine pulmonaire par Cytokine array.....	74
Tableau n°6 : Immunomodulation des cellules A549 par le TNF- α et l'IFN- γ	82
Tableau n°7 : Immunomodulation des cellules A549 par l'IL-10 et l'IL-12	83
Tableau n°8 : Immunomodulation des cellules H596 par le TNF- α et l'IFN- γ	84
Tableau n°9 : Immunomodulation des cellules H596 par l'IL-10 et l'IL-12	85
Tableau n°10 : Immunomodulation des cellules H661 par le TNF- α et l'IFN- γ	86
Tableau n°11 : Immunomodulation des cellules H661 par l'IL-10 et l'IL-12	87
Tableau n°12 : Immunomodulation des cellules H2087 par le TNF- α et l'IFN- γ	88
Tableau n°13 : Immunomodulation des cellules H2087 par l'IL-10 et l'IL-12	89

LISTE DES FICHES TECHNIQUES

Fiche technique n°1 : Culture cellulaire	112
Fiche technique n°2 : Cytométrie de flux.....	115
Fiche technique n°3 : Technique d'immunofluorescence indirecte visant à caractériser des tétraspanines et des intégrines à la surface de différentes lignées de cellules tumorales par cytométrie de flux.....	118
Fiche technique n°4 : Immunofluorescence indirecte sur cellules ou sur cytocentrifugats .	120
Fiche technique n°5 : Culture d'explants de trachée et de larynx.....	122
Fiche technique n°6 : Cytocentrifugation.....	123
Fiche technique n°7 : Classification T.N.M.....	124
Fiche technique n°8 : Immunofluorescence indirecte sur coupes à la congélation.....	129
Fiche technique n°9 : Immunoprécipitation.....	131
Fiche technique n°10 : Détermination du profil d'expression cytokinique	135
Fiche technique n°11 : Analyse du cycle cellulaire et compte de cellules.....	137



DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES



1 TETRASPANINES

La superfamille des tétraspanines a été découverte au début des années 1990 et regroupe à l'heure actuelle une trentaine de membres chez l'homme, dont une partie a été identifiée à l'aide de la banque de données EST (Expressed Sequence Tag). Certaines de ces molécules sont également présentes chez des organismes invertébrés tels que les schistosomes (Wright *et al.*, 1990, Fan *et al.*, 1997, 1998), les insectes (Kopczynski *et al.*, 1996 ; Todres *et al.*, 2000) et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Tomlinson et Wright, 1996). La distribution de ces molécules dans plusieurs espèces éloignées d'un point de vue phylogénétique suggère que les tétraspanines sont anciennes au regard de l'évolution et qu'elles pourraient jouer un rôle dans des fonctions biologiques majeures (Horejsi et Vlcek, 1991).

1.1 CARACTERISTIQUES STRUCTURALES ET BIOCHIMIQUES

Les tétraspanines constituent une famille de glycoprotéines de surface composées de 204 (NET-6) à 355 (oculospanin) acides aminés. Toutes ces molécules sont caractérisées par la présence de 4 domaines transmembranaires hydrophobes très conservés délimitant 2 régions extracellulaires hydrophiles de tailles inégales : une petite région extracellulaire (EC1) comprenant 20 à 28 acides aminés et une grande boucle extracellulaire (EC2) de 76 à 131 acides aminés (Wright et Tomlinson, 1994 ; Maecker *et al.*, 1997). Le modèle structural admis considère en effet que les extrémités N- et C-terminales courtes sont intracytoplasmiques (Figure n°1).

La famille des tétraspanines regroupe des antigènes de différenciation leucocytaires : **CD9** (Boucheix *et al.*, 1991 ; Lanza *et al.*, 1991 ; Miyake *et al.*, 1991), **CD37** (Classon *et al.*, 1989), **CD53** (Angelisova *et al.*, 1990 ; Amiot, 1990), **CD63** (Hotta *et al.*, 1988 ; Metzelaar *et al.*, 1991), **CD81** (Oren *et al.*, 1990 ; Imai et Yoshie, 1993), **CD82** (Imai *et al.*, 1992 ; Gaugitsch *et al.*, 1991 ; Dong *et al.*, 1995) et **CD151** (Fitter *et al.*, 1995) ; des antigènes initialement identifiés sur des tumeurs : **TALLA-1/CD231** (Takagi *et al.*, 1995), **Co-029** (Szala *et al.*, 1990) ou **SAS** (Jankowski *et al.*, 1994) et les tétraspanines identifiées dans la base de données EST (Todd *et al.*, 1998 ; Serru *et al.*, 2000).

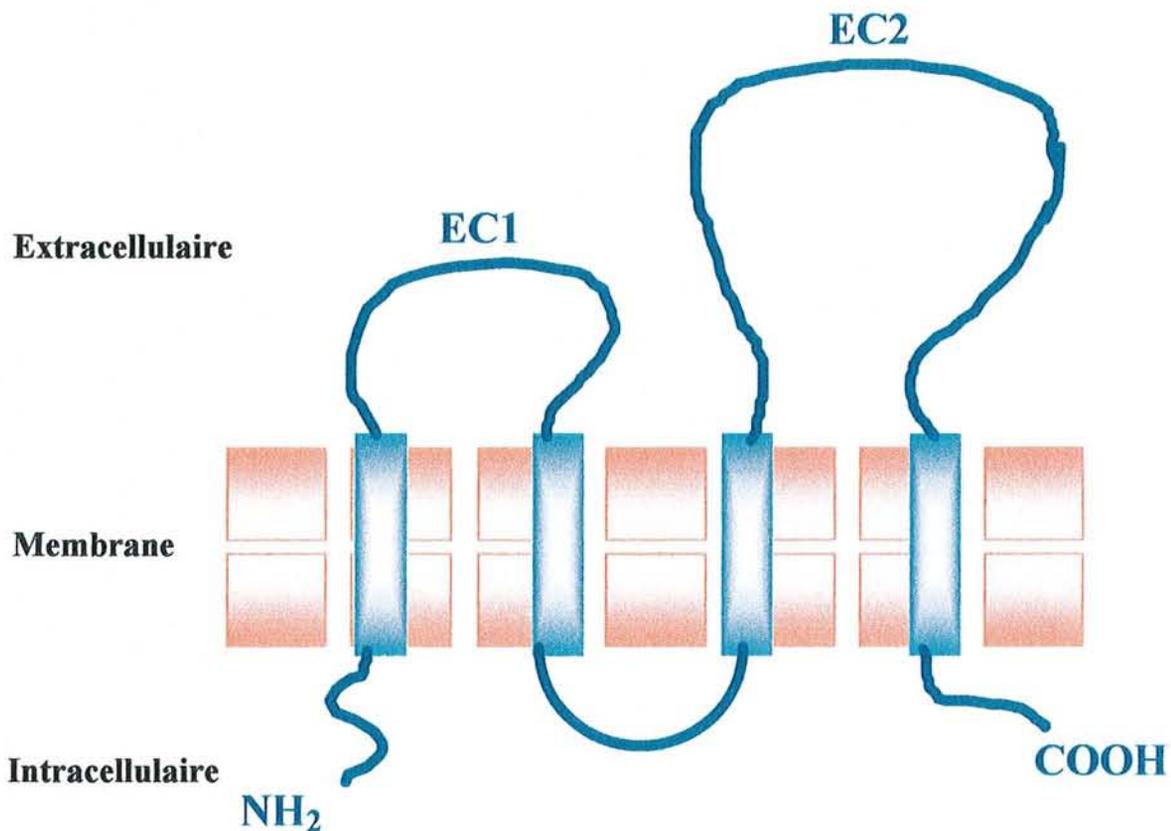


Figure n°1 : Schématisation de la structure des tétraspanines

Les tétraspanines sont caractérisées par 4 domaines hydrophobes transmembranaires reliés par des régions hydrophiles : deux boucles extracellulaires (20 à 28 acides aminés pour EC1 et 76 à 131 acides aminés pour EC2) et une boucle intracellulaire courte. Les extrémités N-terminale (NH_2) et C-terminale (COOH) sont courtes et intracellulaires.

D'autres molécules présentant une structure plus éloignée et peu d'homologie avec les tétraspanines citées précédemment peuvent être considérées comme faisant partie de cette superfamille. Il s'agit des uroplakines UP1a et UP1b (Yu *et al.*, 1994; Finch *et al.*, 1999), des protéines Rom-1 et RDS périphérique (Bascom *et al.*, 1992 ; Travis *et al.*, 1991). D'autres antigènes, tels il-TMP (Wice et Gordon, 1995) et L6 (Crosbie *et al.*, 1997), présentant aussi une structure à 4 domaines transmembranaires, mais des différences d'homologie avec les autres tétraspanines, pourraient être considérés comme faisant partie d'une autre superfamille.

La masse moléculaire des tétraspanines est comprise entre 24 kDa (CD9) et 80 kDa (CD82), mais peut varier en fonction de la glycosylation de ces protéines. La plupart des tétraspanines possèdent des régions consensus de N-glycosylation au niveau de la grande boucle extracellulaire (EC2) (Maecker *et al.*, 1997), alors que CD9 possède un site de glycosylation dans la région EC1 (Boucheix *et al.*, 1991).

1.2 DISTRIBUTION ET FONCTIONS

1.2.1 Généralités

Les tétraspanines sont présentes à la surface de nombreux types cellulaires, à des niveaux d'expression variables, sans pour autant être ubiquitaires. Les cellules endothéliales expriment ainsi les tétraspanines CD9, CD81 et CD151 à leur surface, co-localisées avec des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ au niveau des contacts intercellulaires (Yanez-Mo *et al.*, 1998 ; Klein-Soyer *et al.*, 2000). CD63 est également exprimée par ces cellules, mais avec une localisation intracellulaire dans les compartiments lysosomaux et dans les corps de Weibel-Palade (Yanez-Mo *et al.*, 1998 ; Klein-Soyer *et al.*, 2000 ; Kobayashi *et al.*, 2000 ; Michaux et Cutler, 2004). Toutes les cellules semblent exprimer plusieurs tétraspanines (Boucheix *et al.*, 1985 ; Shaw, 1994; Sincock *et al.*, 1997, 1999), à l'exception des érythrocytes, bien qu'une étude récente montre que CD151 est exprimée à la surface de ces cellules et de leurs progéniteurs (Karamatic-Crew *et al.*, 2004). Certaines tétraspanines présentent une large distribution, alors que d'autres présentent un profil d'expression plus restreint. C'est le cas de CD37 et de CD53 qui ne sont retrouvées que sur des cellules du système hématopoïétique (Schwartz-Albiez *et al.*, 1988 ; Maecker *et al.*, 1997).

Les tétraspanines forment, à la surface cellulaire, des complexes multimoléculaires en association à des molécules partenaires qui peuvent être d'autres membres de la famille des

tétraspanines, mais également des membres de la famille des intégrines, des molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines ou des antigènes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) (Boucheix et Rubinstein, 2001). Ce réseau multimoléculaire qualifié de "réseau tétraspanines" (Rubinstein *et al.*, 1996) pourrait être modélisé selon une organisation par niveaux, en fonction des interactions unissant les partenaires, déterminées expérimentalement en fonction des détergents nécessaires à la dissociation des complexes. Le premier niveau ferait intervenir des interactions fortes où chaque tétraspanine forme des complexes primaires avec un nombre limité de molécules partenaires (Serru *et al.*, 1999 ; Charrin *et al.*, 2001). Deux exemples de complexes primaires peuvent être donnés avec les complexes impliquant CD151 et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, et celui impliquant CD9 et CD9P-1 (Charrin *et al.*, 2001 ; Yauch *et al.*, 2000 ; Lozahic *et al.*, 2000). Le deuxième niveau pourrait consister en l'association de plusieurs complexes primaires par l'intermédiaire d'interactions tétraspanine / tétraspanine afin de former des complexes de plus grande taille. Un troisième niveau d'interactions pourrait exister puisque un certain nombre de molécules associées peuvent être observées après utilisation de détergents encore plus doux que le Brij97 (Claas *et al.*, 2001). Dans le réseau tétraspanines, les tétraspanines joueraient un rôle pivot dans l'orientation des fonctions des molécules qui leur sont associées.

Parmi les interactions faisant intervenir des tétraspanines, les plus documentées sont leurs associations avec les membres de la famille des intégrines $\beta 1$. Ces interactions ont été observées sur de nombreux types cellulaires, et notamment au niveau de cellules hématopoïétiques (Berditchevski, 2001). Les tétraspanines associées aux intégrines $\beta 1$ interviennent ainsi dans des fonctions cellulaires telles que la migration, l'adhésion, la transduction de signaux.

Parmi les fonctions dans lesquelles les tétraspanines sont impliquées, on trouve, la croissance, le développement cellulaire, l'adhésion, l'activation et la motilité cellulaire (Wright et Tomlinson, 1994 ; Boucheix et Rubinstein, 2001). Ces différentes fonctions interviennent dans les réponses immunitaires, ainsi que dans l'invasion tumorale. La localisation cellulaire des tétraspanines n'est pas uniquement membranaire, et certaines d'entre elles sont également retrouvées au niveau d'organites intracellulaires.

La première tétraspanine à avoir été découverte est la molécule CD9, originellement mise en évidence à la surface de cellules de leucémie aiguë lymphoblastique lors du premier Atelier International « Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) » (Paris, 1982). Depuis, l'expression d'une vingtaine de membres de la famille a été mise en évidence à la

surface des leucocytes (Tarrant *et al.*, 2003) et montrée comme présentant un rôle actif dans différents mécanismes de la réponse immunitaire.

1.2.2 Tétraspamines et cellules du système immunitaire

1.2.2.1 Tétraspamines et cellules de l'immunité innée

Une localisation dans des granules de stockage de cellules hématopoïétiques a été montrée pour la tétraspamine CD63 dans les polynucléaires neutrophiles (Skubitz *et al.*, 2000), basophiles (Amano *et al.*, 2001) et éosinophiles (Mahmudi-Azer *et al.*, 2002). Des anticorps dirigés contre CD151 et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ inhibent la migration *in vitro* des polynucléaires neutrophiles suggérant un rôle clé dans la motilité cellulaire (Yauch *et al.*, 1998).

La phagocytose de pathogènes par des macrophages est améliorée par l'opsonisation de ces antigènes par des IgG et leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques du fragment Fc des immunoglobulines (Fc γ Rs). Cette reconnaissance des complexes immuns par les FcRs entraîne une réorganisation du cytosquelette qui joue un rôle important non seulement dans l'internalisation des complexes, mais également dans l'activation ou la stabilisation des molécules d'adhésion intervenant dans le chimiotactisme et l'invasion des monocytes/macrophages au niveau des sites inflammatoires. Kaji *et al.* (2001) montrent que le co-cross-linking de CD9 avec les Fc γ Rs induit une activation des macrophages, associée à une extension des filopodes et à une agrégation cellulaire, suggérant que CD9 pourrait moduler les signaux de phagocytose et les réponses inflammatoires.

Les cellules NK font également partie de l'immunité innée et expriment certaines tétraspamines avec un profil différent selon leur origine et leur fonction. Koopman *et al.* (2003) montrent l'expression de membres de la famille des tétraspamines au niveau de cellules NK déciduales (dNK) et du sang périphérique (pNK). Les tétraspamines CD9, CD53, CD63 et CD151 sont ainsi surexprimées dans le cas des cellules NK déciduales, par comparaison aux cellules NK circulantes. La surexpression de ces tétraspamines est associée à celle de membres de la famille des intégrines et suggère leur implication dans les mécanismes de migration des cellules dNK. De plus, CD9 et CD151 présentent une expression membranaire exclusive sur les dNK, les pNK en étant dépourvues. CD9, en association avec son ligand placentaire PSG-17, pourrait permettre la production de cytokines impliquées dans le maintien de la grossesse.

1.2.2.2 Tétraspamines et cellules de l'immunité adaptative

1.2.2.2.1 Tétraspamines et cellules présentatrices de l'antigène

L'induction d'une réponse immunitaire adaptative nécessite la présentation de peptides antigéniques aux lymphocytes T. Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) majeures du système immunitaire et sont les seules CPA capables d'activer les cellules T naïves. L'expression des tétraspamines au niveau de ces cellules reste à l'heure actuelle sujet à controverse.

Engering *et al.*, (2001, 2003) ont montré que différentes tétraspamines sont associées aux molécules de classe II du CMH à différents niveaux cellulaires. Ainsi, CD9, CD53, CD63 et CD81 pourraient être impliquées dans la régulation de la distribution de ces molécules au niveau des cellules dendritiques humaines. CD63, qui est associée à ces molécules CMH-II exclusivement dans des compartiments intracellulaires dans les cellules immatures et de façon prédominante dans les cellules dendritiques matures, pourrait après modification post-translacionnelle participer aux changements morphologiques de ces compartiments au cours de la maturation des cellules dendritiques. Cette tétraspamine pourrait ainsi fonctionner comme une molécule chaperonne impliquée dans la protection des protéines membranaires contre leur dégradation. Les molécules de classe II du CMH seraient ainsi transportées, associées à CD63, jusqu'à la membrane. Hammond *et al.*, (1998) montrent, au niveau de lignées de cellules B (human B lymphoblastoid cell line), la co-localisation de CD63 dans les compartiments enrichis en CMH-II, avec une autre tétraspamine, CD82 et HLA-DM. Dans les phagolysosomes, un changement de partenaire tétraspamine surviendrait alors en vue de la présentation de peptides associée fonctionnellement aux cellules dendritiques matures. Si Engering *et al.* n'ont pas clairement observé l'expression de CD63 à la surface des cellules dendritiques, Mantegazza *et al.* (2004) ont montré l'expression de cette tétraspamine, ainsi que celle des tétraspamines CD9, CD81, CD82 et CD151 à la surface de cellules dendritiques immatures et matures sans variation d'expression au cours de la maturation cellulaire. Ces auteurs confirment l'expression de CD63 dans des compartiments intracellulaires et observent également celle de CD82 au niveau cytoplasmique. L'engagement des tétraspamines CD9, CD63, CD81 et CD82 par des anticorps spécifiques se traduit par une augmentation de la capacité migratoire des cellules, caractéristique également associée aux phases tardives de la maturation des dendritiques.

Théry *et al.* (1999) ont montré l'expression de la tétraspanine CD9 à la surface d'exosomes issus de cellules dendritiques suggérant un rôle dans les interactions avec les cellules T. De plus, Morelli *et al.* (2004) ont montré que l'expression de CD9 et de CD81, en association avec des intégrines (CD11a (α L), CD51 (α V) et CD61 (β 3)) à la surface d'exosomes, issus de cellules dendritiques, est nécessaire à la capture de ces exosomes par d'autres cellules dendritiques.

A la surface des cellules dendritiques matures, le complexe tétraspanines (CD9, CD53, CD81 et CD82) – molécules de classe II du CMH est enrichi d'une molécule de co-stimulation (CD86). Par contre ce complexe n'est pas retrouvé à la surface des cellules dendritiques immatures, ce qui pourrait expliquer leur faible capacité à stimuler les cellules T (Kropshofer *et al.*, 2002).

De façon comparable, dans les cellules B, CD63 et CD82 sont associées avec les molécules de classe II du CMH HLA-DM (impliquée dans la libération du sillon présentoir par captation de CLIP) et HLA-DO dans des compartiments intracellulaires (Hammond *et al.*, 1998). Escola *et al.* (1998) ont, de plus, mis en évidence la localisation des tétraspanines CD63, CD37, CD53, CD81 et CD82 dans les exosomes sécrétés par des cellules B, ainsi que celle de molécules de classe II du CMH et du facteur de co-stimulation CD86. Ces données suggèrent l'implication des tétraspanines dans la présentation de l'antigène et dans l'activation des cellules T.

1.2.2.2 Tétraspanines et cellules effectrices

1.2.2.2.1 Tétraspanines et cellules B

La contribution des tétraspanines la plus étudiée dans la biologie des cellules B est la participation de CD81 à un complexe de transduction de signaux lié directement à CD19 et Leu13 et indirectement via CD19 à CD21 (Bradbury *et al.*, 1992,1993 ; Matsumoto *et al.*, 1993). Ce complexe joue un rôle important de co-stimulation dans l'activation des cellules B. Cette association permet de diminuer le seuil d'activation de lymphocytes B suite à la captation d'un antigène par le BCR (B Cell Receptor). Physiologiquement, CD19 doit être engagé par liaison à un antigène opsonisé par le complément à la fois au BCR, récepteur de l'antigène, et à CD21, récepteur de C3b. Ainsi, le complexe CD19/BCR/CD21 lie immunité innée et immunité adaptative (Fearon *et al.*, 1995). CD81 permettrait de stabiliser ce complexe (Dykstra *et al.*, 2003) et/ou d'amplifier l'adhésion cellule-cellule lors du contact B-

T subséquent, et la réponse générée par l'engagement de CD19 (Levy *et al.*, 1998). Des souris déficientes en CD81 présentent effectivement des taux d'immunoglobulines sériques faibles, des réponses anticorps T-dépendantes altérées et une expression diminuée de CD19 à la surface des cellules B (Maecker et Levy, 1997 ; Miyazaki *et al.*, 1997 ; Tsitsikov *et al.*, 1997).

CD81 n'est pas la seule tétraspanine associée à CD19. Horvath *et al.* (1998) ont, en effet, montré que deux autres molécules de cette famille, CD9 et CD82, sont également associées à CD19, suggérant un lien entre le complexe fonctionnel CD19/BCR/CD21 et le réseau tétraspanine dans les cellules B.

L'implication de ces tétraspanines dans ce complexe pourrait suggérer leur intervention dans les processus d'activation des cellules B en réponse à un antigène et/ou à la capture antigénique en vue de sa présentation par les molécules HLA de classe II.

Le Naour *et al.* (2004) ont de plus montré, par des techniques d'immunoprécipitation, que les IgM membranaires sont associées à des tétraspanines (CD53 et CD81) à la surface de cellules B.

Le cross-linking de la tétraspanine CD81 à la surface de cellules B humaines provoque une adhésion $\alpha 4\beta 1$ dépendante de ces cellules au stroma du tissu amygdalien (Behr et Schriever, 1995).

Le rôle de CD37 dans l'immunité humorale est soutenu par le fait que les réponses anticorps T-dépendantes sont altérées chez des souris déficientes en CD37 (Knobeloch *et al.*, 2000). Le rôle de CD37 est différent de celui de CD81 puisque l'expression de CD19 sur les cellules B de ces souris est normale. Un anticorps anti-CD37 entraîne par contre une modification de la prolifération des cellules B (Ledbetter, 1987). Ces données suggèrent un rôle important de cette molécule dans la fonction des cellules B.

Lors de l'expression ectopique de CD9 à la surface de cellules B, cette molécule s'associe aux intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ et augmente la migration cellulaire, en même temps que l'activation des protéines tyrosine kinases (Shaw *et al.*, 1995).

1.2.2.2.2 Tétraspanines et cellules T

L'activation des lymphocytes T nécessite à la fois la présentation de l'antigène par une CPA avec engagement du TCR (T Cell Receptor), mais également la présence de molécules de co-stimulation. Les tétraspanines pourraient jouer un rôle important dans ces mécanismes d'activation puisque plusieurs auteurs ont montré leur association avec de telles molécules. Toyo-oka *et al.* (1999) ont ainsi montré que CD9 est associée au TCR (CD3), au co-récepteur

(CD4), et à des molécules de co-stimulation, notamment CD2 et CD5. CD81 apparaît aussi associée à CD5. CD2 a également été montrée comme associée à la tétraspanine CD9 par Bell *et al.* (1992), CD3, CD4 avec CD9, CD81 et CD82 (Todd *et al.*, 1996 ; Imai *et al.*, 1993) et CD8 avec CD81 et CD82 (Todd *et al.*, 1996 ; Imai *et al.*, 1993).

L'engagement de ces tétraspanines engendre un signal de co-stimulation du lymphocyte T dont le mécanisme est différent de celui engendré par la voie classique de CD28 (Tai *et al.*, 1996 ; Witherden *et al.*, 2000) ou de celui engendré par les molécules de co-stimulation associées au réseau tétraspanines telles que les intégrines $\beta 1$ (Iwata *et al.*, 2002). De plus, le cross-linking de CD9 ou CD81 avec CD28 a un effet synergique sur les signaux de co-stimulation (Witherden *et al.*, 2000).

Les tétraspanines peuvent également avoir un rôle dans l'orientation des réponses immunitaires. Lebel-Binay *et al.* (1995) ont ainsi montré que l'engagement de CD3 et de CD82 aboutit à la production d'IL-2 (Interleukine-2) par des cellules Jurkat, suggérant un rôle pour cette tétraspanine dans la régulation des réponses Th1 et Th2. Il a de plus été montré que la signalisation par CD81 au niveau des cellules T a un effet sur la balance Th1/Th2. Dans des cultures de cellules T CD4⁺ et B de patients allergiques, la stimulation de CD81 par un anticorps spécifique se traduit par une augmentation de la production d'IL-4 par les cellules T (Maecker *et al.*, 1998 ; Secrist *et al.*, 1996). De même, des souris n'exprimant pas CD81 présentent une réponse immune Th2 et humorale altérée (Maecker et Levy, 1997). Maecker (2003) a plus récemment montré que la production des cytokines Th1 et Th2 est augmentée par une co-stimulation de CD81. Cependant, au cours d'une stimulation prolongée des cellules T par l'antigène, une co-stimulation des cellules T par CD81 se traduit par une augmentation de la production d'IL-4 via une induction augmentée de la prolifération des cellules Th2.

L'importance des tétraspanines dans la biologie des cellules T a également été mise en évidence grâce à des souris déficientes pour certaines d'entre elles. Il a ainsi été montré que des souris déficientes en CD81 (Miyazaki *et al.*, 1997), CD37 ou Tssc6 (Tarrant *et al.*, 2002) présentaient des cellules T avec une capacité proliférative amplifiée suite à l'engagement du complexe CD3-TCR *in vitro*. Ces données suggèrent que les tétraspanines pourraient avoir au niveau des cellules T un rôle direct de signaux d'activation et un rôle dans la régulation de la prolifération de ces cellules.

Clark *et al.* (2001) ont également montré l'association de CD81 avec EWI-2, une molécule appartenant à la superfamille des immunoglobulines, à la surface de cellules de lignées T.

1.2.3 Tétraspanines et cancer

Outre l'implication des tétraspanines dans les mécanismes des réponses immunitaires, ces molécules interviennent également dans les mécanismes de progression et d'invasion tumorales, où elles sont impliquées dans des complexes moléculaires notamment avec leurs partenaires intégrines. De nombreuses études montrent le rôle critique des intégrines dans le développement tumoral, l'invasion et le processus métastatique (Hemler *et al.*, 1996 ; Keely *et al.*, 1998 ; Boudreau et Bissell, 1998 ; Friedl et Brocker, 2000). Cependant, étant donné la multitude de molécules associées aux tétraspanines, leur contrôle de la progression tumorale ne peut pas être limité à leur interaction avec les intégrines.

Trois membres de la famille des tétraspanines, CD9, CD82 et CD63, ont été montrés comme associés au potentiel métastatique de tumeurs solides.

CD9 inhibe la motilité de cellules d'adénocarcinome du poumon après engagement par un anticorps monoclonal spécifique (Miyake *et al.*, 1991). De plus, la transfection de CD9 dans des lignées de cellules de cancer du poumon humain entraîne une inhibition de leur motilité (Ikeyama *et al.*, 1993). A l'inverse, une expression génique réduite de CD9 est corrélée à un mauvais pronostic chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (Higashiyama *et al.*, 1995, 1997) et son expression est inversement corrélée au processus de métastase et à un mauvais pronostic chez des patientes atteintes de cancer du sein (Miyake *et al.*, 1995, 1996).

CD82 est considérée depuis 1995 comme suppresseur du processus de métastase (Dong *et al.*, 1995). Son expression semble être diminuée lors de la progression tumorale dans le cancer colorectal (Lombardi *et al.*, 1999), le cancer gastrique (Hinoda *et al.*, 1998), le cancer de la prostate (Dong *et al.*, 1996) et le cancer du sein (Huang *et al.*, 1998), et corrélée à un bon pronostic dans le cancer du poumon non à petites cellules (Adachi *et al.*, 1996). L'expression de CD82 a été montrée comme diminuant le potentiel invasif *in vitro* et métastatique *in vivo* de cellules de cancer du sein (Yang *et al.*, 2001), de cancer du colon (Takaoka *et al.*, 1998a) et de mélanome (Takaoka *et al.*, 1998b). Récemment, Zhang *et al.* (2003) ont montré l'association de CD82 avec la molécule EWI2, membre de la superfamille des immunoglobulines. Cette association semble jouer un rôle important dans l'inhibition de la migration cellulaire de cellules tumorales.

L'expression à la surface cellulaire de CD63 a été montrée comme étant réduite dans les stades avancés de mélanome malin par rapport aux stades plus précoces où CD63 est fortement exprimée (Hotta *et al.*, 1988).

Ces trois membres de la famille des tétraspanines peuvent être considérés comme des suppresseurs du processus métastatique puisqu'ils interviennent dans sa régulation négative. D'autres membres de cette famille pourraient présenter un rôle contraire. Kanetaka *et al.* (2001) montrent que l'expression de CD9 et CD82 est réduite dans les cellules de carcinome hépatocellulaire présentant une diffusion intrahépatique, alors que la tétraspanine Co-029 est surexprimée dans ces cellules. La transfection de Co-029 dans des cellules de lignées de carcinome pancréatique de rat faiblement métastatiques augmente leur capacité à former des métastases (Claas *et al.*, 1998). L'expression de Co-029 semble donc jouer un rôle dans la progression tumorale. De même, Testa *et al.* (1999) ont montré dans des carcinomes que l'expression élevée de CD151 leur conférerait un phénotype pro-migratoire.

2 LA CASCADE METASTATIQUE

Le processus de métastase tumorale est un processus dynamique complexe impliquant à la fois des interactions des cellules tumorales entre elles et des interactions entre les cellules tumorales et le tissu hôte. Le processus de métastase tumorale peut être sous divisé en un certain nombre d'étapes biologiques séquentielles dont la régulation n'est pas encore exactement comprise (Figure n°2).

La première étape de ce processus est caractérisée par la dissociation de cellules tumorales de la tumeur primaire. Ces cellules tumorales infiltrent alors activement le stroma environnant dans une étape qualifiée d'invasion et pénètrent le système vasculaire ou lymphatique dans une étape qualifiée d'intravasation. Elles sont ensuite distribuées de façon passive par le courant vasculaire ou lymphatique vers les organes distants où elles sont arrêtées par leur taille dans les plus petits vaisseaux. Les cellules quittent les vaisseaux dans une étape qualifiée d'extravasation et envahissent l'organe cible. Cette dernière étape d'invasion n'aboutit pas forcément à l'apparition de métastases détectables puisque les cellules tumorales peuvent, soit être éliminées par le système immunitaire, soit rester "silencieuses" pendant des périodes de temps variables. Cet état est qualifié de dormance tumorale. Les cellules ou les petites masses tumorales dormantes peuvent être stimulées par des facteurs environnementaux après un certain laps de temps et augmenter leur activité proliférative afin d'établir des masses tumorales secondaires détectables.

La cascade métastatique est donc un processus multi étapes et la formation de métastases n'est effective que lorsqu'une cellule est capable de survivre à toutes les étapes de

cette cascade. Cependant, seul un faible nombre de cellules réussissent à franchir les différents obstacles suggérant que le processus métastatique au regard d'une seule cellule tumorale pourrait être considéré comme inefficace. Cependant, la répétition de la cascade métastatique fournit le nombre de cellules tumorales nécessaires au franchissement des différentes barrières et à la formation de métastases détectables.

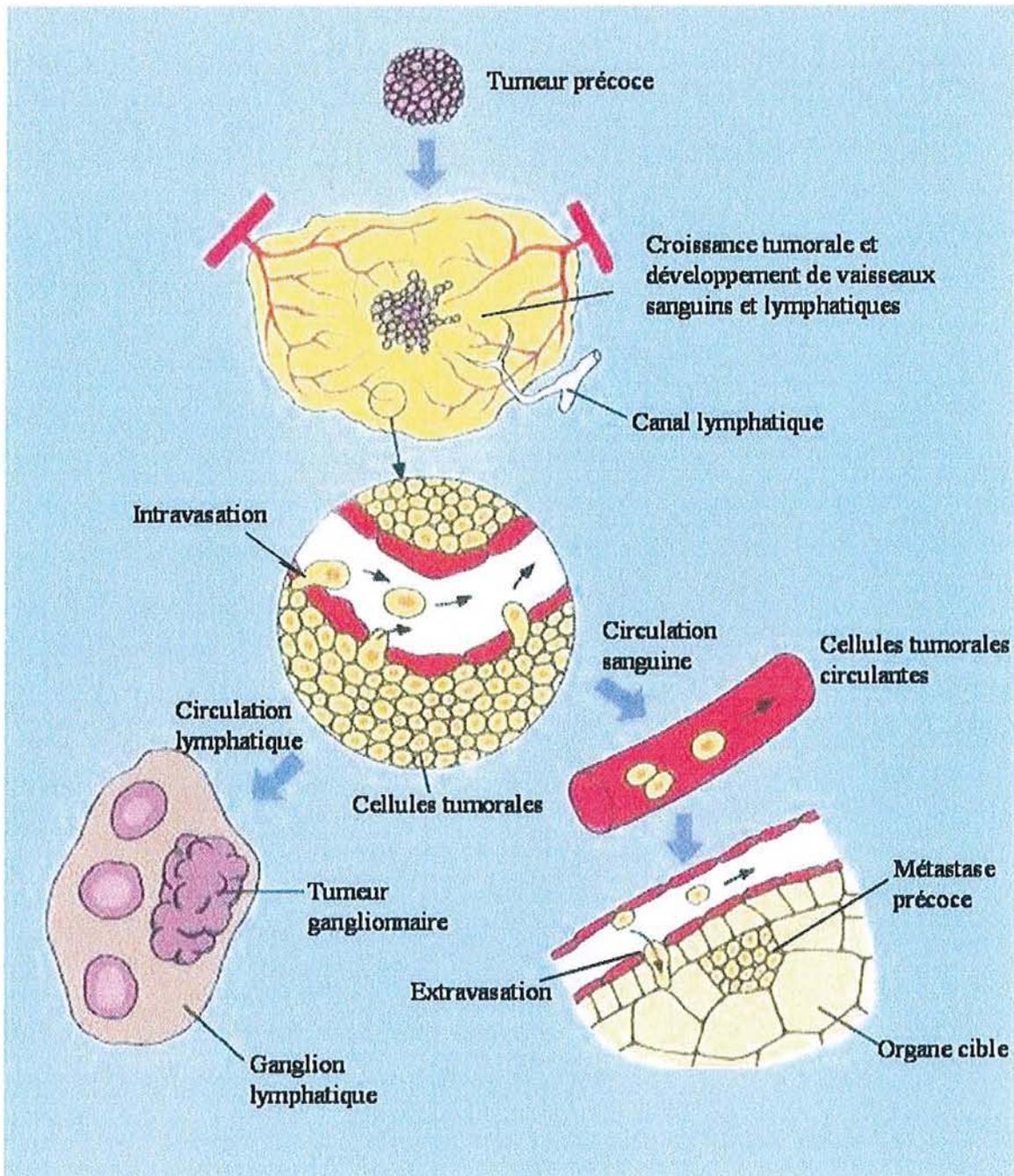


Figure n°2 : Schématisation des différentes étapes de la cascade métastatique

http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/erbitux/images/3_Tumour_Spread_Mechanisms.jpg

2.1 INVASION TUMORALE

L'étape initiale clé à la formation de métastases est le processus d'invasion par les cellules tumorales du tissu hôte adjacent. Cette propriété biologique nécessite la dissociation de cellules tumorales de la tumeur primaire et des interactions complexes avec le tissu environnant. Des modifications des interactions intercellulaires entre cellules tumorales et des interactions entre cellules tumorales et matrice extracellulaire (MEC), ainsi qu'une étape de protéolyse sont nécessaires afin que les cellules dissociées puissent migrer de façon active.

2.1.1 Dissociation des cellules tumorales et différenciation

La faculté des cellules tumorales à se dissocier et à migrer dépend fortement de leur degré de différenciation. Ceci est montré par le fait que dans le cas de tumeurs malignes, un arrêt de différenciation est observé au niveau du front d'invasion *in vivo*, amenant au détachement de cellules tumorales individuelles ou de petits agrégats de cellules tumorales à partir de la tumeur primaire, qui envahissent le tissu hôte adjacent (Gabbert *et al.*, 1985). L'intérêt clinique de la dissociation des cellules tumorales a été établi en montrant sa valeur pronostique. Ainsi, dans une étude de 445 patients présentant un cancer gastrique, une analyse multivariée a montré que le pronostic vital de ces patients diminuait lorsque la dissociation des cellules tumorales augmentait au niveau du front d'invasion (Gabbert *et al.*, 1992).

D'un point de vue moléculaire, la dissociation des cellules tumorales nécessite la perte des liaisons intercellulaires homotypiques qui sont médiées par des molécules d'adhésion et notamment celles de la superfamille des cadhérines (Figure n°3).

Cette superfamille comporte environ 80 membres impliqués dans l'adhésion cellulaire calcium dépendante (Gooding *et al.*, 2004). Parmi les cadhérines, la E-cadhérine (epithelial-specific cadherin) est impliquée à la fois dans des interactions cellulaires homo- et hétérotypiques. C'est une glycoprotéine transmembranaire de 120 kDa exprimée à la surface basolatérale des cellules épithéliales. La région extracellulaire de cette molécule permet la formation de contacts d'adhésion homotypiques à des E-cadhérines portées par d'autres cellules adjacentes, alors que la queue intracytoplasmique permet la liaison au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un complexe avec les α , β et γ caténines.

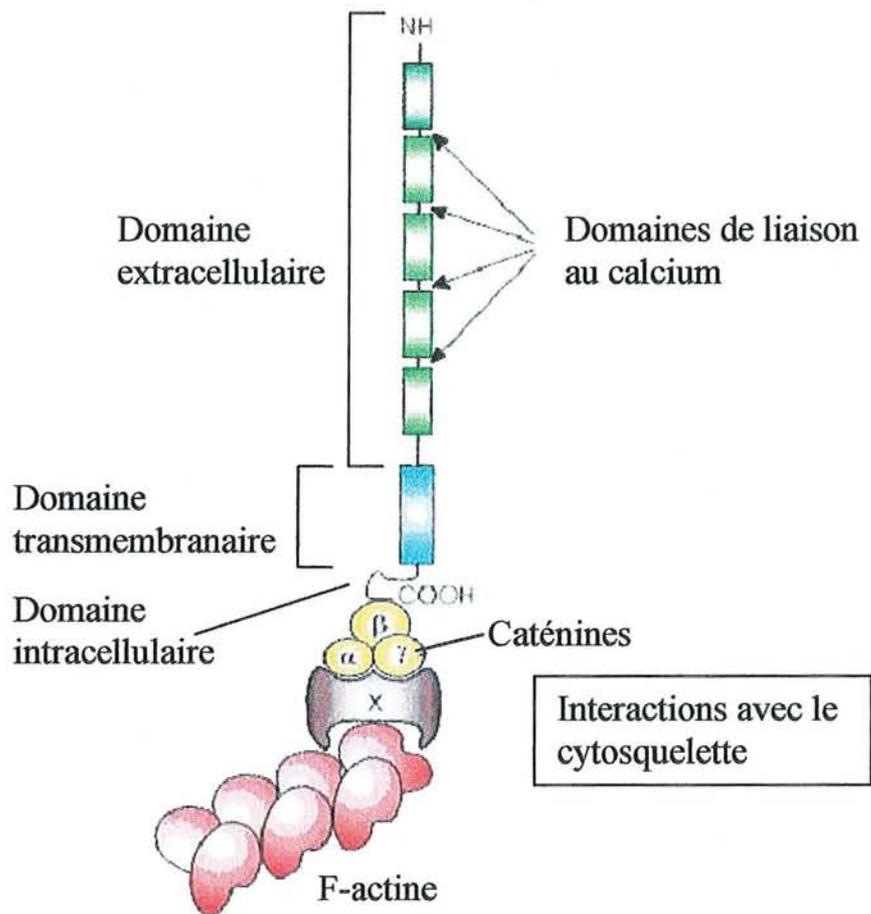


Figure n°3: Schématisation de la structure d'une cadhérine et des interactions avec le cytosquelette

<http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio315/Lectures/CAMS2/Cadherin.jpg>

La perte d'expression de la E-cadhérine a été montrée comme jouant un rôle dans la transformation d'adénome à carcinome dans le cancer du colon et à l'acquisition de la capacité métastatique (Perl *et al.*, 1998). La restauration de cette expression a un effet suppresseur sur la prolifération et la motilité des cellules tumorales (Vleminckx *et al.*, 1991). Le complexe cadhérine-caténines semble ainsi être impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, l'invasion et la signalisation intracellulaire durant la progression tumorale.

Plusieurs mécanismes moléculaires tels que des mutations, une hyperméthylation ou une répression transcriptionnelle, peuvent être à l'origine de la perte d'expression de la E-cadhérine. De même, des mutations des caténines peuvent empêcher les interactions avec les cadhérines et ainsi perturber la stabilité des contacts intercellulaires et augmenter la mobilité cellulaire (Conacci-Sorell *et al.*, 2002).

De nombreuses études ont montré qu'*in vivo*, les niveaux d'expression de la E-cadhérine ou des caténines évalués par immunohistochimie sont inversement corrélés avec la dissociation des cellules tumorales et qu'une expression réduite est associée à un mauvais pronostic pour les patients (Birchmeier et Behrens, 1994 ; Gabbert *et al.*, 1996 ; Nakanishi *et al.*, 1997).

En plus des interactions homotypiques, les cadhérines semblent être impliquées dans des interactions hétérotypiques et notamment avec des membres de la famille des intégrines (Gooding *et al.*, 2004).

De nombreuses études montrent la localisation des tétraspanines au niveau des contacts intercellulaires (Fitter *et al.*, 1999 ; Yanez-Mo *et al.*, 2001).

In vivo, la tétraspanine CD151 et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ ont été montrées comme co-exprimées dans un certain nombre de cellules épithéliales, et notamment dans des kératinocytes de la peau et dans des cellules épithéliales de rein (Sterk *et al.*, 2000, 2002). Wang *et al.* (1999) ont montré que des cellules épithéliales de canaux collecteurs déficientes en $\alpha 3\beta 1$ présentaient une association réduite du complexe cadhérine-caténine / α actinine. Chattopadhyay *et al.*, (2003) montrent que l'association CD151- $\alpha 3\beta 1$ permet l'association du complexe cadhérine-caténine avec le cytosquelette d'actine et l'adhésion cellule-cellule médiée par les cadhérines. Shigeta *et al.* (2003) montrent de plus que CD151 régulerait l'adhésion cellule-cellule par une réorganisation du cytosquelette d'actine PKC- et Cdc42-dépendante.

2.1.2 Migration active

La capacité des cellules tumorales à migrer de façon active est un pré-requis à l'invasion du tissu hôte et de la MEC par ces cellules. Cette migration est un processus cyclique multi étape. Les cellules étendent une extrémité (pseudopode, lamellipode) qui adhère au substrat au moyen de récepteurs spécifiques. Des forces sont alors exercées de façon à tirer cette partie de la cellule en avant. Des contractions ultérieures accompagnées par la libération des récepteurs d'adhésion à l'arrière de la cellule permettent le déplacement de celle-ci. Ces récepteurs d'adhésion sont recyclés par endocytose et transport vésiculaire et/ou dirigés vers l'avant de la cellule à la surface cellulaire (Sheetz *et al.*, 1999).

Il apparaît ainsi que l'inhibition de la migration active constitue une approche prometteuse dans l'inhibition de l'invasion tumorale et de la métastase. Malgré des résultats encourageants *in vitro*, l'inhibition effective de la migration des cellules tumorales et de la formation ultérieure de métastases semble bien plus délicate.

2.1.2.1 Adhésion cellule-substrat

Les cellules tumorales doivent établir des contacts temporaires avec la MEC de façon à migrer au travers de celle-ci. Ces interactions avec la MEC sont médiées par des récepteurs cellulaires de surface spécifiques d'un substrat. Parmi ces récepteurs, se trouvent des molécules de la famille des intégrines (Figure n°4), qui regroupe plus de 20 membres. Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires composés d'une sous unité α et d'une sous unité β . Chaque combinaison $\alpha\beta$ possède sa propre spécificité de liaison, mais la plupart des intégrines peuvent se lier à plusieurs composants de la MEC (Figure n°5). De même, certaines protéines de la matrice, telles que la laminine, la fibronectine, le collagène et la vitronectine se lient à plusieurs intégrines. Les intégrines ne constituent pas seulement des liens mécaniques entre les cellules et leur matrice environnante, elles interviennent aussi dans la transduction de signaux et influencent différentes fonctions cellulaires biologiques telles que la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Brooks *et al.*, 1994 ; Keely *et al.*, 1997 ; Mainiero *et al.*, 1997 ; Shaw *et al.*, 1997 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999). La signalisation transmembranaire par les intégrines est bidirectionnelle. L'activité de liaison extracellulaire est régulée par des signaux en provenance de l'intérieur de la cellule (inside-out-signaling), alors que la liaison des cellules à la MEC induit une signalisation intracellulaire (outside-in-signaling).

La liaison à la MEC résulte en un regroupement (formation de clusters) des intégrines à la surface cellulaire et en la liaison de leur queue cytoplasmique avec des protéines adaptatrices, qui, à leur tour, permettent un lien avec le cytosquelette, les kinases cytoplasmiques et les récepteurs transmembranaires aux facteurs de croissance (Giancotti et Ruoslahti, 1999).

Le rôle des intégrines dans la progression tumorale et dans le processus de métastase a été montré par des études *in vitro* et *in vivo*. De nombreuses tumeurs ont été analysées en immunohistochimie et l'expression et la distribution des intégrines ont été comparées aux tissus respectifs normaux. Des profils d'expression réduite ou de distribution altérée des récepteurs au collagène et à la laminine ont été observés dans les cancers du colon, du poumon, du pancréas et du sein (Stallmach *et al.*, 1992 ; Roussel *et al.*, 1994 ; Weinel *et al.*, 1995 ; Gui *et al.*, 1996). Comme les récepteurs de la laminine et du collagène jouent un rôle important dans l'attachement des cellules à la membrane basale, ces résultats suggèrent que la perte de cet attachement peut être importante dans le développement tumoral. La surexpression du récepteur de la fibronectine $\alpha 5 \beta 1$ dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) transformées inhibe la migration cellulaire et induit un phénotype non tumorigénique (Giancotti et Ruoslahti, 1990). De même, la transfection de cellules de mélanome murin hautement métastatiques avec la sous unité $\alpha 4$ des intégrines inhibe leur potentiel métastatique (Qian *et al.*, 1994).

Par contre, dans d'autres tissus, l'expression des intégrines est élevée, c'est notamment le cas du récepteur de la laminine, $\alpha 6 \beta 4$, dans la transformation de thyroïde normale en carcinome thyroïdien invasif (Serini *et al.*, 1996) ou au front d'invasion du cancer gastrique (Tani *et al.*, 1996). La surrégulation de certaines intégrines a été observée dans des mélanomes malins (Albelda *et al.*, 1990). L'expression ectopique de $\alpha 6 \beta 4$ dans les cellules de cancer du colon et de sein augmente *in vitro* la capacité invasive et cet effet a été montré comme étant médié par la Phosphoinositol 3-OH Kinase (PI3K) et Rac1 (Chao *et al.*, 1996 ; Shaw *et al.*, 1997).

Ces résultats peuvent sembler contradictoires, mais peuvent être expliqués par le fait que la migration dépendante des intégrines est affectée par différents facteurs tels que la densité de ligand, les niveaux d'expression des intégrines et l'affinité de liaison de l'intégrine à son ligand (Palecek *et al.*, 1997). Comme tous ces paramètres varient en fonction de la localisation anatomique et sont régulés par les cytokines locales (Herzberg *et al.*, 1996 ; Kim

et Yamada, 1997), ils peuvent fortement influencer le comportement des tumeurs malignes spécifiquement selon le type de tumeur.

Baudoux *et al.* (2000) montrent que CD9 s'associe *in vitro* avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et est impliquée dans la motilité des kératinocytes sur collagène. CD9 régulerait la fonction d'adhésion de cette intégrine sur ce substrat.

Sugiura et Berditchevski (1999) ont étudié la migration tridimensionnelle de cellules MDA-MB-231 sur matrigel et ont montré que l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est co-localisée avec les tétraspanines CD9, CD63, CD81 et CD151 à la périphérie de protrusions invasives. De plus, ces molécules sont impliquées dans le contrôle de l'activité invasive des protrusions.

2.1.2.2 Protéolyse

Durant le processus d'invasion tumorale, les cellules doivent traverser la MEC, composée d'un réseau dynamique de macromolécules interagissant entre elles. Parmi ces molécules on trouve des collagènes, la fibronectine, la laminine et des protéoglycanes. Les variations de la MEC participent fortement aux processus normaux et pathologiques tels que le développement, le remaniement tissulaire, la croissance cellulaire, la différenciation, l'invasion et la métastase (Woessner, 1991 ; Werb *et al.*, 1996).

De nombreuses tumeurs malignes ont été montrées comme exprimant des niveaux augmentés d'activité protéolytique et la dégradation protéolytique de la MEC semble être un pré-requis pour une invasion efficace du tissu hôte par les cellules tumorales (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993 ; Crawford et Matrisian, 1994). La dégradation de la MEC environnante sert d'abord à détruire une barrière physique et à faciliter la migration cellulaire à travers un environnement dense, mais également à réguler les interactions cellule-MEC en changeant la conformation des protéines de la MEC.

Les protéases jouant un rôle important dans l'invasion et la métastase sont divisées en 4 groupes majeurs : les métalloprotéinases de la matrice (MMPs), les sérine protéinases, les cystéine protéinases et les aspartate protéinases. Les plus étudiées sont les MMPs, le système urokinase plasminogen activator (uPA) et son récepteur (uPAR).

Les MMPs constituent une famille d'endoprotéases Zinc dépendantes comprenant des collagénases (MMPs -1, -8, -13), des gélatinases (MMP-2 et MMP-9), des stromelysines (MMPs -3, -10, -11), des MT-MMPs (Membrane Type – MMPs ; MMPs 14-17, 24, 25), des matrilysines (MMP-7 et MMP-26), une élastase des macrophages (MMP-12) (Leeman *et al.*, 2003). Il a été montré que des niveaux élevés d'expression de différentes MMPs sont associés

au stade métastatique dans plusieurs types de tumeurs (Airola *et al.*, 1997 ; Murray *et al.*, 1998 ; Sugiura *et al.*, 1998 ; Talvensaari-Mattila *et al.*, 1998). Les niveaux d'expression de MMP-2, MMP-7 et MMP-9 ont été montrés comme corrélés au potentiel métastatique de cellules tumorales (Montgomery *et al.*, 1994 ; Hua et Muschel, 1996 ; Wilson *et al.*, 1997 ; Cockett *et al.*, 1998 ; Hasegawa *et al.*, 1998). Parmi elles, MMP-2 et MMP-9 jouent un rôle central dans l'invasion tumorale par dégradation protéolytique de la MEC (Ray et Stetler-Stevenson, 1994). La plupart des MMPs sont sécrétées sous forme de pro-enzymes latentes (pro-MMPs) qui sont activées dans le milieu extracellulaire par clivage protéolytique (Chambers et Matrisian, 1997). Les activités des MMPs sont contrebalancées par des inhibiteurs tissulaires naturels spécifiques (TIMPs), dont 4 isoformes différentes ont été identifiées : TIMP-1, -2, -3 et -4. Les TIMPs sont exprimés par une grande variété de types cellulaires et sont retrouvés dans la plupart des tissus et des fluides biologiques. L'activité protéolytique des MMPs est inhibée par la formation de complexes stoechiométriques 1:1 non covalents, résistants à la dégradation par la chaleur et à la dégradation protéolytique (Gomez *et al.*, 1997, Gomis-Ruth, 1997). Les TIMPs se lient aux MMPs, mais peuvent aussi former des complexes avec les pro-MMPs régulant ainsi le processus d'activation des MMPs. Le domaine N-terminal des TIMPs contient le domaine inhibiteur des MMPs, alors que le domaine C-terminal intervient dans les interactions avec les pro-MMPs (Strongin *et al.*, 1995 ; Kai *et al.*, 2002). TIMP-1, -2 et -4 sont des molécules sécrétées, alors que TIMP-3 est associée à la matrice extracellulaire par des glycosaminoglycanes sulfatés (Yu *et al.*, 2000).

Alors que tous les TIMPs inhibent les activités de MMP-2 et MMP-9, l'association des TIMPs avec les pro-MMPs empêchant l'activation ultérieure de ces pro-enzymes est plus spécifique : TIMP-1 s'associe exclusivement avec pro-MMP-9 et TIMP-2 et TIMP-4 uniquement avec pro-MMP-2. TIMP-3 par contre s'associe avec les 2 pro-enzymes (Gomez *et al.*, 1997 ; Bigg *et al.*, 1997 ; Butler *et al.*, 1999). L'équilibre entre les TIMPs et les pro-enzymes détermine le phénotype invasif (Engers *et al.*, 1999), et une surexpression d'un des TIMPs ou l'ajout de protéines TIMP recombinantes ont été montrés comme inhibant l'invasion dans différents modèles tumoraux (Gomez *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1997 ; Baker *et al.*, 1999).

uPA est sécrétée en tant que pro enzyme inactive (pro-uPA) de façon autocrine ou paracrine et est clivée en enzyme active après liaison à son récepteur membranaire spécifique. Une fois activée uPA catalyse la conversion du plasminogène en plasmine, qui à son tour, dégrade les protéines circulantes ou tissulaires et est capable d'activer les pro-MMPs. De plus, uPA est régulée par 3 inhibiteurs d'activation du plasminogène (PAIs) et par la

protéase nexin 1. Le rôle de uPA et de son récepteur uPAR est décrit par Reuning *et al.*, 1998 ; Rabbani et Xing, 1998 ; Béné *et al.*, 2004.

Sugiura et Berditchevski (1999), en plus de montrer la co-localisation de tétraspanines et de l'intégrine $\alpha3\beta1$ au niveau de protrusions invasives de cellules de cancer du sein, montrent que l'engagement par un anticorps anti- $\alpha3$ ou par des anticorps dirigés contre CD9, CD63, CD81 ou CD151 augmente la production de MMP-2 par ces cellules.

2.1.2.3 Invasion tumorale : propriété temporaire

Un arrêt de la différenciation au niveau du front d'invasion des tumeurs malignes avec libération de cellules tumorales individuelles est un pré-requis au processus d'invasion par migration active. Ce blocage de différenciation n'est pas un phénomène irréversible : des cellules tumorales non différenciées possèdent la capacité de se redifférencier, ce qui peut être observé aussi bien dans la tumeur primaire et que dans des métastases distantes (Gabbert, 1985). Ainsi, toutes les cellules d'une tumeur maligne ne peuvent pas être considérées comme invasives à un temps donné, mais de nombreuses cellules tumorales font partie d'un pool de cellules invasives après un blocage temporaire de différenciation. Cette étape est cependant réversible et un certain nombre de cellules peuvent toujours quitter le pool de cellules invasives et se redifférencier dans le tissu hôte en des complexes de cellules non invasives.

2.1.3 Induction de différenciation

Les conditions de la régulation de ce changement de différenciation et d'invasion ne sont pas claires. Le fait que ce phénomène soit restreint au front d'invasion suggère un rôle important du microenvironnement du tissu hôte adjacent. Ainsi, le passage d'un phénotype invasif à un phénotype non invasif pourrait être médié par des signaux inducteurs du tissu hôte qui affecteraient épigénétiquement le programme génétique de façon active ou suppressive.

Cette hypothèse a pu être confirmée dans des lignées de cellules murines de rhabdomyosarcome au moyen d'étapes de clonage répétées. Des sous populations clonales présentant des différences majeures de différenciation peuvent ainsi être isolées et la différenciation peut être affectée par plusieurs composés inducteurs de différenciation tels que l'acide rétinoïque tout trans (Gabbert *et al.*, 1988).

L'analyse ultérieure de la capacité d'invasion révèle que l'induction de différenciation résulte en une forte inhibition de l'invasion (Gerharz *et al.*, 1993), confirmant que l'invasion des cellules tumorales peut être modulée par des stimuli exogènes. Ainsi, la capacité d'invasion tumorale doit être considérée comme une propriété biologique temporaire et dynamique qui dépend de deux facteurs majeurs : les capacités invasives préexistantes, déterminées génétiquement, des populations clonales d'une tumeur maligne d'une part, les facteurs épigénétiques du microenvironnement tumoral adjacent, qui est capable de moduler le potentiel invasif en induisant temporairement un changement de phénotype d'autre part.

Malgré ces résultats encourageants *in vitro*, l'induction de la différenciation n'a pas donné de résultats convaincants en terme de thérapie tumorale *in vivo*, sauf dans le traitement de la leucémie promyélocytaire (Degos, 1993). Cependant, un certain nombre de composés inducteurs de différenciation sont à l'heure actuelle en cours d'étude dans des essais cliniques, où le retour à la normale de lésions précancéreuses et la prévention de tumeurs secondaires ont été observés (Lippman *et al.*, 1994, 1995 ; Ki *et al.*, 1995 ; Sabichi *et al.*, 1998 ; Evans et Kaye, 1999). Aucun effet significatif sur la métastase ou la progression de tumeurs primaires cliniquement visibles n'a été jusqu'alors observé.

2.2 INTRAVASATION, ARRET DES CELLULES TUMORALES ET EXTRAVASATION

Après avoir traversé la MEC, les cellules entrent dans le réseau vasculaire afin d'être disséminées dans des organes distants, étape appelée intravasation. Cette étape nécessite une séquence bien coordonnée de protéolyse et de migration active. L'intravasation a été montrée dans plusieurs études comme présentant un fort impact pronostique. Ainsi, des patients présentant une invasion des vaisseaux sanguins ou lymphatiques ont un pronostic significativement moins bon que des patients sans invasion vasculaire (Gabbert *et al.*, 1991). Une fois entrées dans le réseau vasculaire, les cellules tumorales sont disséminées de façon passive par le courant sanguin jusqu'à des organes-filtres tels que le foie ou les poumons. Les cellules tumorales semblent ensuite être arrêtées dans la microcirculation uniquement par leur taille et l'arrêt des cellules tumorales pourrait ne pas être affecté par le blocage des fonctions des intégrines (Chambers *et al.*, 1995). Lors de cet arrêt, les cellules tumorales sont pressées contre l'endothélium et déformées mécaniquement, phénomène que l'on pense depuis longue date responsable de la destruction de nombreuses cellules tumorales, rendant le processus de

métastase extrêmement inefficace (Weiss *et al.*, 1985 ; Mareel *et al.*, 1993). Néanmoins, un faible pourcentage de cellules tumorales circulantes amène finalement à la formation de métastases. L'utilisation de la vidéomicroscopie démontre que, malgré les fortes déformations morphologiques des cellules tumorales dans le système capillaire, plus de 80 % de ces cellules maintiennent l'intégrité de leur membrane, survivent et réussissent l'étape d'extravasation (Chambers *et al.*, 1995). Ainsi, l'inefficacité du processus métastatique ne résulterait pas d'une destruction massive des cellules tumorales circulantes dans les vaisseaux, mais plutôt d'un contrôle des cellules tumorales isolées après extravasation (Chambers *et al.*, 1995).

Plusieurs heures après l'arrêt initial dans la microcirculation, les cellules tumorales s'étirent le long des parois vasculaires (Chambers *et al.*, 1995). Des contacts d'adhésion avec les cellules endothéliales doivent avoir lieu, mais les molécules impliquées sont encore à déterminer. Des intégrines particulières telles que $\alpha 4\beta 1$, les intégrines $\alpha 2$ - et $\alpha 5$ -, les molécules VCAMs (Vascular Cell Adhesion Molecules), les ECAMs (Endothelial Cell Adhesion Molecules), les ICAMs (Intercellular Adhesion Molecules) les P- et E-selectines, ainsi que les carbohydrates sialyl-Lewis (Mareel *et al.*, 1993 ; Jiang *et al.*, 1998 ; Jiang, 1998a, b). Après la formation des contacts intercellulaires, l'extravasation des cellules tumorales a lieu par étapes successives de protéolyse, d'adhésion cellule-substrat et de migration active comme lors de la traversée de la MEC et l'intravasation. Il est intéressant de remarquer que l'analyse *in vivo* de l'extravasation de cellules de lignées tumorales fortement métastatiques ne révèle pas de différence significative par rapport à celle de cellules faiblement métastatiques, et que des fibroblastes normaux ont été montrés capables d'une extravasation efficace (Morris *et al.*, 1994 ; Chambers *et al.*, 1995). L'étape d'extravasation ne semble donc plus aussi critique dans la formation de métastases.

Sauer *et al.* (2003) montrent, comme d'autres auteurs dans différents types de cancers, que l'expression de CD9 est inversement corrélée avec le stade tumoral dans le cancer utérin. De plus, ces auteurs proposent un modèle selon lequel l'expression de CD9 serait diminuée lors de la progression tumorale afin de permettre l'expansion de cellules malignes, puis que cette molécule serait ré-exprimée afin d'établir des contacts avec les cellules environnementales et notamment endothéliales lors du passage dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Ainsi, la croissance tumorale dépendrait de la capacité des cellules à diminuer leur expression de CD9 et la capacité à traverser les vaisseaux dépendrait de la capacité de certaines cellules à ré-exprimer cette molécule. Longo *et al.* (2001) ont, de plus, montré l'importance du rôle de CD9 dans les interactions cellule tumorale – cellule endothéliale et

dans la dissémination des cellules malignes, par étude *in vitro* de la migration transendothéliale de cellules de mélanome. Ces auteurs ont ainsi montré que les tétraspanines CD9, CD81 et CD151 étaient localisées au niveau des sites de contact entre cellules de mélanome et cellules endothéliales. CD9, exprimée à la surface des cellules endothéliales apparaissait comme redistribuée durant le passage transendothélial et ciblée au niveau des cellules tumorales insérées. De plus, la migration transendothéliale est inhibée par un anticorps anti-CD9. CD9 pourrait jouer un rôle important dans les interactions spécifiques entre cellules tumorales et cellules endothéliales cruciales pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et la dissémination des cellules malignes au travers de la barrière endothéliale.

2.3 DORMANCE TUMORALE

D'après les observations cliniques, des métastases distantes peuvent apparaître même plusieurs années après avoir quitté la tumeur primaire (Callaway et Briggs, 1989). Même si 80% des cellules tumorales circulantes franchissent l'étape d'extravasation, le nombre de métastases reste largement en dessous de ce que l'on pourrait attendre (Chambers *et al.*, 1995). L'explication de ce phénomène peut se trouver dans le fait que les cellules tumorales après extravasation entrent dans une phase de croissance retardée qui est équivalente au phénomène de dormance tumorale ou de micrométastase silencieuse. Ces micrométastases peuvent présenter une activité proliférative élevée, mais contrebalancée par des taux d'apoptose élevés (Holmgren *et al.*, 1995; Racila *et al.*, 1996 ; Vitetta *et al.*, 1997). De plus, nombre de ces cellules sont arrêtées en phase G0 dans le cycle cellulaire (Marches *et al.*, 1998), ce qui les rend difficilement sensibles à la chimio- ou à la radiothérapie. Cependant ces cellules restent capables de reprendre leur cycle cellulaire à n'importe quel moment et ainsi de former des métastases cliniquement apparentes même des années après avoir quitté la tumeur primaire.

2.4 MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA METASTASE

Les mécanismes moléculaires induisant le passage d'une micrométastase dormante à une métastase cliniquement apparente sont encore partiellement connus. Ils peuvent impliquer un changement de l'immunité cellulaire ou humorale, ou des modifications dans la régulation de la prolifération ou de l'angiogenèse. Parmi ces altérations, la régulation de l'angiogenèse

semble jouer un rôle important. Folkman et Ingber (1992) et Folkman (1995) ont montré que l'approvisionnement nutritionnel des micrométastases se fait initialement sans vascularisation et exclusivement par diffusion, limitant ainsi la croissance tumorale à 1-2 mm. La croissance tumorale nécessite la sécrétion de facteurs angiogéniques produits par les cellules tumorales elles-mêmes ou par les cellules du tissu hôte adjacent. Ces facteurs angiogéniques induisent la prolifération et la migration des cellules endothéliales aboutissant à la néovascularisation du tissu tumoral et à son approvisionnement nutritionnel. Le processus angiogénique est une machinerie régulée de façon complexe dans laquelle interviennent des facteurs angiogéniques tels que VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), bFGF (basic FGF), ILGF (Insulin Like Growth Factor) et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et des molécules inhibitrices d'angiogenèse telles que l'angiostatine, l'endostatine, la fibronectine, la prolactine, la thrombospondine, le facteur 4 des plaquettes, l'IFN- α (Interféron- α), et l'IFN- β (Folkman, 1997 ; Meyer et Hart, 1998 ; Hart, 1999). L'inhibition de l'angiogenèse est une approche thérapeutique prometteuse dans la métastase cancéreuse, car elle pourrait permettre le maintien des cellules tumorales en dormance et ainsi prévenir la libération de cellules tumorales et la formation de métastases.

3 LE CANCER DU POUMON

Le cancer du poumon est le cancer le plus fréquent dans le monde. 87 % des cancers du poumon sont causés par la consommation tabagique. Cette consommation tabagique est responsable de 30 % de la mortalité par cancer dans les pays développés (Hecht, 2002).

Le cancer du poumon peut être divisé en quatre types histologiques majeurs : les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes, les carcinomes à grandes cellules, les carcinomes à petites cellules (SCLC, Small Cell Lung Cancer). Le terme de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC, Non Small Cell Lung Cancer) regroupe souvent les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules puisque ces types de cancers présentent des caractéristiques cliniques et biologiques similaires.

Les cancers du poumon non à petites cellules sont relativement chimiorésistants et sont traités dans un premier temps par chirurgie si le diagnostic est précoce. Par contre, les cancers du poumon à petites cellules progressent plus rapidement et atteignent souvent des stades plus avancés au moment du diagnostic. Ils sont chimio- et radio-sensibles et sont donc traités par chimiothérapie en première intention. Les adénocarcinomes dérivent de cellules

épithéliales alvéolaires ou bronchiques à mucus, en particulier de cellules épithéliales alvéolaires de type II, de cellules de Clara ou de cellules mucosécrétantes. Une hyperplasie adénomateuse atypique est considérée comme une lésion précancéreuse pour les adénocarcinomes. Il n'y a pas d'épithélium épidermoïde dans le poumon normal, et les carcinomes épidermoïdes proviennent de cellules épithéliales bronchiques par dysplasie épidermoïde. Les carcinomes à grandes cellules sont moins différenciés que les adénocarcinomes ou les carcinomes épidermoïdes. Les cancers du poumon à petites cellules proviennent de cellules épithéliales présentant des caractéristiques neuro-endocrines. Les lésions précancéreuses de ces cancers sont peu connues puisqu'ils sont déjà à des stades avancés au moment du diagnostic (Yokota et Kohno, 2004).

TRAVAUX PERSONNELS

OBJECTIFS

Les tétraspanines sont impliquées dans la formation d'un réseau multimoléculaire de surface, le réseau tétraspanines, dans lequel elles sont associées à de nombreux partenaires et notamment à des intégrines $\beta 1$. Elles interviennent ainsi dans un grand nombre de fonctions cellulaires fondamentales telles que la croissance, l'adhésion et la motilité cellulaire. Leur implication dans les processus de progression tumorale et de métastase a également été rapportée dans divers types de cancers où l'expression de certains membres de cette famille est liée au stade tumoral et peut être considérée comme un facteur pronostique.

Les objectifs de cette étude étaient ainsi de déterminer le profil d'expression des tétraspanines et des intégrines dans le cadre du cancer du poumon, et d'analyser leur modulation éventuelle dans ce contexte pathologique particulier.

Le travail présenté ici a donc tout d'abord consisté en l'étude des profils d'expression de membres de la famille des tétraspanines et de leurs partenaires intégrines $\beta 1$ à la surface de cellules de dix lignées tumorales. Ces lignées présentaient des origines tissulaires différentes, ainsi cinq d'entre elles avaient une origine pulmonaire, trois une origine mésothéliale, une était d'origine colorectale et la dernière d'origine mammaire. Parmi ces lignées cellulaires, certaines provenaient de tumeurs primaires et d'autres de sites métastatiques. Les profils d'expression ont été déterminés pour chacune des lignées tumorales à l'aide d'une technique d'immunofluorescence indirecte et analyse en cytométrie de flux. La comparaison des profils obtenus visait à dégager les similitudes et les différences concernant les molécules étudiées en fonction du type de cancer. La comparaison des profils obtenus a également été entreprise afin de corrélérer l'expression des marqueurs en fonction de l'origine métastatique ou non des lignées.

L'expression de tétraspanines (CD9, CD82, CD151) et d'une intégrine $\beta 1$ ($\alpha 3\beta 1$) a ensuite été étudiée au niveau de tissus pulmonaires sains et tumoraux obtenus après exérèse chirurgicale réalisée chez des patients atteints de carcinomes ou d'adénocarcinomes du poumon. La détermination des profils d'expression a été réalisée à l'aide d'une technique

d'immunofluorescence indirecte sur coupes à la congélation et analyse en microscopie UV. La comparaison des profils obtenus chez les différents patients visait à évaluer l'intérêt pronostique des facteurs étudiés dans le cadre du cancer du poumon.

L'expression de certaines tétraspanines (CD9, CD82) a été corrélée à un meilleur pronostic chez des patients atteints de cancer et inversement, d'autres (CD151, Co-029) semblent présenter un effet favorisant la métastase. De plus, les intégrines sont des molécules dont l'expression et les propriétés sont dépendantes de cations divalents. La modulation de l'expression de ces deux types de molécules pourrait constituer une approche thérapeutique intéressante dans certains cancers. C'est pourquoi l'étude de la modulation de l'expression de tétraspanines et d'intégrines $\beta 1$ a été entreprise par chélation des cations divalents sur les cellules d'une lignée de carcinome pulmonaire. L'expression membranaire des différents marqueurs a ainsi été comparée en fonction de la présence ou non d'un chélateur par une technique d'immunofluorescence indirecte et analyse en cytométrie de flux. De plus, une technique d'immunofluorescence indirecte sur cellules adhérentes et analyse en microscopie UV a permis la comparaison de la localisation cellulaire des différentes molécules étudiées en fonction de la chélation des cations divalents.

L'étude de la sécrétion de facteurs (cytokines, chimiokines...) a aussi été réalisée à partir de surnageants de culture issus de quatre lignées tumorales d'origine pulmonaire. Les profils de production des différentes lignées ont permis de choisir quatre cytokines pour moduler l'expression de tétraspanines et d'intégrines. L'expression de ces marqueurs a été déterminée à l'aide d'une technique d'immunofluorescence indirecte et analyse en cytométrie de flux.

RESULTATS

1. Comparaison des profils d'expression de tétraspanines et de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ à la surface de cellules de lignées tumorales en fonction du mode de mise en suspension des cellules

Matériels et méthodes

Des cellules des lignées A549, H596, H661 et H2087 ont été cultivées jusqu'à confluence (Fiche technique n°1). Deux modes de mise en suspension, préalables à une analyse de cellules adhérentes en cytométrie de flux (Fiche technique n°2), ont été comparés. La première technique consistait en une mise en suspension à l'aide d'une solution de Trypsine-EDTA 0,25 % (Sigma, St Louis, MO, USA), la seconde en l'utilisation d'un tampon de dissociation (CDB : Cell Dissociation Buffer, Gibco-BRL-Life Technologies, Rockville, MD, USA). L'expression membranaire de cinq membres de la famille des tétraspanines (CD9, CD63, CD81, CD82 et CD151 (TS151)) et celle des chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines a ensuite été analysée par cytométrie de flux (Fiche technique n°3).

Un mélange de microparticules de calibration correspondant à des équivalents de fluorescéine soluble a de plus été utilisé, d'abord pour calculer le coefficient de variation du cytomètre de flux, égal à 1 %, mais aussi afin de convertir les valeurs mesurées d'intensité moyenne de fluorescence (MFI : Mean Fluorescence Intensity) en équivalents moyen de fluorescence soluble (MESF : Mean Equivalent of Soluble Fluorescein). La détermination du ratio MESF correspondant au ratio du MESF calculé pour un marqueur étudié sur le MESF du contrôle CD3 permet de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules. La détermination d'une valeur seuil de ratio MESF calculée à partir d'une MFI arbitrairement choisie comme égale au double de celle mesurée pour le contrôle CD3 permet de déterminer un seuil de positivité d'expression membranaire des marqueurs étudiés. Ainsi, une molécule dont le ratio MESF est strictement supérieur à cette valeur seuil a été considérée comme exprimée à la surface des cellules étudiées.

Résultats

Comparaison des profils d'expression tétraspanines – intégrine $\alpha3\beta1$ à la surface des cellules de la lignée A549 en fonction du mode de mise en suspension

Lors de la mise en suspension par trypsination, le phénotype d'expression des cellules de la lignée A549 comprenait l'expression des tétraspanines CD9 (Ratio MESF = 4,8), CD63 (1,9), CD81 (1,6) et CD151 (8) et celle des deux chaînes des intégrines étudiées CD29 (13,2) et CD49c (4,9), mais pas celle de la tétraspanine CD82 (1,1 < valeur seuil de 1,2). Lors de l'utilisation du tampon CDB, l'expression des mêmes marqueurs a été observée à la surface des cellules de la lignée A549, mais avec des ratios MESF diminués (CD9 : 1,4, CD63 : 1,2, CD81 : 1,2, CD151 : 6,7, CD29 : 4,6, CD49c : 4,4) (Figure n°6).

Comparaison des profils d'expression tétraspanines – intégrine $\alpha3\beta1$ à la surface des cellules de la lignée H596 en fonction du mode de mise en suspension

L'utilisation d'une solution de Trypsine-EDTA 0,25 % pour la mise en suspension des cellules de la lignée H596 permettait l'observation d'un phénotype comprenant l'expression des tétraspanines CD9 (3,1), CD63 (2,1), CD82 (3,3) et CD151 (6,6), et des chaînes $\alpha3$ (11,1) et $\beta1$ (29) des intégrines, mais pas celle de la tétraspanine CD81 (1,1 = valeur seuil). Lors de l'utilisation du tampon CDB, l'expression des tétraspanines CD63 (1,5), CD82 (1,3), ainsi que celle des chaînes $\alpha3$ (7,4) et $\beta1$ (10,9) des intégrines était toujours observée, mais diminuée. L'expression de la tétraspanine CD151 n'était que légèrement augmentée (6,7) et l'expression de la tétraspanine CD9 n'était, quant à elle, plus observée (1,1 < valeur seuil de 1,2). De même, le ratio MESF calculé pour la tétraspanine CD81 était toujours inférieur au ratio MESF seuil de positivité (1,1 < valeur seuil de 1,2) (Figure n°6).

Comparaison des profils d'expression tétraspanines – intégrine $\alpha3\beta1$ à la surface des cellules de la lignée H661 en fonction du mode de mise en suspension

Lors de la mise en suspension par trypsination des cellules de la lignée H661, le phénotype d'expression comprenait l'expression des tétraspanines CD9 (2,9), CD63 (2,3) et CD151 (5,2), ainsi que celle de CD29 (14,9) et de CD49c (1,4), mais pas celle des tétraspanines CD81 et CD82. Lors de l'utilisation du tampon CDB, l'expression des tétraspanines CD9 (1,3) et CD151 (3), et de CD29 (3,4) était diminuée, ainsi que celle de la tétraspanine CD63 qui n'était plus observée (1,1 = valeur seuil). L'expression de la chaîne $\alpha3$

des intégrines (CD49c) était par contre augmentée (2,3). L'expression des tétraspanines CD81 et CD82 n'était toujours pas observée à la surface des cellules H661 avec ce mode de mise en suspension (Figure n°7).

Comparaison des profils d'expression tétraspanines – intégrine $\alpha3\beta1$ à la surface des cellules de la lignée H2087 en fonction du mode de mise en suspension

Lors de la mise en suspension par trypsination, le phénotype d'expression des cellules de la lignée H2087 comprenait l'expression des tétraspanines CD9 (4,4), CD63 (2,1), CD82 (1,2) et CD151 (16,8), ainsi que celle des chaînes $\alpha3$ (5,7) et $\beta1$ (25,7) des intégrines, mais pas celle de la tétraspanine CD81. Lors de l'utilisation du tampon CDB, seule l'expression de la tétraspanine CD151 (2,2) était observée, accompagnée par celle des deux chaînes des intégrines $\alpha3$ (1,2) et $\beta1$ (2,8), mais l'intensité d'expression de ces trois molécules était nettement diminuée. L'expression des tétraspanines CD9, CD63 et CD82 n'était plus observée. L'expression de la tétraspanine CD81 n'était pas non plus observée dans ces conditions (Figure n°7).

L'expression des différents marqueurs étudiés semble donc majoritairement plus importante lors de la mise en suspension des cellules des quatre lignées étudiées à l'aide d'une solution de Trypsine-EDTA. Ce type de mise en suspension a ainsi été préféré à l'utilisation du tampon CDB pour les expérimentations suivantes.

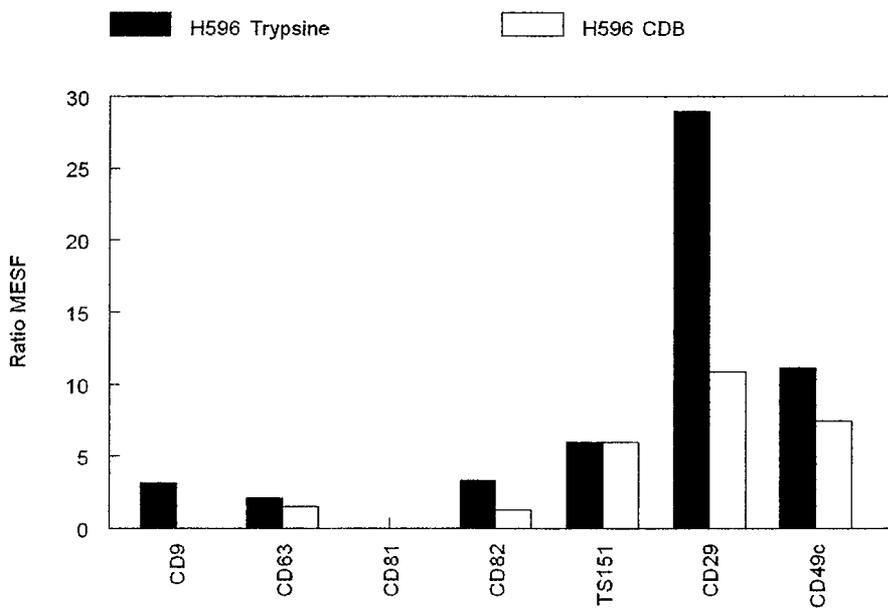
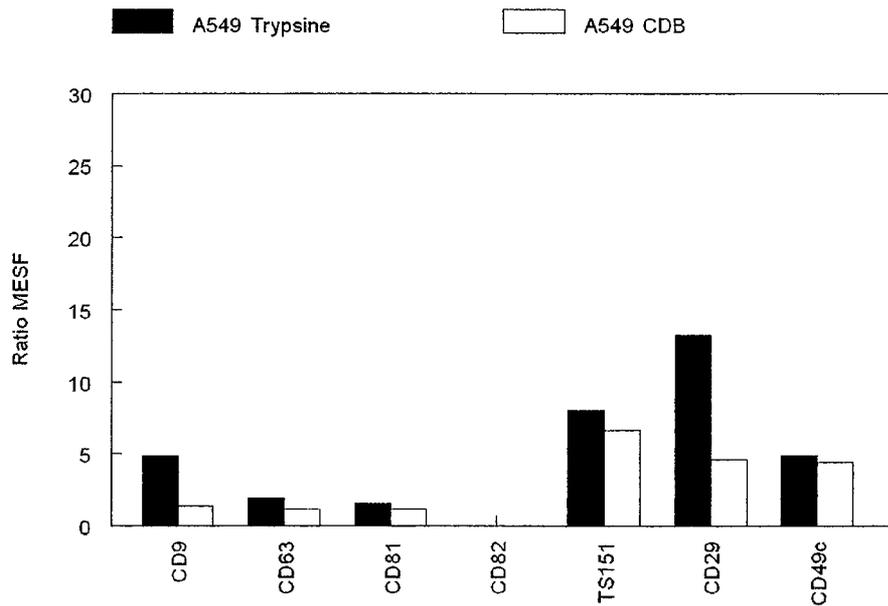


Figure n°6 : Influence du mode de mise en suspension sur les cellules A549 et H596

Histogrammes représentant la comparaison du ratio MESF calculé pour chacune des molécules étudiées selon le tampon utilisé lors de la mise en suspension des cellules (noir : Trypsine ; blanc : Cell Dissociation Buffer). L’histogramme du haut correspond aux valeurs calculées après étude des cellules de la lignée A549 et celui du bas après étude des cellules de la lignée H596.

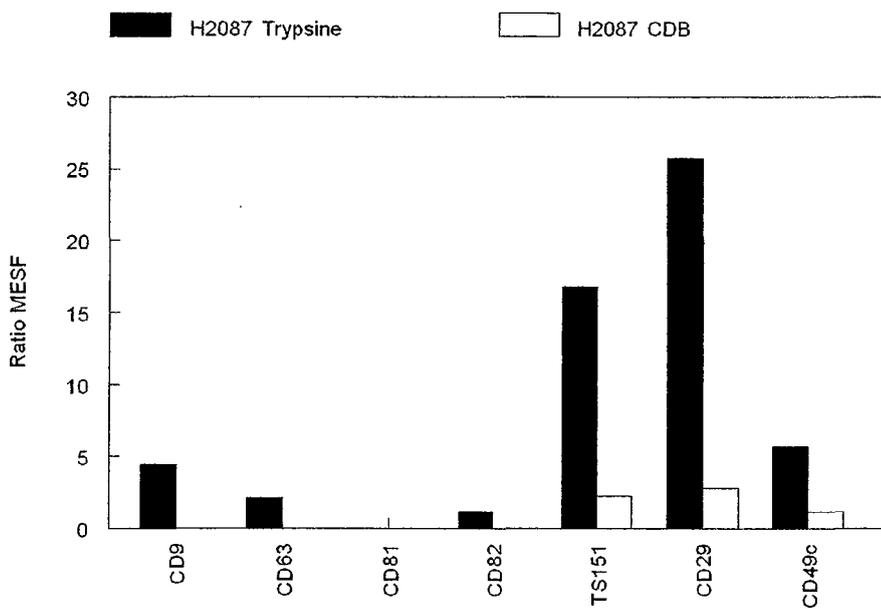
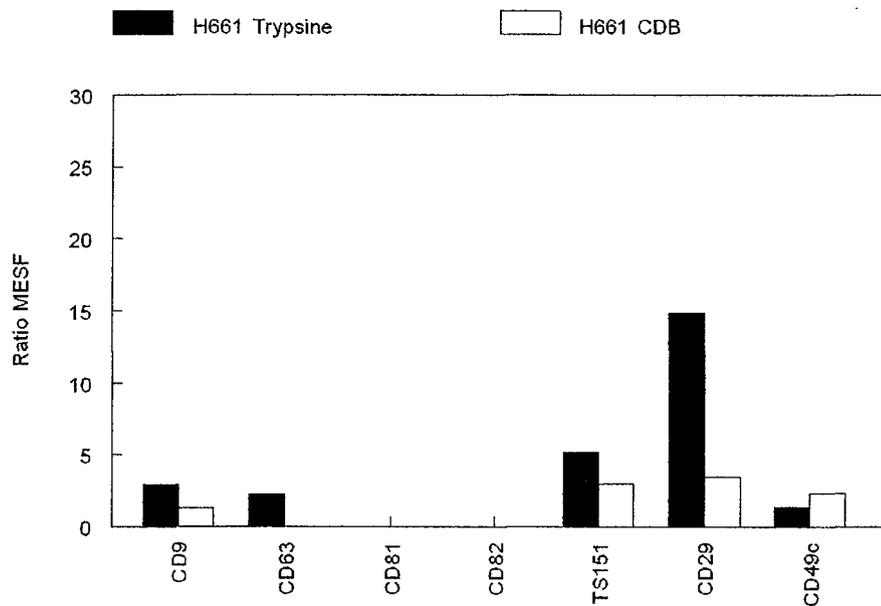


Figure n°7 : Influence du mode de mise en suspension sur les cellules H661 et H2087

Histogrammes représentant la comparaison du ratio MESF calculé pour chacune des molécules étudiées selon le tampon utilisé lors de la mise en suspension des cellules (noir : Trypsine ; blanc : Cell Dissociation Buffer). L'historgramme du haut correspond aux valeurs calculées après étude des cellules de la lignée H661 et celui du bas après étude des cellules de la lignée H2087.

2. Comparaison des profils d'expression de tétraspanines et de chaînes des intégrines à la surface de cellules de différentes lignées tumorales

Matériel et méthodes

Lignées tumorales

Des cellules des lignées de cancer du poumon, A549, H596, H661, H1651 et H2087, de mésothéliome, 211H, H28, H2052, de cancer du sein, T47D et de cancer du colon, SW480, ont été cultivées jusqu'à confluence dans le milieu approprié complet (Fiche technique n°1).

Méthode

Une technique d'immunofluorescence indirecte et de cytométrie de flux (Fiche technique n°4) a été utilisée afin de caractériser l'expression des tétraspanines CD9, CD63, CD81, CD82 et CD151 (TS151) et des chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines à la surface des cellules des différentes lignées tumorales étudiées. Les résultats sont exprimés en ratio MESF conformément au protocole décrit au chapitre précédent.

Résultats

Comparaison de l'expression de la tétraspanine CD9 à la surface des cellules tumorales étudiées

L'expression de CD9 a été observée à la surface des cellules de toutes les lignées tumorales étudiées, mais de façon variable.

CD9 était nettement plus exprimée à la surface des cellules de la lignée H1651 (Ratio MESF = 7,4) qu'à la surface des cellules des lignées A549 (4,8) et H2087 (4,4) où elle était exprimée de façon similaire. Les cellules de toutes les autres lignées (H596 (3,1), H661 (2,9), SW480 (2,9), H2052 (2,7), 211H (2,6), T47D (2,5) et H28 (2,4)) exprimaient CD9 à leur surface à un niveau encore plus bas (Figure n°8).

Comparaison de l'expression de la tétraspanine CD63 à la surface des cellules tumorales étudiées

L'expression de la tétraspanine CD63 a été observée à la surface des cellules de toutes les lignées, mais de façon variable.

L'expression de la tétraspanine CD63 était également la plus forte à la surface des cellules de la lignée H1651 (3). Les cellules des lignées 211H (2,4), H661 (2,3), H596 (2,1), H28 (2,1), H2087 (2,1), A549 (1,9) et H2052 (1,9) présentaient une expression de CD63 légèrement plus faible, suivies par celles des lignées T47D (1,5) et SW480 (1,2) (Figure n°8).

Comparaison de l'expression de la tétraspanine CD81 à la surface des cellules tumorales étudiées

L'expression de la tétraspanine CD81 n'a été observée qu'à la surface des cellules des lignées H28, A549, T47D, H1651, SW480.

Dans le cas des cellules des lignées 211H, H596, H2052, H2087 et H661, le ratio MESF calculé pour la tétraspanine CD81 était inférieur au ratio MESF correspondant au seuil de positivité. Le graphique (Figure n°9) ne présente que les ratios MESF des marqueurs étudiés et considérés comme exprimés à la surface des cellules.

Parmi les cinq lignées présentant une expression de CD81, les cellules de la lignée H28 (2,2) présentaient la plus forte expression de CD81, suivies par les cellules des quatre autres lignées avec un même niveau d'expression (A549 (1,6), T47D (1,5), H1651 (1,5), SW480 (1,4)).

Comparaison de l'expression de la tétraspanine CD82 à la surface des cellules tumorales étudiées

L'expression de la tétraspanine CD82 n'a pas été observée à la surface des cellules des lignées A549, 211H et H661.

Parmi les autres lignées étudiées, les cellules de la lignée SW480 (17,2) présentaient une très forte expression de CD82, suivies par celles de la lignée T47D (7,6), et par celles des lignées H596 (3,3), H2052 (3), H28 (2,2), H1651 (1,7) et H2087 (1,2), à un niveau nettement plus faible pour les dernières (Figure n°9).

Comparaison de l'expression de la tétraspanine CD151 à la surface des cellules tumorales étudiées

L'expression de la tétraspanine CD151 a été observée à la surface des cellules de toutes les lignées étudiées, de façon variable mais généralement forte.

Les cellules de la lignée H1651 (22,2) présentaient la plus forte expression de CD151 à leur surface, suivies par celles des lignées H2087 (16,8) et H28 (16,2). Les cellules des lignées H2052 (12,6), 211H (10,5), SW480 (9,2), A549 (8), H596 (6,6), T47D (5,9), H661 (5,2) présentaient une expression membranaire de CD151 moindre (Figure n°10).

Comparaison de l'expression de la chaîne β 1 des intégrines (CD29) à la surface des cellules tumorales étudiées

Une expression importante de CD29 a été observée à la surface des cellules de toutes les lignées étudiées.

Les cellules des lignées H28 (31), H596 (29) et H2087 (25,7) présentaient l'expression la plus forte de la chaîne β 1 des intégrines à leur surface, suivies par les cellules des lignées 211H (15,2), H661 (14,9), H1651 (14) et A549 (13,2) dans un même groupe. Enfin, une expression plus faible a été observée à la surface des cellules des lignées SW480 (8,4), T47D (7,1) et H2052 (6,6) dans un troisième groupe (Figure n°10).

Comparaison de l'expression de la chaîne α 3 (CD49c) des intégrines à la surface des cellules tumorales étudiées

L'expression de la chaîne α 3 (CD49c) des intégrines a été observée à la surface des cellules de toutes les lignées étudiées.

L'expression la plus forte de CD49c a été observée à la surface des cellules de la lignée H28 (30,2). Cette expression a également été observée à la surface des cellules des autres lignées, H2052 (13,9), H596 (11,1), 211H (7,8), H2087 (5,7), H1651 (5,5), A549 (4,9), T47D (3,5), SW480 (1,8) et H661 (1,4) dans un ordre décroissant (Figure n°11).

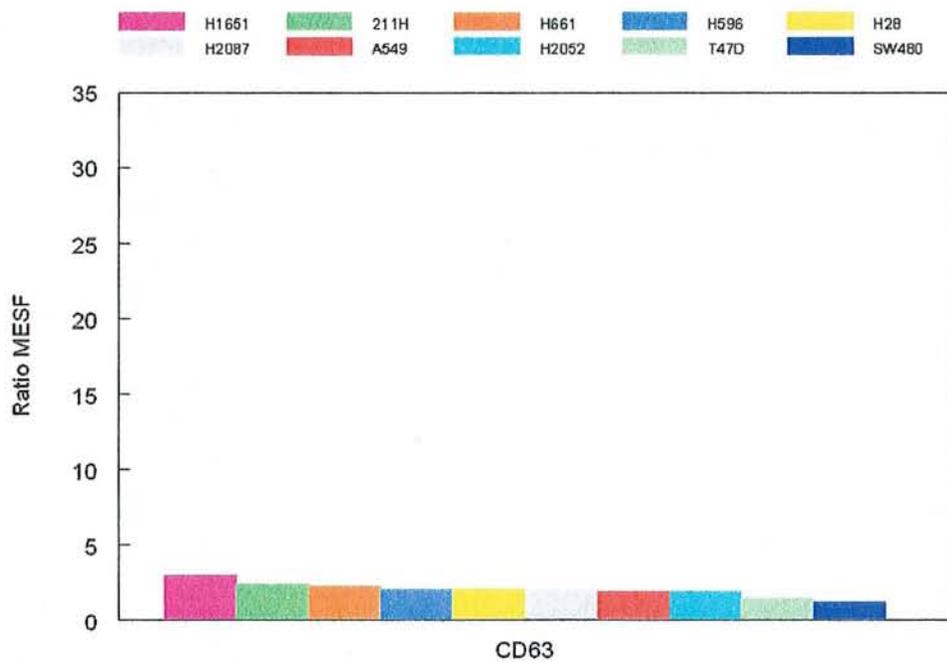
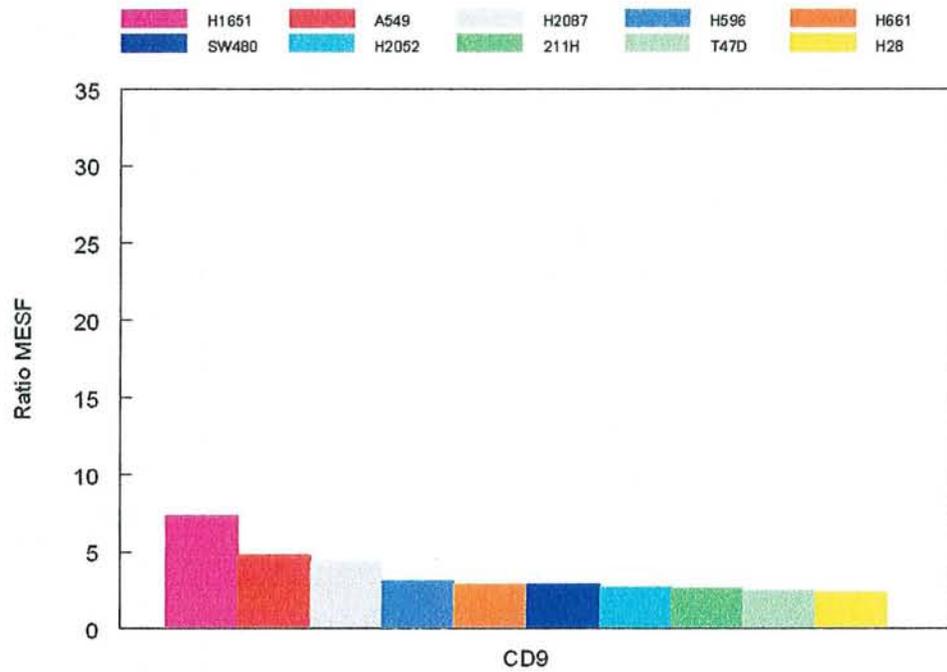


Figure n°8 : Expression de CD9 et de CD63 sur différentes lignées tumorales

Histogrammes représentant les ratios MESF calculés pour les tétraspanines CD9 (haut) et CD63 (bas) au niveau des différentes lignées tumorales étudiées.

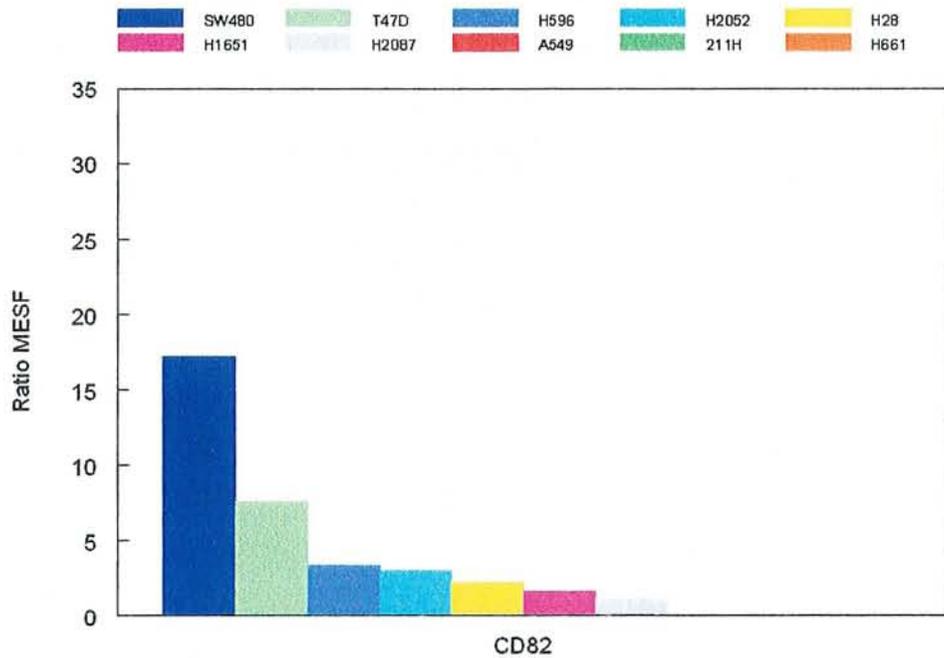
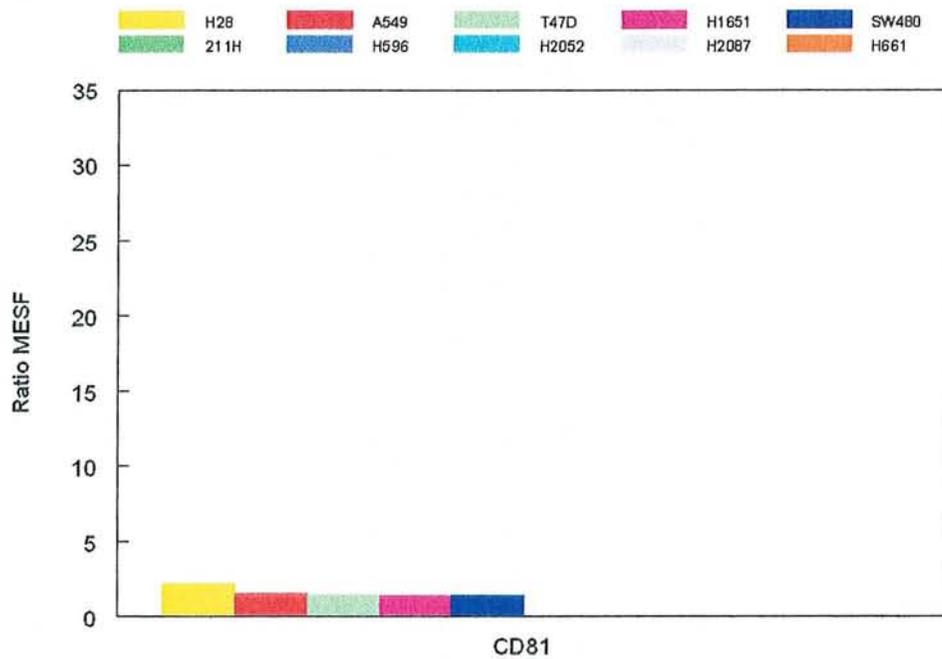


Figure n°9 : Expression de CD81 et de CD82 sur différentes lignées tumorales

Histogrammes représentant les ratios MESF calculés pour les tétraspanines CD81 (haut) et CD82 (bas) au niveau des différentes lignées tumorales étudiées.

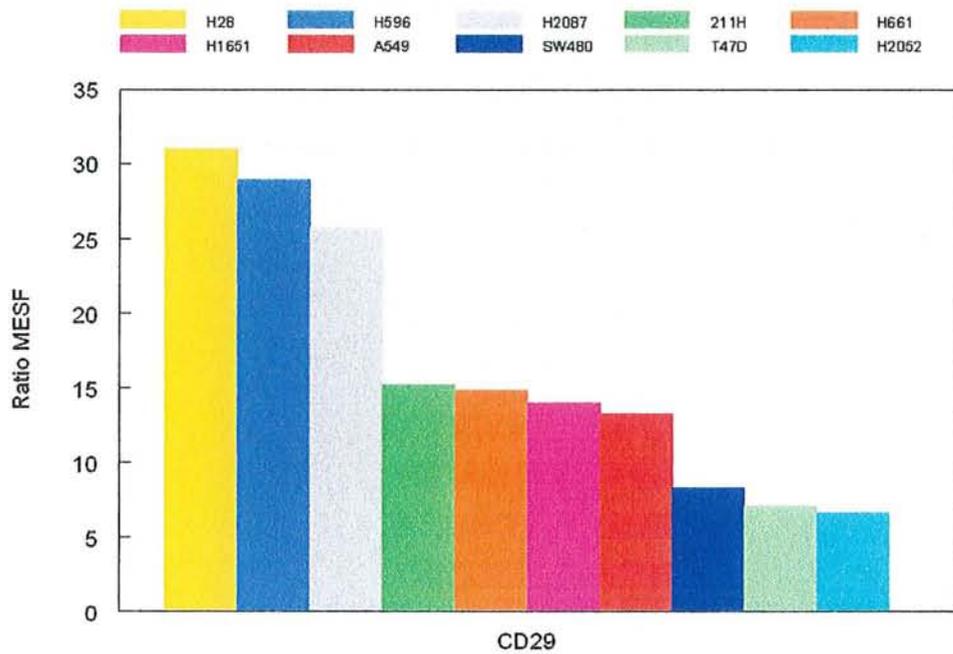
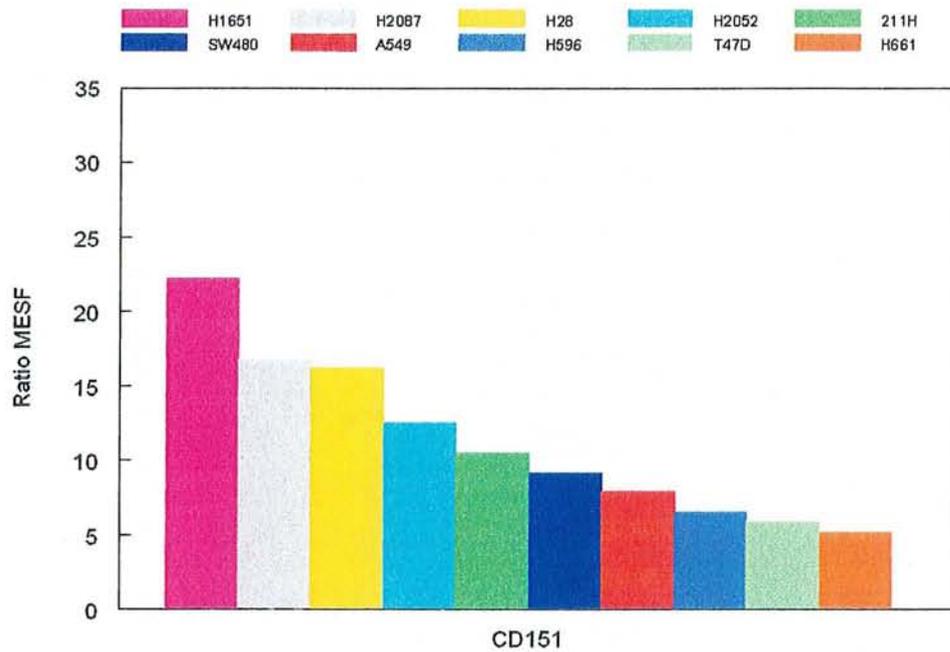


Figure n°10 : Expression de CD151 et de CD29 sur différentes lignées tumorales

Histogrammes représentant les ratios MESF calculés pour la tétraspanine CD151 (haut) et la chaîne $\beta 1$ des intégrines (CD29) (bas) au niveau des différentes lignées tumorales étudiées.

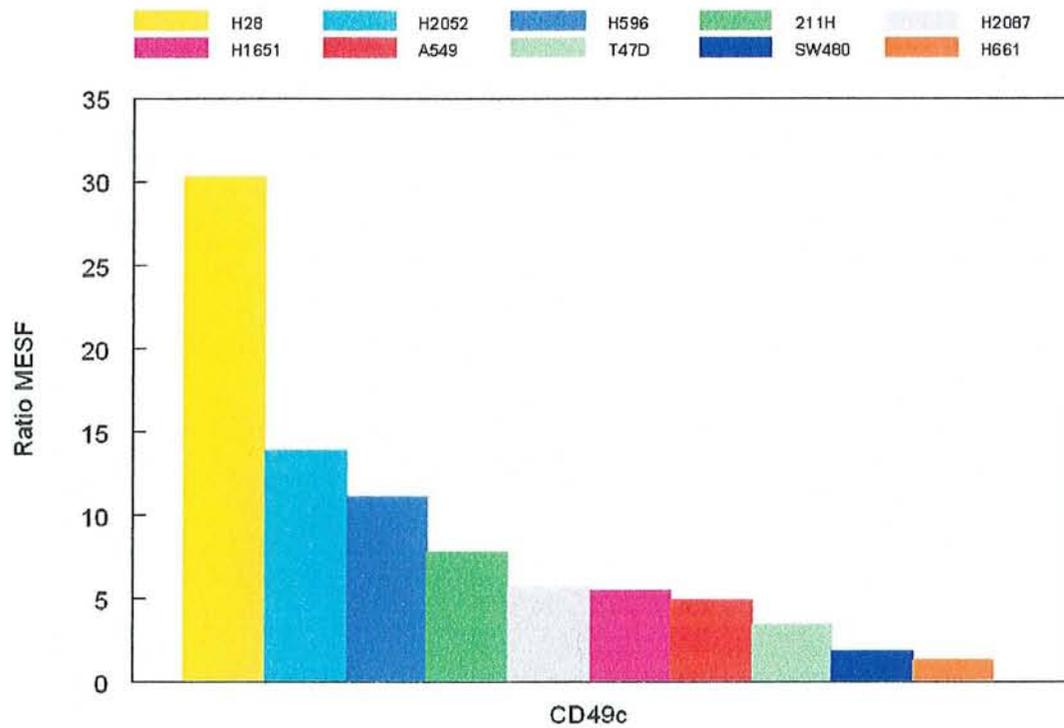


Figure n°11 : Expression de CD49c sur différentes lignées tumorales

Histogramme représentant les ratios MESF calculés pour la chaîne $\alpha 3$ des intégrines (CD49c) au niveau des différentes lignées tumorales étudiées.

3. Détermination du profil d'expression et de la localisation de tétraspanines et d'intégrines au niveau de cellules de lignées en conditions adhérentes

Matériels et méthodes

Les cellules des lignées tumorales A549, 211H, H28, H596, H1435, H1651 et H2087 ont été cultivées jusqu'à confluence (Fiche technique n°1) dans des chambres de culture (Lab-Tek II chamber slide system, Nalge Nunc International). L'expression et la localisation des tétraspanines (CD9, CD63, CD81, CD82 et CD151 (IB4B4) et des chaînes α 1-6 (CD49a-f) et β 1 (CD29) des intégrines ont alors été étudiées après fixation;perméabilisation, à l'aide d'une technique d'immunofluorescence indirecte et observée en microscopie à fluorescence (Fiche technique n°4). Une technique de scoring, sur une échelle de - à ++++ a été utilisée pour apprécier l'intensité des marquages.

Résultats

Les résultats sont regroupés dans le tableau n°1 et certains sont illustrés dans la figure n°12.

CD9 :

L'expression de la tétraspanine CD9 n'a pas été observée au niveau des cellules des lignées 211H, H28 et H596.

Cette tétraspanine était par contre exprimée dans le cytoplasme des cellules des lignées A549, H1435, H1651 et H2087, de façon homogène, bien que l'intensité du marquage fluorescent varie selon les lignées. Les cellules de la lignée A549 présentaient la plus forte intensité de marquage (+++), suivies par celles des lignées H1651 (++) et par celles des lignées H1435 (+) et H0287 (+). Les cellules des lignées A549 et H1435 présentaient de plus un marquage des contacts cellulaires avec une intensité estimée à ++++ et ++ respectivement.

CD63 :

L'expression de la tétraspanine CD63 a été observée au niveau de vésicules cytoplasmiques dans les cellules de toutes les lignées étudiées, avec des intensités de marquage fluorescent variables, comprises entre + (H1435) et +++ (H28 et H596). L'intensité de fluorescence observée au niveau des cellules des lignées A549, 211H, H1651 et H2087 a été évaluée à ++.

CD81 :

L'expression de CD81 n'a été observée qu'au niveau des cellules de la lignée H596 avec un marquage faible (+) péri nucléaire, ainsi qu'au niveau des cellules de la lignée H2087 avec un marquage faible (+) des contacts intercellulaires. Aucun marquage fluorescent n'a été observé au niveau des cellules des lignées A549, 211H, H28, H1435 et H1651.

CD82 :

L'expression de la tétraspanine CD82 n'a été observée sur les cellules d'aucune des lignées étudiées.

CD151 :

L'expression de la tétraspanine CD151 a été observée au niveau du cytoplasme des cellules de toutes les lignées étudiées avec un marquage fluorescent d'aspect granuleux, à l'exception de la lignée H2087 où l'anticorps IB4B4 marquait faiblement (+) les contacts cellulaires. Un tel marquage des contacts cellulaires a également été observé au niveau des cellules des lignées A549 (++) , H1435 (++) et H28 (+++).

CD29 :

L'expression de la chaîne $\beta 1$ (CD29) des intégrines a été observée dans le cytoplasme des cellules des sept lignées étudiées avec un marquage fluorescent homogène dont l'intensité variait de + (211H, H28, H1435, H1651) à +++ (H596), avec une intensité moyenne (++) dans le cas des cellules des lignées A549 et H2087. CD29 a, de plus, été observée au niveau de contacts cellulaires dans toutes les lignées à l'exception de la lignée H596.

CD49a :

La chaîne $\alpha 1$ (CD49a) des intégrines n'a été observée au niveau des cellules d'aucune des lignées étudiées.

CD49b :

L'expression de la chaîne $\alpha 2$ (CD49b) des intégrines n'a été observée qu'au niveau des cellules des lignées A549 et H1435. Les cellules de la lignée A549 présentaient un marquage cytoplasmique faible (+) et celles de la lignée H1435 un marquage également cytoplasmique mais d'intensité variable (+ à ++).

CD49c :

L'expression de CD49c a été observée au niveau des cellules de toutes les lignées tumorales étudiées, avec un marquage cytoplasmique homogène dont l'intensité était variable. Les cellules des lignées H28, H596, H1435 et H2087 exprimaient la chaîne $\alpha 3$ des intégrines avec une intensité faible (+), celles de la lignée H1651 avec une intensité plus forte (++) , et celles de la lignée 211H avec une intensité encore plus importante (+++). Le marquage observé dans le cas des cellules de la lignée A549 était cytoplasmique et homogène, mais toutes les cellules ne présentaient pas la même intensité de marquage qui variait de + à +++ . CD49c a de plus été observée au niveau de contacts cellulaires en ce qui concerne les cellules des lignées A549, H1435, H1651 et H2087.

CD49d :

La chaîne $\alpha 4$ (CD49d) des intégrines n'a été observée qu'au niveau des cellules des lignées 211H et H596 où elle était localisée dans le cytoplasme avec un marquage granuleux, mais une intensité de fluorescence faible (+). Aucun marquage n'a été observé en ce qui concerne les cellules des lignées A549, H28, H1435, H1651 et H2087.

CD49e :

L'expression de CD49e ($\alpha 5$) n'a pas été observée au niveau des cellules des lignées 211H, H28 et H1435. L'expression de cette chaîne des intégrines a par contre été observée dans le cytoplasme des cellules des autres lignées étudiées, H2087, H596, H1651 et A549 avec un marquage homogène dont l'intensité variait de + pour les trois premières à ++ dans le cas de la lignée A549. Un marquage renforcé des contacts cellulaires a également été observé en ce qui concerne les cellules des lignées A549 et H2087.

CD49f :

La chaîne $\alpha 6$ (CD49f) présentait la même expression cytoplasmique homogène que la chaîne $\alpha 5$ en ce qui concerne les lignées étudiées. La localisation de CD49f au niveau de contacts cellulaires n'a par contre été observée que dans le cas des cellules de la lignée H2087.

Tableau n°1 : Localisation du marquage fluorescent observé en microscopie et évaluation de son intensité lors de l'étude en immunofluorescence indirecte de l'expression de 5 membres de la famille des tétraspanines et de 7 chaînes des intégrines au niveau de cellules de différentes lignées tumorales cultivées en Lab-Tek

	A549		211H		H28		H596		H1435		H1651		H2087	
	marquage		marquage		marquage				marquage					
CD9	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+++ ++++	-	-	-	-	-	-	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+ ++	Cytoplasmique diffus	++	Cytoplasmique diffus	+
CD63	Vésicules cytoplasmiques	++	Vésicules cytoplasmiques	++	Vésicules cytoplasmiques	+++	Vésicules cytoplasmiques	+++	Vésicules cytoplasmiques	+	Vésicules cytoplasmiques	++	Vésicules cytoplasmiques	++
CD81	-	-	-	-	-	-	Péri nucléaire	+	-	-	-	-	Contacts cellulaires	+
CD82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD151	Cytoplasmique granuleux Contacts cellulaires	+ ++	Cytoplasmique granuleux	+	Cytoplasmique granuleux Contacts cellulaires	++ +++	Cytoplasmique granuleux	++	Cytoplasmique granuleux Contacts cellulaires	+ ++	Cytoplasmique granuleux	++	Contacts cellulaires	+
CD29	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	++ +++	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+ ++	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+ ++	Cytoplasmique diffus	+++	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+ ++	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+ ++	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	++ +++
CD49a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD49b	Cytoplasmique diffus	+	-	-	-	-	-	-	Cytoplasmique diffus hétérogène	+ à ++	-	-	-	-
CD49c	Cytoplasmique diffus hétérogène Contacts cellulaires	+ à +++ ++++	Cytoplasmique diffus	+++	Cytoplasmique diffus	+	Cytoplasmique diffus	+	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+ ++	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	++ +++	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+ ++
CD49d	-	-	Cytoplasmique granuleux	+	-	-	Cytoplasmique granuleux	+	-	-	-	-	-	-
CD49e	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	++ +++	-	-	-	-	Cytoplasmique diffus	+	-	-	Cytoplasmique diffus	+	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+ ++
CD49f	Cytoplasmique diffus	+	-	-	-	-	Cytoplasmique diffus	+	-	-	Cytoplasmique diffus	+	Cytoplasmique diffus Contacts cellulaires	+ ++

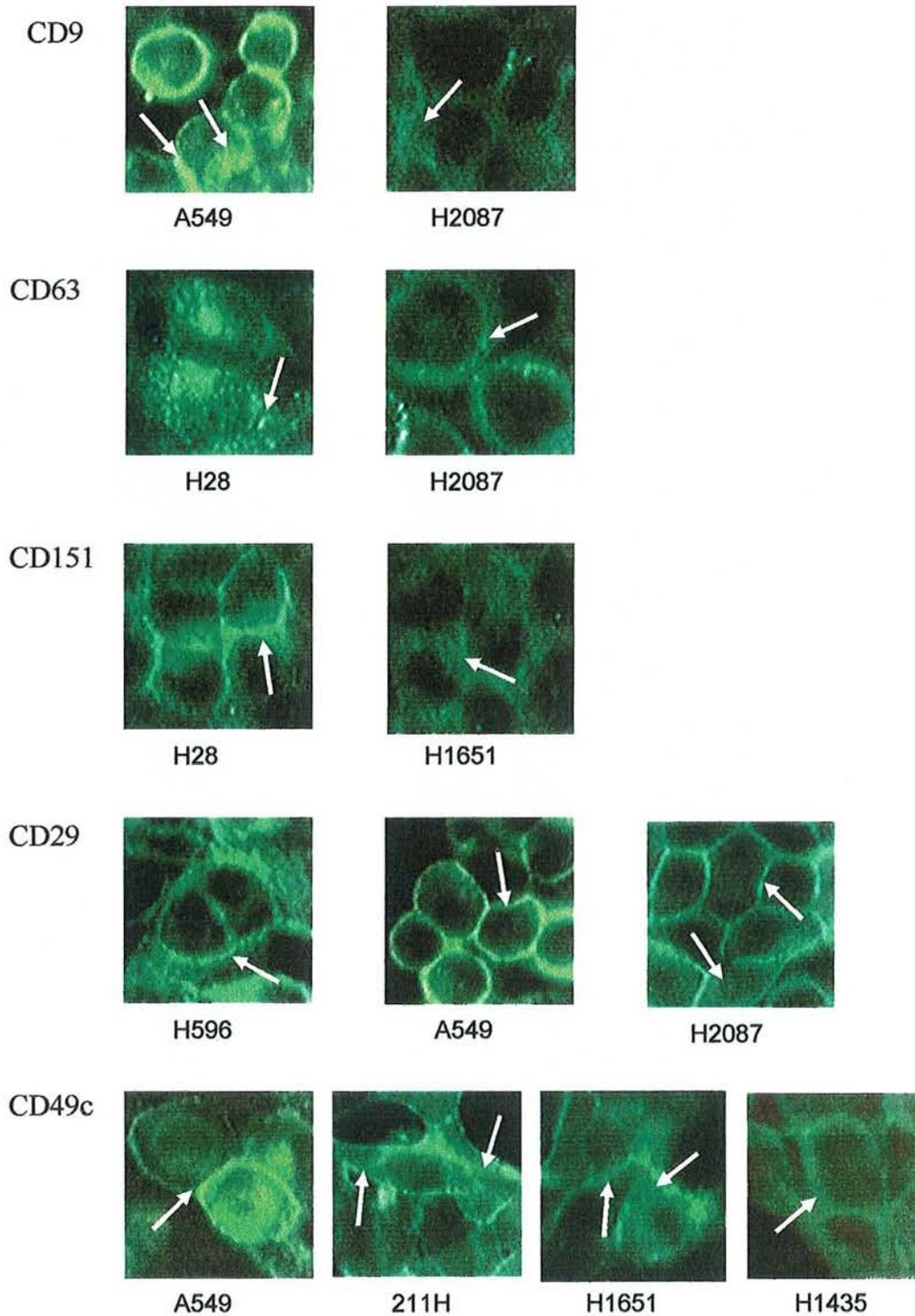


Figure n°12 : Marquages *in situ* des tétraspanines CD9, CD63 et CD151, et des chaînes CD29 et CD49c des intégrines

Exemples de marquages *in situ* de cellules de différentes lignées tumorales adhérentes obtenus par immunofluorescence indirecte avec des anticorps dirigés contre les tétraspanines CD9, CD63 et CD151, ainsi que contre les chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines. Grossissement x400. Les flèches correspondent à des commentaires du texte.

4. Détermination du profil d'expression et de la localisation de tétraspanines et de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ au niveau de cellules saines

Matériels et méthodes

Les cellules issues d'explants de trois trachées et d'un larynx ont été obtenues à partir de tissus provenant de dons d'organes (CRB Nancy) et ont été cultivées au laboratoire (Fiche technique n°5) avant étude de l'expression de tétraspanines et d'intégrines par une technique d'immunofluorescence indirecte (Fiche technique n°4) sur cytocentrifugats (Fiche technique n°6).

Résultats

Les résultats sont regroupés dans le tableau n°2 et certains sont illustrés dans la figure n°13.

CD9 :

Un nombre restreint de cellules issues des trachées 1 et 2 présentait une expression de la tétraspanine CD9 au niveau cytoplasmique et cela avec une intensité du marquage fluorescent faible (+/-). Les cellules issues de la troisième trachée et de l'explant de larynx présentaient également une expression cytoplasmique de CD9, mais avec une intensité plus importante (+). De plus, les cellules de la trachée 3 présentaient un marquage renforcé (++) de certains contacts cellulaires.

CD63 :

L'expression de la tétraspanine CD63 était localisée dans des vésicules cytoplasmiques avec un marquage important (++) au niveau des cellules des trachées 2 et 3 et de celles de larynx. Les cellules issues de la première trachée présentaient un marquage moindre.

CD82 :

L'expression de la tétraspanine CD82 a été observée au niveau des cellules de tous les échantillons étudiés avec un marquage du cytoplasme d'aspect granuleux et des intensités du marquage fluorescent variant de + (trachée 2) à ++ (trachée 1 et larynx) et enfin à +++ (trachée 3).

CD151 :

L'expression de la tétraspanine CD151 a été observée au niveau du cytoplasme des cellules de la trachée 1, avec un marquage d'aspect granuleux et une localisation péri nucléaire dans certaines d'entre elles. Les cellules de la trachée 3 présentaient le même type d'expression et de localisation de cette tétraspanine avec en plus une localisation au niveau de contacts cellulaires. Dans le cas des cellules de la trachée 2 et du larynx, l'expression de CD151 était localisée au niveau du cytoplasme avec un marquage d'aspect granuleux, mais pas sur la totalité des cellules.

CD29 :

L'expression de la chaîne $\beta 1$ (CD29) des intégrines a été observée au niveau des cellules de tous les échantillons cellulaires étudiés avec un marquage homogène du cytoplasme d'intensité variable. L'expression de CD29 était la plus forte au niveau des cellules de la trachée 1 (+++) et la plus faible au niveau de celles du larynx (+). Un marquage de contacts cellulaires a également été observé au niveau des cellules issues de la trachée 3.

CD49c :

L'expression de la chaîne $\alpha 3$ des intégrines a été observée dans le cytoplasme des cellules de tous les échantillons testés avec un marquage homogène, mais une intensité de fluorescence variable (+/- : trachée 1 ; ++ : trachée 3). Un marquage de contacts cellulaires a de plus été observé dans le cas des cellules issues des trachées 2 et 3 (++ et +++).

Tableau n°2 : Localisation du marquage fluorescent observé en microscopie et évaluation de son intensité lors de l'étude en immunofluorescence indirecte sur cytocentrifugats de l'expression de 4 membres de la famille des tétraspanines et de 2 chaînes des intégrines au niveau de cellules issues d'explants de trachée et de larynx

	Trachée 1		Trachée 2		Trachée 3		Larynx	
	Marquage		Marquage		Marquage		Marquage	
CD9	Cytoplasmique diffus hétérogène	+/-	Cytoplasmique diffus hétérogène	+/-	Cytoplasmique diffus Contact cellulaire hétérogène	+ ++	Cytoplasmique diffus hétérogène	+
CD63	Vésicules cytoplasmiques	+/-	Vésicules cytoplasmiques	++	Vésicules cytoplasmiques	++	Vésicules cytoplasmiques	++
CD82	Cytoplasmique granuleux	++	Cytoplasmique granuleux	+	Cytoplasmique granuleux	+++	Cytoplasmique granuleux	++
CD151	Cytoplasmique granuleux Péri nucléaire hétérogène	+ ++	Cytoplasmique granuleux hétérogène	+	Cytoplasmique granuleux Contact cellulaire Péri nucléaire hétérogène	+ ++ ++	Cytoplasmique granuleux hétérogène	++
CD29	Cytoplasmique diffus	+++	Cytoplasmique diffus	++	Cytoplasmique diffus Contact cellulaire	++ +++	Cytoplasmique diffus	+
CD49c	Cytoplasmique diffus	+/-	Cytoplasmique diffus Contact cellulaire	+ ++	Cytoplasmique diffus Contact cellulaire	++ +++	Cytoplasmique diffus	+

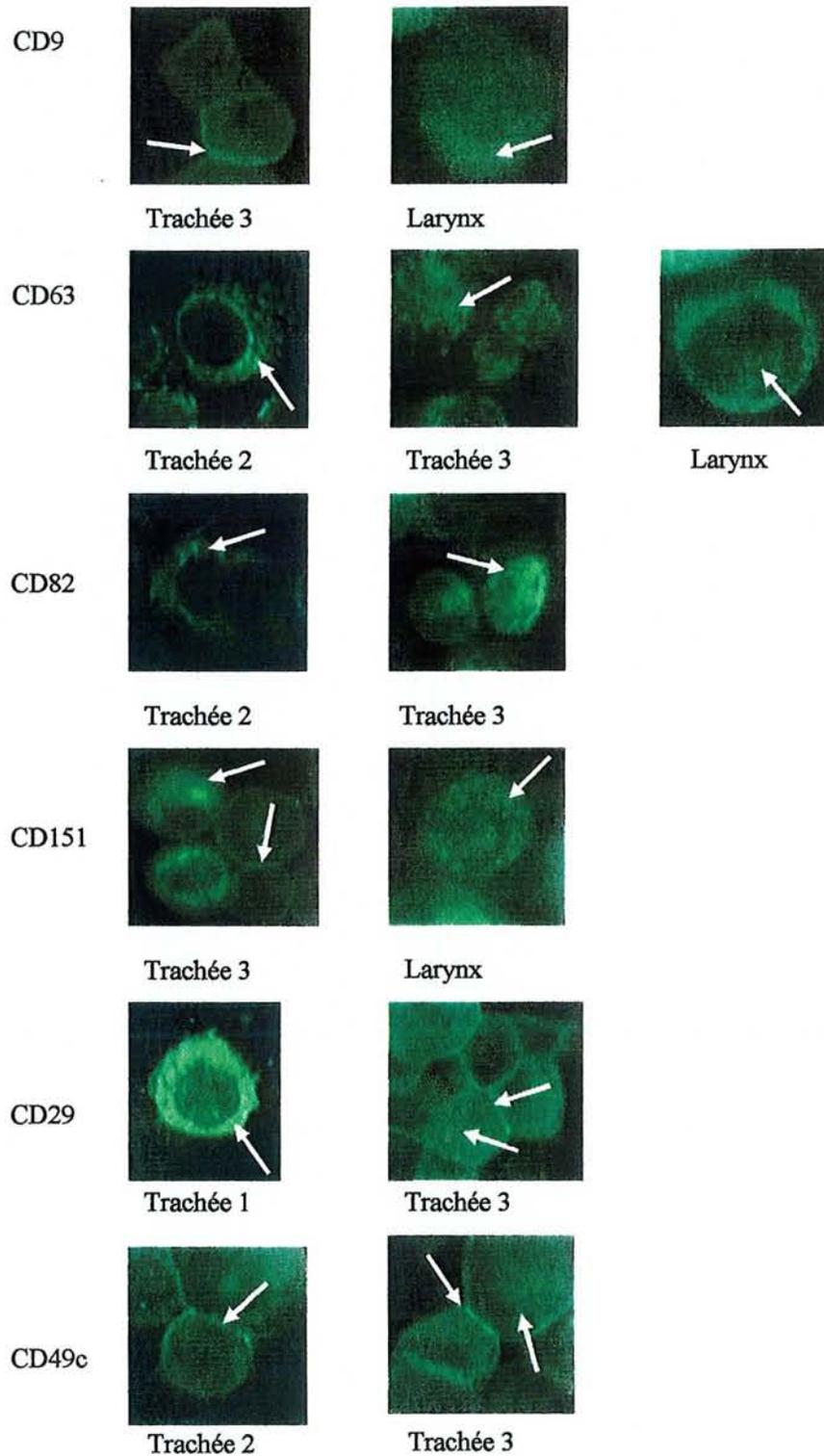


Figure n°13 : Marquages *in situ* des tétraspanines CD9, CD63, CD82 et CD151, et des chaînes CD29 et CD49c des intégrines

Exemples de marquages *in situ* de cellules d'explants de trachée ou de larynx obtenus par immunofluorescence indirecte avec des anticorps dirigés contre les tétraspanines CD9, CD63, CD82 et CD151, ainsi que contre les chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines. Grossissement x400. Les flèches correspondent à des commentaires du texte.

5. Expression des tétraspanines et de la chaîne $\beta 1$ des intégrines sur coupes à la congélation de tissus pulmonaires sains et tumoraux

Matériel et méthodes

Patients et échantillons tissulaires

Les prélèvements utilisés lors de cette étude ont été fournis par le service d'Anatomie Pathologique du Pr Vignaud, après exérèse chirurgicale à visée curative réalisée au service de Chirurgie Générale et Urgences du Pr Grosdidier et du Dr Siat à l'Hôpital Central du CHU de Nancy.

Les échantillons tissulaires consistaient en des biopsies pulmonaires réalisées dans des zones suspectées saines et tumorales. L'analyse histologique a été réalisée par les médecins du service d'Anatomie Pathologique en vue de la caractérisation du type de cancer et de l'évaluation de son stade selon la classification TNM (Fiche technique n°7). Aucun patient ne présentait de métastase, par contre 11 d'entre eux présentaient une invasion de ganglions lymphatiques proximaux (N1-2).

Les prélèvements tissulaires étudiés provenaient de 21 patients, 17 hommes et 4 femmes, avec une moyenne d'âge de 61 ± 10 ans. Dix patients présentaient un adénocarcinome et 11 un carcinome (Tableau n°3).

Méthode

Une technique d'immunofluorescence indirecte sur coupe à la congélation (Fiche technique n°6) a été utilisée afin de caractériser l'expression des tétraspanines CD9, CD82 et CD151 et de la chaîne $\beta 1$ des intégrines dans les tissus pulmonaires suspectés sains et tumoraux.

Toutes les lames ont été examinées par deux investigateurs différents qui ne connaissaient ni l'anticorps monoclonal utilisé, ni la nature saine ou tumorale du tissu, ni les données cliniques du patient. L'intensité du marquage fluorescent au niveau des cellules pulmonaires a été évaluée à l'aide d'une échelle de scoring de 0 à 4.

Tableau n°3 : Données cliniques des patients étudiés

Type de cancer	Sexe	Age (années)	Stade tumoral
Carcinomes (n = 11)			
	M	59	T1/2N0
	M	53	T1N1
	M	69	T2N0
	F	56	T2N0
	M	60	T2N0
	M	68	T2/3N0
	M	61	T2N1/2
	M	45	T2N2
	M	55	T2N2
	M	61	T3N0
	M	71	T3N2
Adénocarcinomes (n=10)			
	F	65	T1N1
	F	53	T1N2
	M	75	T2N0
	M	59	T2N0
	M	50	T2N0
	M	81	T2N0
	F	75	T2N1
	M	53	T2N1
	M	44	T2N2
	M	56	T4N2
	17 M / 4 F	61 + 10 ans	10 N0 / 11 N1-2

Résultats

Comparaison de l'expression des marqueurs selon la nature saine ou tumorale du tissu

Une expression significativement plus importante des molécules CD9, CD29, CD82 et CD151 a été observée dans le tissu sain par rapport au tissu tumoral (respectivement $p < 0,0001$, test t de Student apparié ; $p = 0,0002$, test de Wilcoxon ; $p = 0,0002$, test de Wilcoxon ; $p < 0,0001$, test t de Student apparié).

Comparaison de l'expression des marqueurs selon la nature des cancers

Aucune différence significative de l'expression des différents marqueurs n'a été observée entre les patients présentant un carcinome ou un adénocarcinome.

Comparaison de l'expression des marqueurs selon l'extension ou non ganglionnaire

Une expression significativement plus importante de CD9 a été montrée au niveau du tissu tumoral chez des patients présentant une atteinte ganglionnaire par comparaison à des patients sans atteinte ganglionnaire ($p = 0,01$; test t de Student non apparié). Cependant l'expression de CD9 restait significativement plus faible dans le tissu tumoral des patients présentant une atteinte ganglionnaire par comparaison à leur propre tissu sain ($p = 0,03$, test t de Student apparié), même si le niveau de significativité était plus faible que celui calculé entre l'expression de CD9 dans le tissu tumoral de patients sans atteinte ganglionnaire et leur propre tissu sain ($p = 0,0002$, test t de Student apparié) (Figure n°14).

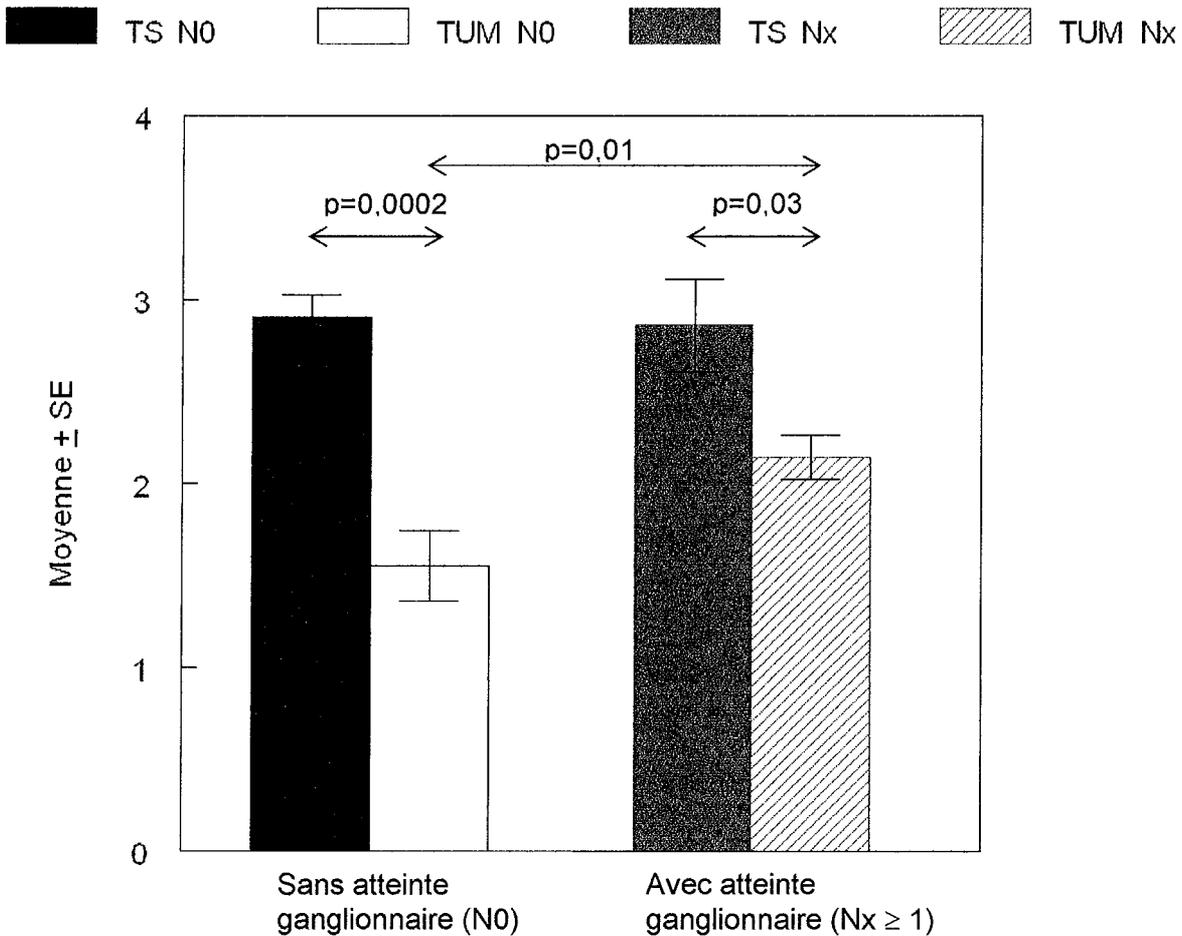


Figure n°14 : Expression de CD9 dans des tissus pulmonaires sains et tumoraux

Histogramme représentant la comparaison des moyennes \pm SE des scores affectés au marquage obtenus pour la tétraspanine CD9 des tissus sains (TS) et tumoraux (TUM) de patients ne présentant pas d'extension tumorale au niveau de ganglions proximaux (N0) et de patients en présentant (Nx). La comparaison des TS N0 aux TUM N0 a été effectuée à l'aide d'un test t de Student apparié, ainsi que celle des TS Nx aux TUM Nx. La comparaison des TUM N0 aux TUM Nx a été effectuée à l'aide d'un test t de Student non apparié.

6. Caractérisation de l'expression de la tétraspanine CD9 à la surface de cellules de lignées tumorales par immunoprécipitation

Matériel et méthodes

Des cellules des lignées tumorales A549, H596, H661 et H2087 ont été cultivées jusqu'à confluence (Fiche technique n°1) et une technique d'immunoprécipitation a alors été utilisée afin de caractériser l'expression de la tétraspanine CD9 à la surface des cellules des quatre lignées après une étape de lyse cellulaire en présence de Triton X100. La présence des protéines ainsi précipitées a été mise en évidence, après électrophorèse en conditions dénaturantes et transfert sur membrane de PVDF, à l'aide d'une technique de chimioluminescence (Fiche technique n°9).

Résultats

Les résultats d'immunoprécipitation de la tétraspanine CD9 à la surface des cellules des lignées tumorales d'origine pulmonaire A549, H596, H661 et H2087 sont présentés sur la figure n°15. La présence d'une seule bande a été observée dans chacune des pistes d'électrophorèse. La masse moléculaire de cette bande a été calculée à l'aide des marqueurs de masse moléculaire déposés de part et d'autre des échantillons étudiés et estimée à 24 kDa, correspondant à celle de CD9. Cette tétraspanine a donc bien été précipitée et les cellules des quatre lignées tumorales étudiées l'expriment à leur surface en conditions d'adhérence.

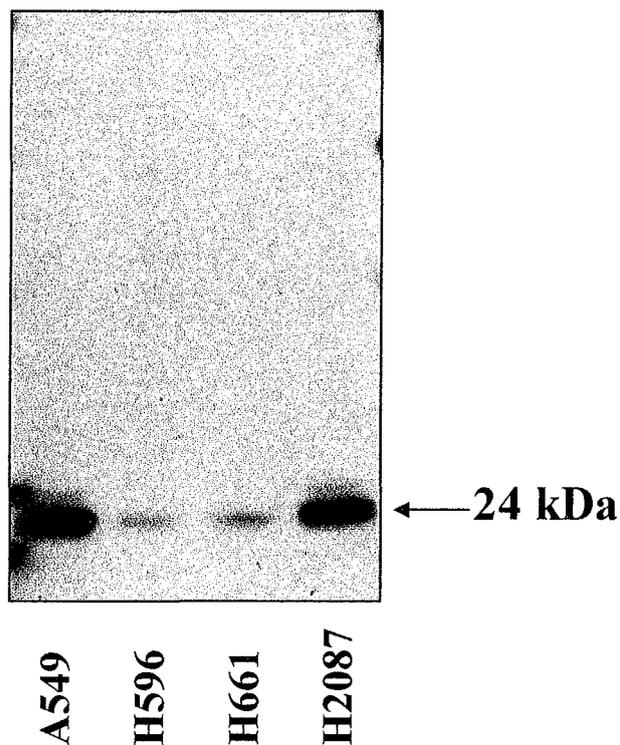


Figure n°15 : Immunoprécipitation de la tétraspanine CD9 à partir des cellules des lignées pulmonaires tumorales A549, H596, H661, H2087

Résultats obtenus lors de l'immunoprécipitation de la tétraspanine CD9 à partir de lysats cellulaires (Triton X100) obtenus à partir des cellules des lignées pulmonaires tumorales A549, H596, H661 et H2087. Les signaux correspondant aux protéines ont été révélés par chimioluminescence à l'aide de la formation d'un complexe biotine-streptavidine couplée à la peroxydase de Raifort. La masse moléculaire des protéines a été calculée à l'aide de marqueurs de taille biotinylés (non indiqués).

7. Comparaison de l'expression et de la localisation de tétraspanines et d'intégrines au niveau de cellules de la lignée tumorale A549 avec ou sans chélation des cations divalents

Matériel et méthodes

Les cellules de la lignée tumorale A549 ont été cultivées jusqu'à confluence (Fiche technique n°1) dans du milieu F12-Ham supplémenté ou non avec 1 mM d'EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans des chambres de culture (Lab-Tek II chamber slide system, Nalge Nunc International). L'expression et la localisation des tétraspanines (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CD151 (IB4B4), Co-029, NAG-2 et TALLA-1/CD231) et des chaînes α 1-6 (CD49a-f) et β 1 (CD29) des intégrines ont alors été étudiées à l'aide d'une technique d'immunofluorescence indirecte et observée en microscopie à fluorescence (Fiche technique n°4).

Résultats

Profil d'expression et localisation des marqueurs sans chélation des cations divalents

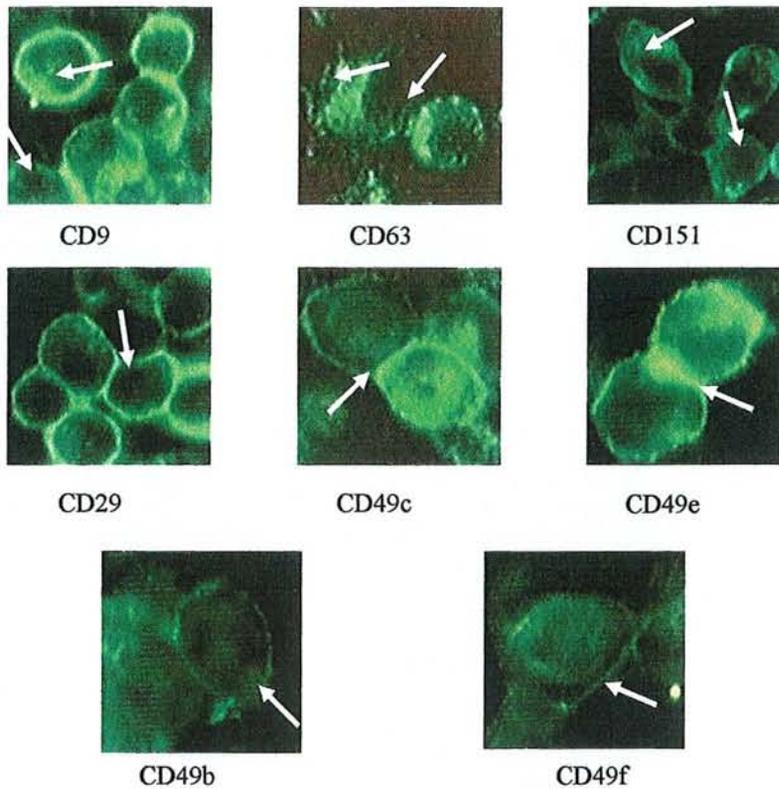
L'anticorps monoclonal anti-CD9 a permis de révéler un marquage important péri cellulaire, renforcé au niveau des contacts cellulaires. L'expression de la tétraspanine CD63 était clairement localisée au niveau de vésicules cytoplasmiques. CD151 était localisée à la périphérie cellulaire et au niveau des contacts cellulaires. La chaîne β 1 (CD29) et les chaînes α 3 (CD49c) et α 5 (CD49e) des intégrines présentaient une localisation péri cellulaire renforcée au niveau des contacts cellulaires. Les chaînes α 2 (CD49b) et α 6 (CD49f) présentaient un marquage péri cellulaire plus discret. Aucun marquage fluorescent n'a été détecté avec les anticorps dirigés contre CD37, CD53, CD81, CD82, Co-029, NAG-2, TALLA-1/CD231, CD49a et CD49d.

Profil d'expression et localisation des marqueurs lors de la chélation des cations divalents

Lors de la chélation des cations divalents contenus dans le milieu nutritif, les couches cellulaires semblaient plus lâches et les cellules mettaient plus de temps à atteindre la confluence.

L'expression de la tétraspanine CD63 était toujours cytoplasmique dans des vésicules. Le marquage observé concernant CD9 était localisé dans le cytoplasme des cellules de la lignée A549. Aucun marquage renforcé des contacts cellulaires n'était détecté pour la tétraspanine CD151. L'expression de trois tétraspanines, non exprimées en conditions non chélatées, était observée dans le cytoplasme des cellules A549 après culture en présence d'EDTA : CD53 avec un marquage fort, CD81 et Co-029. CD29 était la seule chaîne des intégrines à être détectée dans ces conditions de culture, avec une intensité du marquage fluorescent nettement inférieure à celle observée sans EDTA. Aucun marquage fluorescent n'a été détecté avec les anticorps dirigés contre CD37, CD82, NAG-2, TALLA-1/CD231, CD49a-f.

Sans EDTA



En présence d'EDTA (1 mM)

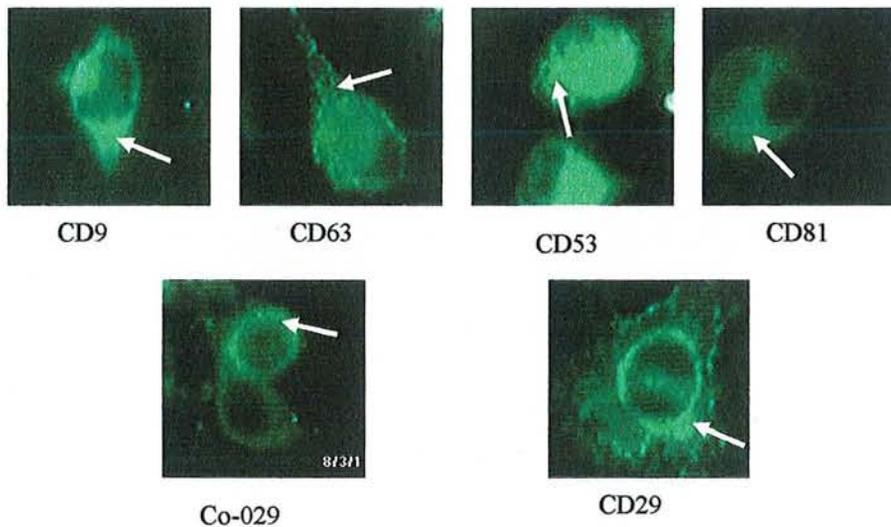


Figure n°16 : Marquages *in situ* de CD9, CD53, CD63, CD81, CD151 et Co-029 et des chaînes $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\beta 1$ des intégrines sur des cellules A549 adhérentes

Exemples de marquages *in situ* de cellules adhérentes de la lignée tumorale A549 obtenus par immunofluorescence indirecte avec des anticorps dirigés contre les tétraspanines CD9, CD53, CD63, CD81, CD151 et Co-029, ainsi que contre les chaînes $\alpha 2$ (CD49b), $\alpha 3$ (CD49c), $\alpha 4$ (CD49e), $\alpha 5$ (CD49f) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines. Grossissement x400. Les flèches correspondent à des commentaires du texte.

8. Comparaison des profils d'expression de tétraspanines et de chaînes des intégrines à la surface des cellules de la lignée tumorale A549 avec ou sans chélation des cations divalents

Matériel et méthodes

Des cellules tumorales de la lignée d'adénocarcinome du poumon A549 ont été cultivées jusqu'à confluence (Fiche technique n°1) dans du milieu F12 Ham complet supplémenté ou non avec 1 mM d'EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les cellules ont ensuite été mises en suspension par utilisation d'une solution de Trypsine-EDTA 0,25 % avant analyse par cytométrie de flux (Fiche technique n°3). La recherche de l'expression membranaire de tétraspanines et de chaînes des intégrines a ainsi pu être effectuée à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les tétraspanines CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CD151 (11B1G4, IB4B4), Co-029, NAG-2, TALLA-1/CD231, et contre les chaînes α 1-6 et β 1 des intégrines. Un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le marqueur lymphocytaire T CD3 a été utilisé comme contrôle. Les résultats sont exprimés en ratio MESF conformément au protocole décrit au chapitre 1.

Résultats

Les résultats sont regroupés dans la figure n°17 et le tableau n°4.

Après culture sans EDTA, parmi les dix tétraspanines étudiées, cinq étaient exprimées à la surface des cellules A549 avec un ratio MESF supérieur au ratio MESF seuil de positivité (1,2) (CD9, CD63, CD81, CD151, NAG-2). De même, parmi les sept chaînes des intégrines testées, cinq également étaient exprimées au niveau de la membrane des cellules (CD29, CD49b,c,e,f).

La culture des cellules en présence d'EDTA réduisait nettement le nombre de molécules exprimées à la surface des cellules A549 parmi celles étudiées. Une seule tétraspanine, CD9, présentait un ratio MESF supérieur au ratio MESF seuil (1,4) et seules trois chaînes des intégrines continuaient à être exprimées, CD49b,c (α 2, α 3) et CD29 (β 1).

La chélation des cations divalents a non seulement réduit le profil d'expression des marqueurs étudiés à la surface des cellules, mais a également diminué l'expression des marqueurs qui continuaient à être exprimés malgré la chélation. Ainsi, la seule tétraspanine à être exprimée dans les deux types de culture, CD9, voit son ratio MESF diminuer de près de moitié avec la chélation, et l'expression des chaînes α 2, β 1 et α 3 diminue de 1/4 à 1/3 respectivement.

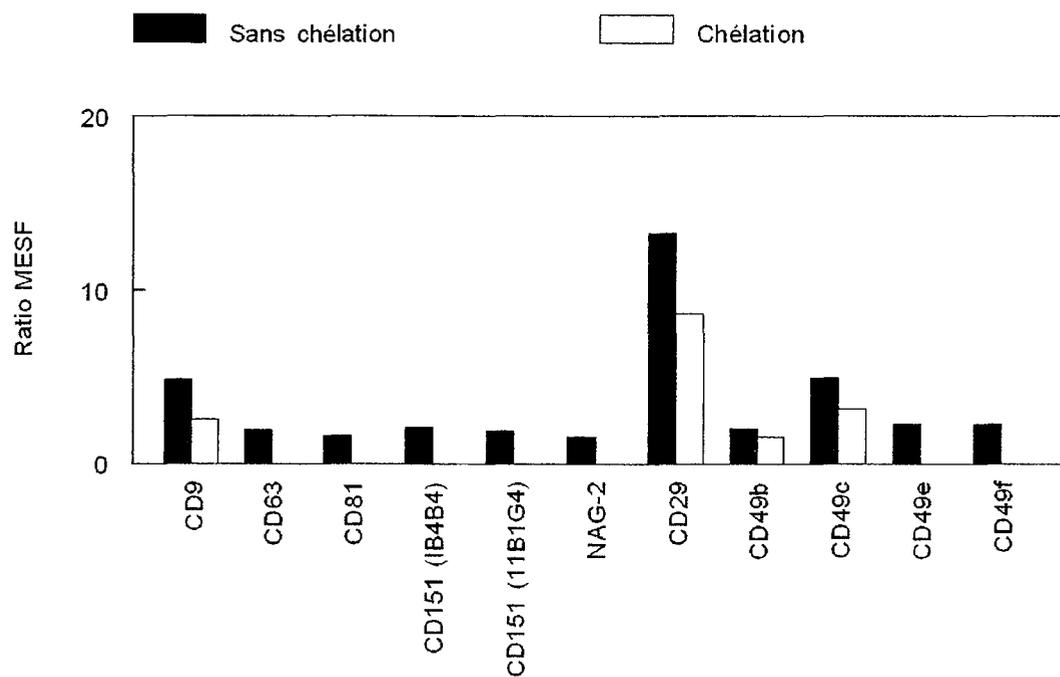


Figure n°17 : Influence d'un chélateur sur l'expression de tétraspanines et d'intégrines à la surface des cellules A549

Histogramme présentant la comparaison des ratios MESF obtenus pour les différents marqueurs étudiés à la surface des cellules de la lignée A549 en présence ou en absence d'un chélateur (EDTA 1mM).

Tableau n°4 : Ratios MESF des molécules étudiées exprimées par les cellules de la lignée A549 en présence ou non d'un chélateur

Les valeurs surlignées en jaune correspondent aux valeurs des marqueurs considérés comme exprimés. Les valeurs du seuil de positivité sont indiquées surlignées en bleu. La dernière colonne présente l'effet chélation calculé avec le rapport Ratio MESF avec chélation / Ratio MESF sans chélation, cet effet n'a été calculé que pour les marqueurs exprimés dans les 2 conditions de culture étudiées.

Molécules testées	Ratio MESF Sans chélation	Ratio MESF Avec chélation	Effet chélation
CD9	4,8	2,6	0,54
CD63	1,9	-(1,3)	
CD81	1,6	-(1,1)	
CD151 (IB4B4)	1,8	-(1,3)	
CD151 (11B1G4)	2,1	-(1,3)	
NAG-2	1,5	-(1,2)	
CD29	13,2	8,6	0,65
CD49b	2	1,5	0,75
CD49c	4,9	3,2	0,65
CD49e	2,3	-(1,2)	
CD49f	2,3	-(1,3)	
Ratio MESF seuil	1,2	1,4	

9. Sécrétion de cytokines par des cellules de lignées tumorales

Matériel et méthodes

Des cellules des lignées tumorales bronchiques A549, H596, H661 et H2087, ont d'abord été cultivées (Fiche technique n°1) (entre 4 et 6 jours selon les lignées, après décongélation) jusqu'à confluence, dans du milieu Quantum 263 (PAA Laboratories, Linz, Autriche) ne contenant pas de cytokine. Le surnageant de culture a ensuite été éliminé et les cellules de nouveau incubées 24 h dans du milieu Quantum 263. Les surnageants de culture, soit environ 10 mL, ont alors été concentrés par lyophilisation et réhydratés dans 1 mL de ce même milieu.

La recherche de 42 cytokines (Fiche technique n°10) a été entreprise dans ces surnageants à l'aide de la trousse RayBio™ Human Cytokine Array III (Tebu-bio SA, Le Perray en Yvelines, France), ainsi que dans un échantillon du milieu de culture traité dans les mêmes conditions, c'est-à-dire 10 mL lyophilisés et réhydratés dans 1 mL de Quantum 263.

Résultats

L'absence de cytokines dans le milieu de culture Quantum 263 a été confirmée.

Pour chaque surnageant des différentes lignées cellulaires étudiées, les contrôles positifs et négatifs étaient conformes aux résultats attendus (Figure n°18).

Les résultats sont présentés dans le tableau n°5.

La présence de la chimiokine IL-8 (CXCL8) et du facteur d'angiogenèse Ang a été observée dans tous les surnageants étudiés.

D'autres molécules étaient présentes seulement dans certains surnageants. Ainsi la cytokine IL-6 et les chimiokines MCP1 (CCL2) et GRO(α , β , ou γ) ont été retrouvées dans deux lignées, tandis que les chimiokines ENA-78 (CXCL5), GRO- α (CXCL1) et RANTES (CCL5) étaient détectées dans une seule lignée.

La présence des 34 autres molécules n'a été mise en évidence dans aucun des surnageants.

Le profil de sécrétion cytokinique varie donc selon la lignée étudiée. Ainsi, les cellules de la lignée H596 sécrètent 6 facteurs différents, alors que celles de la lignée H661 ne sécrètent pas d'autres facteurs que ceux communs à toutes les lignées.

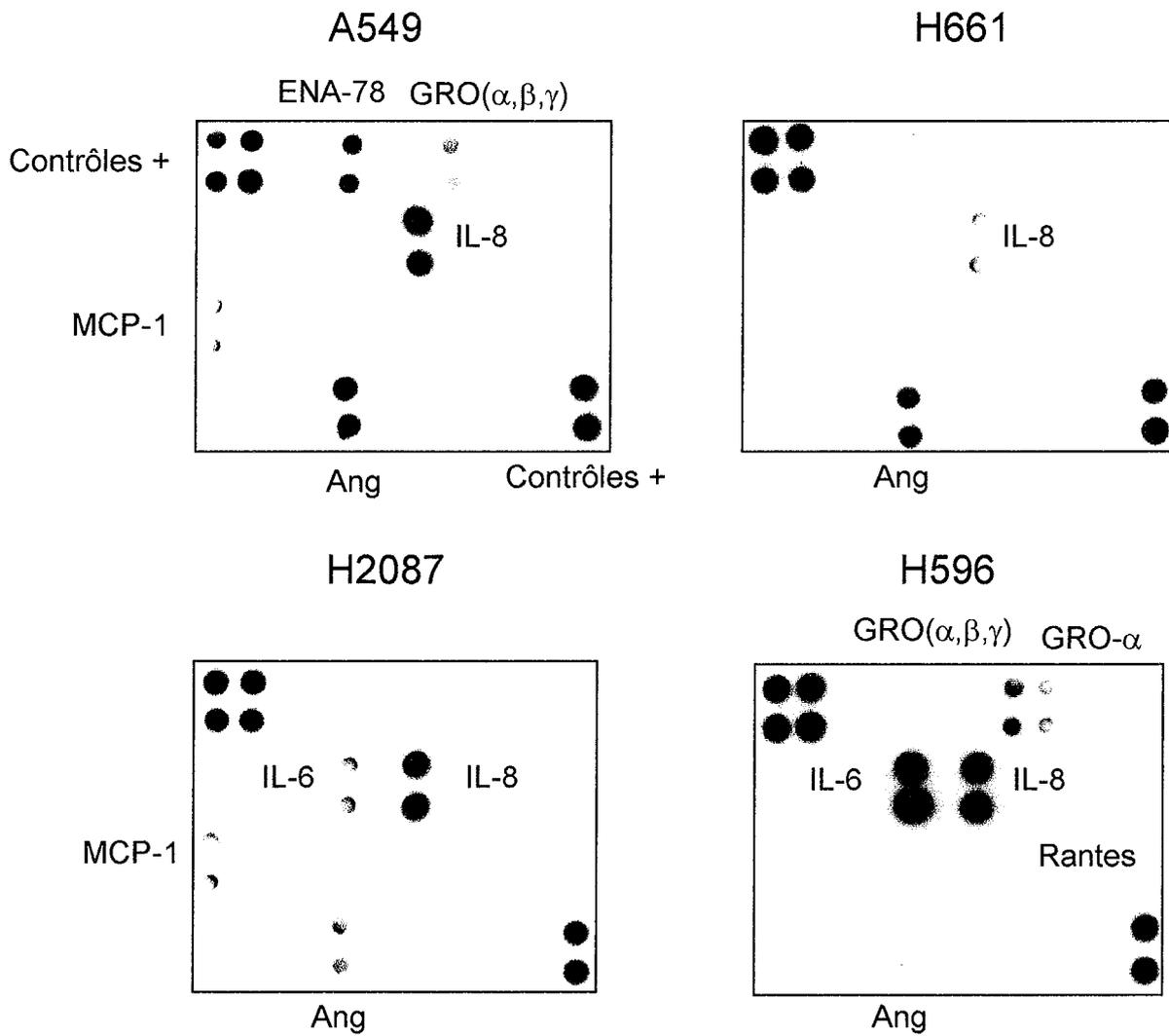


Figure n°18 : Etude de la sécrétion de différents facteurs par les cellules de 4 lignées tumorales d'origine pulmonaire par Cytokine array

Tableau n°5 : Récapitulatif des résultats obtenus lors de l'étude de la sécrétion de différents facteurs par les cellules de 4 lignées tumorales d'origine pulmonaire par Cytokine array

[+] : Présence, [-] : Absence du facteur dans le surnageant étudié. Les résultats du témoin négatif correspondant au milieu de culture seul (Quantum 263) sont présentés en dernière ligne.

Lignées cellulaires	IL-8 (CXCL8)	Ang	IL-6	MCP1 (CCL2)	GRO (α,β,γ)	ENA-78 (CXCL5)	GRO-α (CXCL1)	RANTES (CCL5)
A549	+	+	-	+	+	+	-	-
H596	+	+	+	-	+	-	+	+
H661	+	+	-	-	-	-	-	-
H2087	+	+	+	+	-	-	-	-
Quantum 263	-	-	-	-	-	-	-	-

10. Modulation de l'expression de tétraspanines et de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ à la surface de cellules de quatre lignées tumorales par quatre stimuli cytokiniques différents : TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-12

Matériels et méthodes

Les cellules des lignées A549, H596, H661 et H2087 ont été cultivées jusqu'à confluence (Fiche technique n°1), dans du milieu Quantum 263 (PAA Laboratories) ne contenant pas de cytokines, dans les puits d'une plaque de culture (Multiwell™ 6 well, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). La monocouche cellulaire a ensuite été incubée 4, 12 et 24h avec du milieu Quantum 263 en présence de quatre concentrations (0,1, 1, 10 et 100 ng/mL) de quatre cytokines différentes, TNF- α , IL-10, IL-12(p40 + p70) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), IFN- γ (Sigma). L'expression des tétraspanines CD9, CD63, CD81 et CD82, ainsi que celle des chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) a enfin été étudiée par cytométrie de flux (Fiche technique n° 3) et les résultats exprimés sous forme de ratio MESF comparés à la valeur du seuil de positivité.

Résultats

Lignée A549 :

Le phénotype de base d'expression des tétraspanines et des chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines par les cellules de la lignée A549 a été déterminé à l'aide des valeurs de ratio MESF obtenues pour des cellules non stimulées aux différents temps d'étude (4h, 12h et 24h) comparées au seuil de positivité correspondant (Tableau n°6). Il apparaît que les tétraspanines CD9 et CD63, ainsi que les chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines sont exprimées par les cellules A549. CD81 a également été considérée comme exprimée par ces cellules puisque la valeur de ratio MESF obtenue après 4h d'incubation est supérieure à la valeur seuil et ce, malgré des valeurs de ratio MESF proches de la valeur seuil à 12 et 24h d'incubation. La tétraspanine CD82 n'a pas été considérée comme exprimée par les cellules A549 puisque les valeurs de ratio MESF obtenues étaient soit inférieures soit très proches de la valeur du seuil de positivité.

TNF- α (Tableau n°6)

- Aucune variation d'expression n'a été observée après 4h d'incubation avec les 4 concentrations de TNF- α testées.
- Seule l'expression de CD29 variait après 12h d'incubation et était augmentée après incubation avec 1 et 10 ng/mL de TNF- α .
- Après 24h d'incubation, seule l'expression de CD82 était augmentée à la surface des cellules A549 avec 10 et 100 ng/mL de TNF- α .

IFN- γ (Tableau n°6)

- Le phénotype d'expression des différents marqueurs étudiés n'était pas modifié quels que soient la concentration d'IFN- γ et le temps d'incubation.

IL-10 (Tableau n°7)

- Les concentrations d'IL-10 utilisées ne modifiaient pas le phénotype d'expression des molécules étudiées après 4 et 12h d'incubation, sauf pour CD82, surexprimée après incubation pendant 4h avec 0,1 ng/mL de cette cytokine.
- Par contre, l'expression de CD29 et de CD49c était augmentée après 24h d'incubation avec 0,1, 1 et 10 ng/mL d'IL-10, et l'expression de ces deux molécules était diminuée avec 100 ng/mL et la même durée d'incubation avec cette cytokine.
- L'expression des marqueurs CD63 et CD81 n'était plus observée après 24h d'incubation avec 1 ng/mL d'IL-10.

IL-12 (Tableau n°7)

- L'expression de CD63 était augmentée après 4h d'incubation avec 100 ng/mL d'IL-12.
- CD82 était exprimée quelle que soit la concentration d'IL-12 utilisée après 4h d'incubation et son expression était même augmentée après incubation avec 0,1 et 1 ng/mL d'IL-12. CD82 était également exprimée après 12h d'incubation avec 1 ng/mL d'IL-12.
- L'expression de CD29 et de CD49c était augmentée de façon similaire après incubation 24h avec 0,1 ; 1 et 10 ng/mL d'IL-12 et leur expression était diminuée après incubation 24h avec 100 ng/mL d'IL-12.

Les cytokines IL-10 et IL-12 semblent ainsi avoir les mêmes effets sur l'expression de CD29 et de CD49c après 24h d'incubation et quelles que soient les concentrations utilisées.

L'expression de la tétraspanine CD9 par les cellules A549 n'est par contre modifiée par aucune des cytokines utilisées aux différents temps d'incubation étudiés.

Lignée H596

L'immunophénotypage des cellules de la lignée H596 a permis de mettre en évidence l'expression des tétraspanines CD9 et CD63, ainsi que celle des chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines. L'expression des tétraspanines CD81 et CD82 n'a par contre pas été observée (Tableau n°8).

TNF- α (Tableau n°8)

- L'incubation pendant 4h des cellules H596 avec différentes concentrations de TNF- α ne modifiait pas l'expression membranaire des molécules étudiées.
- Après 12h d'incubation, seule l'expression de CD29 était modifiée avec une diminution en présence de 100 ng/mL de TNF- α .
- Les chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines étaient les seules molécules étudiées présentant une modification de leur expression membranaire après 24h d'incubation, et cela en présence de 0,1 ng/mL de TNF- α .

IFN- γ (Tableau n°8)

- Après 4h d'incubation, la seule modification du phénotype d'expression des cellules H596 était l'augmentation de l'expression de CD29 en présence de 100 ng/mL d'IFN- γ .
- Après 12h d'incubation, c'est la chaîne $\alpha 3$ (CD49c) des intégrines qui présentait une modification de son expression avec une diminution de celle-ci en présence de 100 ng/mL d'IFN- γ .
- L'expression de CD29 était encore la seule à être modifiée et augmentée après 24h d'incubation en présence de 0,1, 1 et 10 ng/mL d'IFN- γ .

IL-10 (Tableau n°9)

- CD29 est la seule des molécules étudiées dont l'expression variait en présence d'IL-10. Son expression était augmentée après 4h d'incubation en présence de 10 ng/mL d'IL-10, et diminuée après 12h d'incubation en présence de 100 ng/mL et après 24h en présence de 0,1 et 10 ng/mL d'IL-10.

IL-12 (Tableau n°9)

- La seule modification observée après incubation avec les différentes concentrations d'IL-12 utilisées était l'augmentation de l'expression de CD29 après 24h d'incubation en présence de 10 ng/mL de cette cytokine.

Les quatre cytokines utilisées afin d'étudier la modulation de l'expression des tétraspanines et des intégrines n'influencent donc que celle des chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines au niveau des cellules de la lignée H596.

Lignée H661

L'immunophénotypage réalisé 12 et 24h après le changement de milieu des cellules de la lignée H661 sans modulation cytokinique a permis de mettre en évidence l'expression membranaire des tétraspanines CD9 et CD63, ainsi que celle des chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines par ces cellules. Les tétraspanines CD81 et CD82 n'ont pas été considérées comme exprimées par les cellules de cette lignée. Après 4h d'incubation, il est intéressant de remarquer que les ratios MESF obtenus pour CD63 et CD49c étaient inférieurs au ratio MESF seuil, suggérant que le simple changement de milieu peut influencer l'expression membranaire de ces deux molécules (Tableau n°10).

TNF- α (Tableau n°10)

- Après 4h d'incubation en présence de TNF- α à toutes les concentrations utilisées, l'expression de CD49c était restaurée. De même, l'expression de la tétraspanine CD63 était observée après 4h d'incubation en présence de 1, 10 et 100 ng/mL de TNF- α .
- Aucune modification d'expression n'a été observée après 12h d'incubation quelle que soit la concentration de TNF- α utilisée.
- Après 24h d'incubation, la seule variation observée concernait CD29 dont l'expression était augmentée en présence de 10 ng/mL de TNF- α .

IFN- γ (Tableau n°10)

- L'expression de CD49c n'était pas rétablie après une incubation de 4h en présence d'IFN- γ , contrairement à l'effet observé après ajout de TNF- α . De même, il n'a pas été possible de déterminer un effet de l'IFN- γ sur l'expression de la tétraspanine CD63 puisque les ratios MESF obtenus sont tangents par rapport à la valeur seuil de positivité en présence de toutes les concentrations utilisées.
- Après 12h d'incubation en présence d'IFN- γ , seule CD29 présentait une modification de son expression et cela en présence de 100 ng/mL d'IFN- γ où elle était diminuée.
- Après 24h d'incubation, l'expression de CD49c n'a pas été observée en présence de 1 ng/mL d'IFN- γ .

IL-10 (Tableau n°11)

- Une incubation de 4h ne restaurait pas l'expression de la chaîne $\alpha 3$ (CD49c) des intégrines et cela quelle que soit la concentration d'IL-10 utilisée, contrairement à l'incubation en présence de TNF- α . Par contre, l'expression de la tétraspanine CD63 était rétablie avec les différentes concentrations en IL-10 utilisées. L'expression de CD29 était de plus diminuée en présence de 10 ng/mL d'IL-10.
- La seule modification d'expression observée après 12h d'incubation concernait CD29 dont l'expression était diminuée en présence de 1 ng/mL d'IL-10.
- De même, l'expression de CD29 était diminuée, toujours en présence de 1 ng/mL d'IL-10 après 24h d'incubation, associée à une diminution de l'expression de la tétraspanine CD63 à la même concentration en IL-10. L'expression de CD49c n'a pas été observée après 24h d'incubation en présence de 100 ng/mL d'IL-10.

IL-12 (Tableau n°11)

- L'incubation des cellules de la lignée H661 pendant une durée de 4h en présence des différentes concentrations d'IL-12 utilisées a induit une restauration de l'expression de CD49c et de la tétraspanine CD63. L'expression de CD63 était même augmentée en présence de 100 ng/mL d'IL-12. De plus, l'expression de CD29 était diminuée en présence de 0,1, 1 et 10 ng/mL d'IL-12 après 4h d'incubation.
- L'expression de la chaîne $\beta 1$ (CD29) des intégrines était la seule à être modifiée et diminuée après une incubation de 12h et cela en présence de 0,1 ng/mL d'IL-12.

- Après une incubation de 24h, la présence de 10 ng/mL d'IL-12 induisait une diminution d'expression de la chaîne $\beta 1$ des intégrines. La présence de 100 ng/mL d'IL-12 induisait également une diminution de l'expression de CD29 et avec cette concentration, l'expression de CD49c n'était plus observée.

Lignée H2087

Les tétraspanines CD9, CD63 et CD82, ainsi que les chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines ont été considérées comme exprimées par les cellules H2087 non stimulées.

TNF- α (Tableau n°12)

- La tétraspanine CD9 présentait une expression diminuée après 4h d'incubation en présence de 1 et 10 ng/mL de TNF- α .
- De même, l'expression de CD29 était diminuée après 4h d'incubation quelle que soit la concentration de TNF- α utilisée, et celle de CD49c était diminuée en présence de 0,1, 1 et 10 ng/mL de cette cytokine.
- Aucune modification de l'expression des molécules CD9, CD63, CD29 et CD49c n'a été observée après 12h d'incubation et cela, quelle que soit la concentration de TNF- α utilisée, contrairement à celle de CD82 qui n'était plus observée.
- Après 24h d'incubation, seule la tétraspanine CD63 présentait une expression modifiée et augmentée en présence de 10 et 100 ng/mL de TNF- α .

IFN- γ (Tableau n°12)

- Les tétraspanines CD9 et CD63 présentaient une expression augmentée après 4h d'incubation en présence de toutes les concentrations d'IFN- γ utilisées.
- De même, l'expression de CD29 était augmentée en présence de 0,1, 10 et 100 ng/mL d'IFN- γ et celle de CD49c était également augmentée en présence de 0,1 et 100 ng/mL d'IFN- γ .
- Aucune modification d'expression des tétraspanines CD9 et CD63, et des chaînes $\alpha 3$ et $\beta 1$ des intégrines n'a été observée quelle que soit la concentration en IFN- γ utilisée après 12 et 24h d'incubation. Par contre, l'expression de la tétraspanine CD82 n'était plus observée à 12h à partir de 1 ng/mL d'IFN- γ et à 1 ng/mL à 24h.

IL-10 (Tableau n°13)

- L'expression de CD29 et de CD49c était diminuée quelle que soit la concentration en IL-10 utilisée après 4h d'incubation.
- De même, la tétraspanine CD9 présentait une expression diminuée en présence de 0,1 et 1 ng/mL d'IL-10 après la même durée d'incubation.
- Aucune modification d'expression des molécules étudiées n'a été observée quelle que soit la concentration d'IL-10 utilisée après 12h d'incubation.
- Après 24h d'incubation, seule l'expression de la tétraspanine CD63 était modifiée et augmentée et cela en présence de 1, 10 et 100 ng/mL d'IL-10.

IL-12 (Tableau n°13)

- CD63 est la seule tétraspanine dont l'expression était modifiée et augmentée après 4h d'incubation en présence de 100 ng/mL d'IL-12.
- La chaîne $\beta 1$ (CD29) des intégrines présentait une expression augmentée quelle que soit la concentration d'IL-12 utilisée après 4h d'incubation. De même, l'expression de la chaîne $\alpha 3$ (CD49c) des intégrines était augmentée en présence de 0,1 et 1 ng/mL d'IL-12.
- Aucune modification d'expression des molécules étudiées n'a été observée quelle que soit la concentration en IL-12 utilisée après 12 et 24h d'incubation.

Tableau n°6 : Immunomodulation des cellules A549 par le TNF- α et l'IFN- γ

Les ratios MESF obtenus pour chacune des molécules étudiées après immunomodulation ont été comparés d'abord au seuil de positivité,

positifs tangents

puis au ratio $\pm 20\%$ obtenu sans immunomodulation.

augmentation diminution

	A549	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
TNF- α 4h	CD9	4,6	5,0	5,0	4,5	4,5
	CD29	13,3	12,3	13,6	12,8	12,5
	CD49c	10,0	10,2	8,7	9,8	10,0
	CD63	1,6	1,6	1,7	1,6	1,8
	CD81	1,2	1,2	1,2	1,1	1,2
	CD82	1,1	1,0	1,0	1,1	1,1
	Seuil	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1
TNF- α 12h	CD9	3,3	2,9	3,2	3,0	3,6
	CD29	7,2	7,5	8,8	9,1	8,2
	CD49c	6,5	5,7	6,5	6,1	6,2
	CD63	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
TNF- α 24h	CD9	3,5	4,4	4,5	5,1	5,1
	CD29	5,6	14,4	11,3	17,8	9,7
	CD49c	6,0	11,0	8,5	10,0	7,7
	CD63	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2
	CD82	1,0	1,1	1,1	1,2	1,3
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1

	A549	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IFN- γ 4h	CD9	4,6	4,4	4,5	4,7	4,7
	CD29	13,3	11,1	12,5	13,8	13,3
	CD49c	10,0	9,0	10,5	11,1	10,6
	CD63	1,6	1,3	1,6	1,7	1,7
	CD81	1,2	1,1	1,2	1,2	1,2
	CD82	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IFN- γ 12h	CD9	3,3	3,1	3,1	3,0	3,1
	CD29	7,2	6,2	7,7	7,5	7,3
	CD49c	6,5	6,1	6,9	6,2	6,1
	CD63	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IFN- γ 24h	CD9	3,5	3,6	2,3	2,7	2,4
	CD29	5,6	10,2	5,2	6,4	4,9
	CD49c	6,0	9,1	6,8	7,4	5,6
	CD63	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1

Tableau n°7 : Immunomodulation des cellules A549 par l'IL-10 et l'IL-12

Les ratios MESF obtenus pour chacune des molécules étudiées après immunomodulation ont été comparés d'abord au seuil de positivité,

positifs tangents

puis au ratio $\pm 20\%$ obtenu sans immunomodulation.

augmentation diminution

	A549	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IL-10 4h	CD9	4,6	4,2	4,2	4,2	4,2
	CD29	13,3	12,8	14,2	14,2	12,9
	CD49c	10,0	9,5	10,5	10,3	10,0
	CD63	1,6	1,5	1,7	1,8	1,7
	CD81	1,2	1,2	1,2	1,1	1,2
	CD82	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IL-10 12h	CD9	3,3	3,0	3,3	3,2	3,3
	CD29	7,2	7,4	7,8	7,0	6,7
	CD49c	6,5	6,1	6,9	6,4	6,4
	CD63	1,2	1,1	1,1	1,2	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IL-10 24h	CD9	3,5	4,0	2,9	3,9	3,3
	CD29	5,6	13,4	10,2	10,5	3,9
	CD49c	6,0	8,5	7,7	9,6	4,7
	CD63	1,2	1,2	1,0	1,3	1,5
	CD81	1,1	1,1	0,9	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,2	1,3	1,1	1,1

	A549	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IL-12 4h	CD9	4,6	4,5	4,7	4,4	4,6
	CD29	13,3	13,7	13,7	13,1	14,3
	CD49c	10,0	10,4	11,0	11,0	11,1
	CD63	1,6	1,7	1,8	1,9	2,0
	CD81	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	CD82	1,1	1,5	1,5	1,4	1,3
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IL-12 12h	CD9	3,3	3,1	3,5	3,5	3,5
	CD29	7,2	6,5	7,9	7,4	7,3
	CD49c	6,5	6,0	7,8	6,7	6,7
	CD63	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IL-12 24h	CD9	3,5	4,1	3,9	3,6	2,8
	CD29	5,6	13,5	12,3	11,2	0,9
	CD49c	6,0	10,7	9,9	11,0	0,9
	CD63	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1

Tableau n°8 : Immunomodulation des cellules H596 par le TNF- α et l'IFN- γ

Les ratios MESF obtenus pour chacune des molécules étudiées après immunomodulation ont été comparés d'abord au seuil de positivité,

positifs tangents

puis au ratio $\pm 20\%$ obtenu sans immunomodulation.

augmentation diminution

	H596	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
TNF- α 4h	CD9	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5
	CD29	10,0	12,0	11,8	11,1	9,8
	CD49c	8,7	9,5	9,9	8,9	8,0
	CD63	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
TNF- α 12h	CD9	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4
	CD29	12,7	10,2	12,4	11,4	8,9
	CD49c	8,9	7,9	8,8	9,2	8,3
	CD63	1,4	1,1	1,3	1,3	1,3
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0
	Seuil	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
TNF- α 24h	CD9	1,4	1,5	1,4	1,4	1,4
	CD29	10,8	14,0	12,7	12,7	10,0
	CD49c	7,5	9,6	7,1	7,1	7,9
	CD63	1,3	1,3	1,2	1,2	1,4
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

	H596	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IFN- γ 4h	CD9	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5
	CD29	10,0	10,2	10,3	10,1	14,5
	CD49c	8,7	10,0	10,1	8,8	9,8
	CD63	1,3	1,2	1,2	1,2	1,3
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IFN- γ 12h	CD9	1,5	1,4	1,4	1,4	1,3
	CD29	12,7	11,6	13,8	11,9	11,7
	CD49c	8,9	8,3	9,2	9,3	6,9
	CD63	1,4	1,2	1,2	1,2	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
IFN- γ 24h	CD9	1,4	1,3	1,3	1,4	1,3
	CD29	10,8	13,4	13,4	14,0	8,7
	CD49c	7,5	7,2	7,8	8,8	7,6
	CD63	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1

Tableau n°9 : Immunomodulation des cellules H596 par l'IL-10 et l'IL-12

Les ratios MESF obtenus pour chacune des molécules étudiées après immunomodulation ont été comparés d'abord au seuil de positivité,

positifs tangents

puis au ratio $\pm 20\%$ obtenu sans immunomodulation.

augmentation diminution

	H596	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IL-10 4h	CD9	1,6	1,5	1,6	1,8	1,6
	CD29	10,0	9,4	12,0	12,9	9,9
	CD49c	8,7	7,3	8,5	9,4	7,5
	CD63	1,3	1,2	1,2	1,3	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IL-10 12h	CD9	1,5	1,3	1,4	1,4	1,4
	CD29	12,7	12,7	14,0	12,5	10,0
	CD49c	8,9	8,9	9,3	8,8	8,0
	CD63	1,4	1,3	1,3	1,2	1,3
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1
IL-10 24h	CD9	1,4	1,2	1,2	1,3	1,3
	CD29	10,8	8,2	10,5	8,4	8,8
	CD49c	7,5	8,4	7,9	8,9	7,7
	CD63	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

	H596	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IL-12 4h	CD9	1,6	1,7	1,6	1,7	1,6
	CD29	10,0	10,8	11,5	11,9	11,9
	CD49c	8,7	8,8	9,0	10,1	8,1
	CD63	1,3	1,4	1,3	1,3	1,3
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IL-12 12h	CD9	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5
	CD29	12,7	9,1	9,7	12,5	13,7
	CD49c	8,9	7,9	7,2	7,6	8,6
	CD63	1,4	1,5	1,3	1,5	1,4
	CD81	1,1	1,3	1,2	1,2	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,3	1,3	1,2	1,1
IL-12 24h	CD9	1,4	1,3	1,2	1,2	1,3
	CD29	10,8	13,0	10,9	13,3	12,7
	CD49c	7,5	8,1	8,6	8,7	7,6
	CD63	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2
	CD81	1,1	1,0	1,1	1,0	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

Tableau n°10 : Immunomodulation des cellules H661 par le TNF- α et l'IFN- γ

Les ratios MESF obtenus pour chacune des molécules étudiées après immunomodulation ont été comparés d'abord au seuil de positivité,

positifs tangents

puis au ratio ± 20 % obtenu sans immunomodulation.

augmentation diminution

	H661	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
TNF- α 4h	CD9	3,5	3,6	3,5	3,9	3,9
	CD29	16,8	17,0	14,3	18,4	19,0
	CD49c	1,1	1,4	1,5	1,5	1,2
	CD63	1,2	1,2	1,3	1,4	1,5
	CD81	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,3	1,3	1,2	1,3	1,2
TNF- α 12h	CD9	2,9	3,1	3,2	2,9	3,0
	CD29	14,9	14,2	15,9	14,5	13,9
	CD49c	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3
	CD63	2,3	2,1	2,3	2,3	2,2
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
TNF- α 24h	CD9	2,8	3,3	2,8	3,3	3,2
	CD29	12,3	13,8	12,7	15,2	10,4
	CD49c	1,3	1,3	1,3	1,6	1,3
	CD63	2,1	2,3	2,2	1,9	1,7
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

	H661	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IFN- γ 4h	CD9	3,5	3,5	3,2	3,1	2,8
	CD29	16,8	16,3	16,5	15,5	14,1
	CD49c	1,1	1,0	0,9	0,9	0,9
	CD63	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9
	Seuil	1,3	1,2	1,2	1,2	1,3
IFN- γ 12h	CD9	2,9	2,5	2,4	2,4	2,4
	CD29	14,9	14,6	12,1	16,3	11,8
	CD49c	1,4	1,3	1,4	1,4	1,4
	CD63	2,3	1,8	2,3	2,2	2,3
	CD81	1,1	1,0	1,1	1,0	1,1
	CD82	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,3	1,2	1,2	1,2
IFN- γ 24h	CD9	2,8	2,3	2,5	2,4	2,9
	CD29	12,3	8,3	9,7	11,2	10,8
	CD49c	1,3	1,2	1,1	1,2	1,3
	CD63	2,1	2,4	1,7	1,9	2,1
	CD81	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2

Tableau n°11 : Immunomodulation des cellules H661 par l'IL-10 et l'IL-12

Les ratios MESF obtenus pour chacune des molécules étudiées après immunomodulation ont été comparés d'abord au seuil de positivité,

positifs tangents

puis au ratio $\pm 20\%$ obtenu sans immunomodulation.

augmentation diminution

	H661	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IL-10 4h	CD9	3,5	3,9	3,3	3,4	3,3
	CD29	16,8	19,2	17,2	12,0	14,1
	CD49c	1,1	0,9	0,9	1,1	0,9
	CD63	1,2	1,4	1,3	1,2	1,3
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2
IL-10 12h	CD9	2,9	2,8	2,7	2,7	2,6
	CD29	14,9	12,8	11,6	12,2	13,0
	CD49c	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4
	CD63	2,3	1,8	2,4	2,2	2,0
	CD81	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
IL-10 24h	CD9	2,8	2,7	2,2	2,9	2,6
	CD29	12,3	12,6	7,5	13,3	10,7
	CD49c	1,3	1,3	1,4	1,4	1,2
	CD63	2,1	2,2	1,5	2,3	1,9
	CD81	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0
	CD82	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9
	Seuil	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3

	H661	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IL-12 4h	CD9	3,5	2,8	2,9	2,7	3,6
	CD29	16,8	13,0	11,9	12,3	19,0
	CD49c	1,1	1,2	1,2	1,3	1,8
	CD63	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,3	1,2	1,2	1,2	1,3
IL-12 12h	CD9	2,9	3,2	2,9	2,9	2,7
	CD29	14,9	11,6	13,4	13,7	14,5
	CD49c	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4
	CD63	2,3	2,2	2,0	2,3	2,0
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
IL-12 24h	CD9	2,8	2,7	2,5	2,1	2,3
	CD29	12,3	13,1	13,5	9,1	8,7
	CD49c	1,3	1,4	1,3	1,2	1,2
	CD63	2,1	2,1	2,2	1,3	1,9
	CD81	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0
	CD82	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3

Tableau n°12 : Immunomodulation des cellules H2087 par le TNF- α et l'IFN- γ

Les ratios MESF obtenus pour chacune des molécules étudiées après immunomodulation ont été comparés d'abord au seuil de positivité,

positifs tangents

puis au ratio $\pm 20\%$ obtenu sans immunomodulation.

augmentation diminution

	H2087	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
TNF-α 4h	CD9	1,9	1,5	1,3	1,4	1,5
	CD29	6,1	3,3	3,1	3,4	3,4
	CD49c	2,3	1,6	1,6	1,7	1,8
	CD63	1,3	1,1	1,2	1,2	1,5
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,3	1,2	1,1	1,1
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
TNF-α 12h	CD9	2,3	2,3	2,1	2,2	2,1
	CD29	10,2	12,1	10,8	10,7	9,4
	CD49c	3,7	3,7	3,9	3,8	3,4
	CD63	1,7	1,6	1,6	1,7	1,9
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0
	CD82	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
TNF-α 24h	CD9	2,4	2,5	2,2	2,3	1,9
	CD29	10,5	10,4	9,9	10,8	8,9
	CD49c	3,6	3,7	3,5	4,1	3,6
	CD63	1,8	2,1	2,1	2,3	2,2
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,3	1,4	1,2	1,2
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

	H2087	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IFN-γ 4h	CD9	1,9	2,6	2,5	2,6	2,6
	CD29	6,1	8,2	5,7	8,1	8,6
	CD49c	2,3	2,9	2,8	2,7	3,0
	CD63	1,3	1,6	1,7	1,8	3,3
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,1	1,2	1,0	1,4
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IFN-γ 12h	CD9	2,3	2,1	2,1	2,1	1,8
	CD29	10,2	9,5	9,9	10,0	9,6
	CD49c	3,7	3,6	3,9	3,8	3,6
	CD63	1,7	1,8	1,8	1,9	1,7
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
	Seuil	1,2	1,1	1,2	1,2	1,2
IFN-γ 24h	CD9	2,4	2,4	2,3	2,0	2,0
	CD29	10,5	10,5	8,8	8,8	8,7
	CD49c	3,6	3,2	3,2	3,1	2,9
	CD63	1,8	1,9	1,9	1,9	2,0
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,1	1,0	1,1	1,2
	Seuil	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1

Tableau n°13 : Immunomodulation des cellules H2087 par l'IL-10 et l'IL-12

Les ratios MESF obtenus pour chacune des molécules étudiées après immunomodulation ont été comparés d'abord au seuil de positivité,

positifs tangents

puis au ratio $\pm 20\%$ obtenu sans immunomodulation.

augmentation diminution

	H2087	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IL-10 4h	CD9	1,9	1,4	1,4	1,5	1,5
	CD29	6,1	3,5	3,2	3,2	3,5
	CD49c	2,3	1,7	1,7	1,7	1,5
	CD63	1,3	1,1	1,1	1,2	1,5
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0
	Seuil	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
IL-10 12h	CD9	2,3	2,3	2,2	2,1	2,4
	CD29	10,2	9,1	9,5	10,2	10,3
	CD49c	3,7	3,9	3,6	3,7	4,0
	CD63	1,7	1,7	1,8	1,8	1,3
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
IL-10 24h	CD9	2,4	2,3	2,2	2,3	2,2
	CD29	10,5	10,9	10,1	11,4	9,5
	CD49c	3,6	3,6	3,7	3,8	3,7
	CD63	1,8	1,7	2,3	2,4	2,5
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

	H2087	0 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
IL-12 4h	CD9	1,9	2,1	2,2	1,9	2,0
	CD29	6,1	7,9	8,6	8,3	8,3
	CD49c	2,3	2,9	3,0	2,8	2,7
	CD63	1,3	1,5	1,4	1,4	1,9
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1
	Seuil	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1
IL-12 12h	CD9	2,3	2,6	2,3	2,6	2,5
	CD29	10,2	10,4	11,0	9,6	9,2
	CD49c	3,7	3,7	3,6	3,7	3,5
	CD63	1,7	1,8	1,6	1,8	1,8
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	CD82	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
IL-12 24h	CD9	2,4	2,4	1,9	2,4	2,4
	CD29	10,5	9,8	11,0	10,0	8,9
	CD49c	3,6	3,8	3,8	3,6	3,5
	CD63	1,8	1,9	2,0	2,1	2,1
	CD81	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0
	CD82	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1
	Seuil	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

DISCUSSION

L'étude de l'expression des tétraspanines CD9, CD82 et CD151 et de la chaîne $\beta 1$ (CD29) des intégrines a été réalisée sur des coupes de tissus sains et tumoraux par une technique d'immunofluorescence indirecte. L'observation de l'expression de ces quatre marqueurs au niveau des cellules de l'épithélium bronchique sain est en accord avec des données de la littérature, puisque Sincock *et al.* (1997) montrent également, par une technique d'immunohistochimie, une localisation à des niveaux d'expression élevés des tétraspanines CD9 et CD151 et de CD29 dans le poumon sain. De même, l'observation d'un marquage fluorescent a pu être effectuée lors de l'étude par immunofluorescence indirecte sur cytocentrifugats de l'expression et de la localisation de ces marqueurs au niveau de cellules saines de trachée et de larynx.

La comparaison des profils d'expression de ces quatre marqueurs a permis de montrer que cette expression est significativement plus forte dans les tissus pulmonaires normaux que dans les tissus tumoraux correspondants. Ces résultats suggèrent qu'une diminution de l'expression des tétraspanines CD9, CD82 et CD151 et de CD29 est associée au passage d'un état sain à un état tumoral.

Par contre, aucune différence significative du niveau d'expression de ces marqueurs n'a été observée dans les tissus tumoraux de patients atteints d'un carcinome par comparaison à celle observée dans les tissus tumoraux de patients atteints d'un adénocarcinome. L'expression des molécules CD9, CD82, CD151 et CD29 ne permettrait donc pas la discrimination de ces deux types de cancers pulmonaires. La tétraspanine CD9 a d'ailleurs été caractérisée au cours de notre étude par immunoprécipitation à la surface de quatre lignées tumorales pulmonaires différentes. CD9 était ainsi observée de façon similaire au niveau de la membrane de cellules présentant une origine métastatique ou non et issues de différents types de cancer du poumon.

Nous avons, de plus, montré une expression significativement plus importante de CD9 dans les tissus tumoraux de patients présentant une extension ganglionnaire que dans les tissus tumoraux de patients n'en présentant pas. Aucune variation significative n'a, en revanche, été notée concernant l'expression des tétraspanines CD82 et CD151 et de la chaîne des intégrines CD29 entre ces deux types de tissus tumoraux.

Si l'expression de CD9 est significativement diminuée durant le passage de tissu sain à tissu tumoral, cette diminution n'est pas la même entre des tissus tumoraux présentant ou non une extension ganglionnaire. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées afin d'expliquer ces résultats. Si les tissus tumoraux de patients présentant une extension ganglionnaire expriment CD9 à des niveaux plus élevés que ceux n'en présentant pas, alors CD9 ne serait pas un bon

marqueur de potentiel métastatique dans ce type de cancer. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux rapportés par Higashiyama *et al.* (1997) qui ont montré une corrélation inverse entre l'expression de CD9 et l'atteinte ganglionnaire et qu'une expression réduite de cette molécule dans les tumeurs est associée à un moins bon pronostic. Ces auteurs ont estimé le niveau d'expression en terme de pourcentage de cellules positives pour le marqueur CD9, alors que nous nous sommes plutôt intéressés à l'intensité du marquage fluorescent pour cette molécule dans la mesure où les différences étaient plus globales. Par contre, lors de l'étude de l'expression de CD9 à la surface de cellules de lignées tumorales, celle-ci a été mise en évidence dans toutes les lignées étudiées, à des niveaux différents, et cela, quelle que soit leur origine tissulaire (poumon, colon, sein, mésothéliome). L'expression de toutes les tétraspanines testées n'a pas été systématiquement observée à la surface des cellules étudiées, ce qui souligne le rôle majeur joué par CD9 à la surface des cellules épithéliales, qu'elles soient saines ou tumorales. La comparaison des niveaux d'expression des différentes lignées étudiées a permis de montrer que l'expression de CD9 est plus importante au niveau des cellules de la lignée H1651, issues d'un adénocarcinome du poumon, qu'au niveau des cellules de la lignée H2087, issues d'un site métastatique provenant également d'un adénocarcinome pulmonaire. De même, une expression plus importante de cette tétraspanine a été observée au niveau des cellules de la lignée de carcinome pulmonaire A549 par comparaison à celle des cellules de la lignée H661 issues d'un site métastatique provenant d'un carcinome du poumon. L'expression de CD9 dans ces quatre lignées serait donc inversement corrélée avec la localisation tissulaire (tumeur primaire ou métastase ganglionnaire) des cellules tumorales. Ces résultats obtenus sur cellules en conditions non adhérentes sont en accord avec les résultats d'Higashiyama *et al.* (1997).

La différence d'expression observée pour CD9 entre des tumeurs présentant ou non une extension ganglionnaire, peut être expliquée par la présence de sous populations tumorales à l'intérieur de la tumeur primaire. Ainsi, l'intensité du marquage fluorescent observé dans les tumeurs présentant une extension ganglionnaire pourrait correspondre majoritairement au marquage de cellules exprimant CD9 et n'ayant ainsi pas encore acquis la capacité de métastaser. Les cellules présentant cette capacité auraient déjà quitté la tumeur primaire. Dans les tumeurs ne présentant pas d'extension ganglionnaire, le marquage observé correspondrait à la fois à celui de cellules exprimant CD9 et incapables de métastaser et à celui de cellules en train d'acquérir un potentiel métastatique en diminuant leur expression de CD9. Ce dernier type de cellules ne présenterait toutefois pas encore des taux suffisamment faibles de CD9 pour permettre une dissémination des cellules tumorales.

Une dernière hypothèse pourrait consister en une restauration de l'expression de CD9 dans les tumeurs de stades plus avancés, réorganisées de façon à permettre à certaines cellules tumorales de passer à travers la barrière endothéliale. En effet, selon le modèle proposé par Sauer *et al.* (2003), la dissémination de cellules tumorales serait facilitée lors de la progression tumorale par la diminution de l'expression de CD9 et l'établissement de contacts avec les cellules environnantes et notamment endothéliales lors du passage dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques serait permis par la ré-expression de cette tétraspanine. Le rôle de CD9 dans les interactions cellules tumorales – cellules endothéliales a, de plus, été montré par Longo *et al.* (2001), ainsi que son rôle dans la dissémination de cellules malignes à travers la barrière endothéliale.

Un nombre important d'études réalisées dans de nombreux types de cancer décrit la tétraspanine CD82 comme négativement associée au processus de métastase (Dong *et al.*, 1995,1996 ; Adachi *et al.*, 1996 ; Higashiyama *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 1998 ; Lombardi *et al.*, 1999). Au cours de notre étude, il a été mis en évidence que l'expression de CD82 dans le poumon est significativement plus faible dans le tissu tumoral que dans le tissu sain correspondant. D'ailleurs l'expression de CD82, qui a été mise en évidence sur les cellules saines d'explants de trachée et de larynx, n'a pas été observée lors de l'étude par immunofluorescence indirecte de cellules de lignées en culture sur Lab Tek.

Il est apparu que la diminution de l'expression de cette tétraspanine n'est pas corrélée au type histologique du cancer puisque aucune variation significative d'expression n'a été observée entre les adénocarcinomes et les carcinomes.

Aucune corrélation n'a de plus été mise en évidence entre l'expression de CD82 et l'extension tumorale aux ganglions proximaux. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Higashiyama *et al.* (1998) qui montrent dans le cas de cancers du poumon non à petites cellules qu'il n'existe pas d'association significative entre l'expression de CD82 et un certain nombre de facteurs clinico-pathologiques, et notamment le statut de la tumeur (T1-4), l'extension tumorale aux ganglions, le stade ou le type histologique du cancer. De plus, le niveau d'expression élevé de CD82 est corrélé dans les cancers du poumon non à petites cellules à un pronostic favorable, que ce soit au niveau de l'expression génique estimée par RT-PCR (Adachi *et al.*, 1996) ou au niveau de l'expression protéique évaluée par immunohistochimie (Higashiyama *et al.*, 1998) et cela surtout dans le cas des adénocarcinomes. L'étude de l'expression de CD82 a également été entreprise à la surface de

cellules de lignées tumorales de diverses origines tissulaires par une technique d'immunofluorescence indirecte et analyse en cytométrie de flux.

Les cellules de la lignée de cancer du colon SW480 présentaient clairement la plus forte expression de ce marqueur par rapport aux autres lignées tumorales étudiées. Lors de l'étude de l'expression de CD82 au niveau de cellules de lignées de cancer du colon, Lombardi *et al.* (1999) ont également mis en évidence que les cellules de la lignée SW480, isolées à partir d'une tumeur primaire, présentaient l'une des plus fortes expressions de cette tétraspanine, et que celle-ci était 15 fois supérieure à celle observée au niveau des cellules de la lignée SW620 issues d'un site métastatique ganglionnaire du même patient. Ces auteurs montrent de plus que l'expression de CD82 est diminuée au cours des différents stades de la progression du cancer du colon, ce qui est en accord avec la diminution de l'expression de CD82 observée entre les tissus pulmonaires sains et tumoraux utilisés au cours de notre travail. Des résultats similaires ont pu être observés au cours de notre étude puisque le niveau d'expression de CD82 à la surface des cellules de la lignée d'adénocarcinome H1651 est plus élevé que celui déterminé à la surface des cellules de la lignée H2087 provenant d'un site métastatique, mais le rapport d'expression est bien moindre entre ces deux lignées tumorales pulmonaires.

L'implication de CD151 dans la dissémination métastatique a été rapportée pour la première fois par Testa *et al.* (1999) et d'après ces auteurs, cette tétraspanine interviendrait dans la migration des cellules tumorales et favoriserait le processus de métastase. CD151 n'interviendrait pas dans la prolifération des cellules tumorales, mais plutôt dans l'établissement de lésions métastatiques secondaires. Hashida *et al.* (2003) ont, de plus, montré que l'expression de CD151 dans des tumeurs du colon est inversement corrélée au taux de survie des patients atteints par ce type de cancer, contrairement à celle des tétraspanines CD9 et CD82, corrélée à un meilleur taux de survie. Au cours de notre étude, aucune variation significative de l'expression de la protéine CD151 n'a été mise en évidence entre des tumeurs de patients présentant une extension tumorale ganglionnaire et des tumeurs de patients n'en présentant pas et son expression n'apparaît pas comme permettant la discrimination de deux types histologiques de cancer du poumon. Ces résultats sont en accord avec ceux de Tokuhara *et al.* (2001) qui montrent qu'il n'existe pas de lien entre l'expression du gène de CD151 et un certain nombre de données cliniques et pathologiques, et notamment le statut de la tumeur (T1-4), celui des ganglions (N0-3), celui du stade pathologique (I à IIb) ou celui du type histologique de cancer (adénocarcinome, carcinome épidermoïde ou

carcinome à grandes cellules). Ces auteurs mettent de plus en évidence que le taux de survie à 5 ans de 86 patients sur les 145 étudiés présentant une tumeur CD151+ était plus faible que celui des 59 patients présentant une tumeur CD151-, surtout lorsque le cancer était un adénocarcinome. Au cours de notre travail, l'étude de la corrélation entre l'expression de CD151 et le taux de survie n'a pas pu être réalisée étant donné le peu de recul sur l'état des patients après l'exérèse chirurgicale. Il est tout de même intéressant de noter que dans l'effectif étudié, relativement restreint par rapport à celui étudié par Tokuhara *et al.*, sur les 21 patients, 7 ne présentaient pas d'expression de CD151 au niveau du tissu tumoral et que parmi eux 2 présentaient un adénocarcinome. Il semblerait donc intéressant d'augmenter l'effectif de l'étude et de comparer les résultats d'expression de CD151 avec le taux de survie des patients à 5 ans. Testa *et al.* (1999) rapportent que CD151 serait impliquée dans une étape précoce de la formation des métastases, telle que l'arrêt des cellules métastatiques au niveau de l'organe cible, l'extravasation, et/ou la migration des cellules à travers le tissu d'implantation secondaire. De même, Longo *et al.* (2001) suggèrent que CD151 notamment, sur la membrane de cellules tumorales, pourrait intervenir dans la formation de liaisons hétérotypiques avec d'autres tétraspanines et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, exprimées au niveau de la membrane des cellules endothéliales, lors du passage des cellules tumorales dans les vaisseaux.

Une expression plus importante de la tétraspanine CD151 a été mise en évidence à la surface des cellules des lignées issues de tumeurs primaires H1651 (adénocarcinome) et A549 (carcinome) par comparaison à celle détectée à la surface des cellules des lignées issues de métastases, H2087 et H661 respectivement. Ces résultats ne sont pas en accord avec l'hypothèse d'une implication positive de cette tétraspanine dans le processus métastatique, mais il est intéressant de remarquer que cette étude a été réalisée sur cellules en conditions non adhérentes et qu'il est possible que CD151 soit particulièrement sensible à la technique de mise en suspension utilisée. En effet, la comparaison des profils d'expression de tétraspanines et d'intégrine à la surface des cellules des lignées H1651, H2087, A549 et H661 obtenus à l'aide de deux techniques différentes de mise en suspension des cellules a montré que ces marqueurs sont sensibles au procédé utilisé et tout particulièrement CD151 au niveau des cellules de la lignée H2087.

Plusieurs études ont montré une diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ dans certaines tumeurs et notamment d'origine épithéliale. Adachi *et al.* (1998) ont ainsi mis en évidence que la diminution de l'expression de cette intégrine est corrélée à un mauvais

pronostic chez des patients présentant un adénocarcinome pulmonaire. De même, Dedhar *et al.* (1993) ont montré que les cellules hautement invasives isolées à partir d'une lignée de carcinome de la prostate présentaient une expression réduite de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ par comparaison aux autres cellules de la lignée présentant un potentiel métastatique plus faible. Parmi les cellules de cette lignée, des modifications de l'expression de cette intégrine pourrait permettre à certaines d'entre elles d'acquérir un potentiel métastatique plus fort. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus au cours de notre étude, puisque une diminution significative de l'expression de la chaîne $\beta 1$ des intégrines a été observée après comparaison des tissus tumoraux aux tissus pulmonaires sains correspondants. Il est intéressant de noter que, contrairement à nos résultats obtenus au niveau du tissu pulmonaire, dans certains tissus comme la peau, l'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ dans la tumeur primaire est corrélée à un mauvais taux de survie chez des patients atteints d'un mélanome (Hieken *et al.*, 1999).

La comparaison des profils d'expression de CD29 par les différentes lignées tumorales étudiées montre que les cellules des lignées issues de sites métastatiques H2087 et H661 présentent une expression plus forte que celles des lignées H1651 et A549 respectivement, ce qui suggère une corrélation entre l'expression de CD29 et la progression tumorale. Ces résultats peuvent être en accord avec les données de Dedhar *et al.* (1993) si l'on considère que les cellules issues des sites métastatiques ont dû diminuer leur expression de CD29 au cours du processus métastatique afin de pouvoir se disséminer.



L'implication des tétraspanines dans la motilité cellulaire peut être liée à leur association dans le réseau tétraspanine avec les intégrines $\beta 1$ dans un grand nombre de types cellulaires (Berditchevski, 2001). L'expression et les propriétés des intégrines sont associées à leur capacité à lier les cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Leitinger *et al.*, 2000). Leur association avec les tétraspanines pourrait ainsi dépendre de la disponibilité d'ions métalliques, puisque la stabilité des interactions cellulaires nécessite la présence des cations divalents (Lazo *et al.*, 1997). Ces auteurs montrent que l'adhésion homotypique de cellules B de lymphome par CD53 est dépendante des cations divalents et Rowin *et al.* (1998) montrent que la chélation du calcium inhibe l'activation des intégrines $\beta 1$. De plus, concernant le potentiel métastatique des cellules tumorales, Mishima *et al.* (1998) ont observé que la chélation du calcium inhibe les propriétés invasives de plusieurs types de cancers.

Au cours de notre étude, l'expression de dix tétraspanines et de sept chaînes des intégrines a été déterminée et quantifiée à la surface des cellules de la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549 par cytométrie de flux. Il est ainsi apparu que cinq tétraspanines, dont CD9 et cinq chaînes des intégrines, dont CD29 sont exprimées par les cellules de cette lignée. Ces résultats sont en accord avec une association possible de ces molécules dans un réseau de surface impliquant des tétraspanines et des intégrines $\beta 1$, comme montré par Rubinstein *et al.* (1996).

La localisation cellulaire de ces molécules a, de plus, été examinée par immunofluorescence *in situ*. CD63 présente une localisation spécifique dans des vésicules intracytoplasmiques. Toutes les autres molécules sont présentes dans le cytoplasme et/ou à la périphérie cellulaire avec une répartition homogène. Des renforcements du marquage ont été observés au niveau de certains contacts cellulaires, ce qui est en accord avec la focalisation possible de ces molécules dans des structures organisées telles que les filopodes (Peñas *et al.*, 2000).

Les résultats obtenus sont comparables à ceux de cytométrie de flux présentés par Peñas *et al.* (2000) sur des kératinocytes normaux issus d'une culture primaire et montrant l'expression des tétraspanines CD9, CD81 et CD151 à la surface cellulaire.

Lorsque les cellules de la lignée A549 ont été cultivées en présence d'un chélateur (EDTA), leur viabilité est restée satisfaisante et les cellules ne montraient pas de signe d'apoptose. Néanmoins, dans ces conditions, des altérations macroscopiques ont été notées, telles qu'une croissance ralentie et la formation de couches cellulaires plus lâches. Ces observations sont en accord avec d'autres études réalisées sur d'autres types cellulaires (Lazo *et al.*, 1997) et suggèrent que les interactions moléculaires nécessitées pour une croissance et des contacts cellulaires efficaces sont perturbées par la chélation des cations divalents. CD9 reste la seule tétraspanine encore détectable dans de telles conditions, mais avec une expression membranaire réduite de moitié. La chélation réduit également l'expression de CD29, d'environ 35 %, et celles de CD49b et CD49c d'environ 25 et 35 % respectivement. En ce qui concerne les marquages réalisés sur cellules adhérentes, l'expression de la tétraspanine CD151 et de deux chaînes α des intégrines (CD49e et CD49f) n'est plus observée, suggérant que les cations divalents sont nécessaires à l'expression de ces molécules, soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire d'autres molécules. Les tétraspanines et chaînes des intégrines exprimées dans ces conditions présentent une accumulation cytoplasmique, suggérant que le transport des intégrines et des chaînes des intégrines nécessite la présence de cations divalents. L'apparition, dans le cytoplasme des cellules, de

nouvelles tétraspanines, absentes en conditions de culture normales, pourrait être interprétée comme une tentative de restauration du réseau tétraspanine. Serru *et al.* (1999) ont montré, en utilisant des conditions de lyse cellulaire permettant de dissocier les interactions entre tétraspanines, mais conservant celles impliquant des tétraspanines et des molécules partenaires non tétraspanines, que les tétraspanines CD81 et CD151 jouent un rôle clé dans l'interconnexion d'autres tétraspanines avec leurs partenaires et en particulier avec les intégrines $\beta 1$. Il est intéressant de noter que la disparition de CD151 au niveau des cellules de la lignée A549 lors des expérimentations de chélation semble être contrebalancée par l'apparition de CD81 cytoplasmique. L'absence de renforcements du marquage au niveau des contacts cellulaires, ou leur observation de façon inégale, indique une possible perturbation des interactions moléculaires observées en conditions non chélatées. Peñas *et al.* (2000) rapportent également une perturbation de l'adhésion et de la stratification des kératinocytes et une expression de CD151 plus faible en présence de chélateurs.

Notre travail montre ainsi que l'expression des tétraspanines et des intégrines $\beta 1$ à la surface des cellules A549, et la formation de contacts inter-cellulaires efficaces, dépendent des cations divalents. Il est intéressant de noter que les conditions de diffusion de tels cations ne sont pas forcément remplies durant la croissance tumorale, et que les cellules cancéreuses peuvent présenter *in vivo* les modifications observées ici *in vitro*.



Les cellules épithéliales de l'appareil respiratoire sont capables de répondre à des stimuli exogènes et endogènes par la production de médiateurs actifs, notamment des cytokines pléiotropiques telles que l'IL-6, l'IL-1, l'IL-10 ou le TNF- α , ou des chimiokines comme l'IL-8 (CXCL8), GRO- α (CXCL1) (Growth Related Oncogene- α), GRO- γ (CXCL3), RANTES (CCL5) (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and presumably Secreted) et MCP-1 (CCL2) (Monocyte Chemoattractant Protein 1) (Polito et Proud, 1998 ; Clemans *et al.*, 2000). Polito et Proud précisent que les niveaux de production sont faibles en ce qui concerne l'IL-1, l'IL-10 et le TNF- α . La plupart des études s'intéressant à la sécrétion des cytokines par les cellules épithéliales pulmonaires ont été réalisées en plaçant ces dernières dans des conditions d'inflammation tels que l'asthme ou la mucoviscidose et

montrent pour la plupart une augmentation de l'expression des cytokines, mais ces conditions ne reflètent pas l'état basal des cellules.

L'étude de surnageants de culture de quatre lignées tumorales pulmonaires (A549, H596, H661 et H2087) a permis ici de mettre en évidence la production spontanée de plusieurs cytokines et de plusieurs chimiokines, mais les profils de sécrétion sont différents selon les lignées.

Seuls deux facteurs présentent une expression commune à toutes les lignées étudiées, il s'agit de deux facteurs angiogéniques : la **chimiokine IL-8 (CXCL8)** et le **facteur Ang (Angiogénine)**. La production relativement importante d'IL-8 par des cellules épithéliales bronchiques saines et tumorales est consensuellement rapportée par de nombreuses études (Smith *et al.*, 1994 ; Salvi *et al.*, 1999 ; Clemans *et al.*, 2000 ; Witherden *et al.*, 2004 ; Mikamo *et al.*, 2004), et cette production est augmentée au niveau du tissu tumoral quel que soit le type de cancer (Smith *et al.*, 1994, Ueda *et al.*, 1994 ; Eisma *et al.*, 1999 ; Yuan *et al.*, 2000). Yuan *et al.* (2002) ont, de plus, montré qu'une expression aberrante de p53 au niveau de cellules de cancer pulmonaire non à petites cellules est très fortement corrélée au taux d'ARNm d'IL-8 et que la surexpression de p53 peut, par ce biais, être impliquée dans le contrôle de l'angiogénèse. On peut également noter que l'inhibition de l'action de l'angiogénine ou de l'IL-8 par des anticorps monoclonaux constitue une approche thérapeutique dans le traitement du cancer (Smith *et al.*, 1994 ; Olson *et al.*, 1995).

En ce qui concerne les cellules de la lignée A549, aucun marquage n'est observé pour la chimiokine **GRO- α (CXCL1)**, mais un marquage est observé avec **GRO** qui permet une détection de GRO- α , GRO- β (CXCL2) et GRO- γ (CXCL3) indifféremment, ce qui suggère la production de GRO- β ou γ par ces cellules. Par contre en ce qui concerne les cellules de la lignée H596, un marquage est observé avec GRO et avec GRO- α ce qui ne permet pas de déterminer lequel d'entre les facteurs GRO autre que GRO- α est exprimé.

Le facteur **ENA-78 (CXCL5)** n'est détecté que dans le surnageant obtenu à partir des cellules de la lignée A549. Wislez *et al.* (2004) ont d'ailleurs montré une production constitutive de ce facteur par les cellules A549 en grandes quantités (22 ng/mL), de même qu'une production constitutive d'IL-8 (0,5 ng/mL) conforme aux résultats de notre étude.

Ces trois CXC chimiokines (GRO (α,β,γ), IL-8 et ENA-78) jouent un rôle central dans la progression tumorale, notamment chez des patients présentant un cancer pulmonaire non à petites cellules (Arenberg *et al.*, 1998 ; Freemantle et Dmitrovsky, 2002 ; Yuan *et al.*, 2002), en constituant notamment des facteurs angiogéniques importants (Strieter *et al.*, 1995). Ces

facteurs permettent également le recrutement de cellules inflammatoires qui peuvent favoriser la croissance tumorale en produisant des cytokines angiogéniques, des facteurs de croissance et des protéases (Wahl et Kleinman, 1998 ; di Carlo *et al.*, 2001). Ils peuvent également contribuer à la génération d'anomalies génétiques dans les cellules épithéliales suite à la libération de radicaux libres (Sandhu *et al.*, 2000).

En plus de la production de molécules de la famille des CXC chimiokines, la présence de deux membres de la famille des CC chimiokines a été détectée dans les surnageants des lignées tumorales étudiées (MCP-1 (CCL2) et RANTES (CCL5)). Ainsi, **MCP-1** est la chimiokine majeure pour les monocytes circulants. Elle est sécrétée par une grande variété de cellules dont les cellules épithéliales alvéolaires (Rollins, 1991) en réponse à différents stimuli inflammatoires (IL-1 β et TNF- α). MCP-1 n'a été détectée dans notre étude que dans les surnageants provenant de la culture de cellules des lignées A549 et H2087, et ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur la lignée A549 par Momoi *et al.* (2001).

Comme MCP-1, **RANTES** est sécrétée par les cellules épithéliales alvéolaires (O'Brien *et al.*, 1998) et sa production en terme d'ARNm a été montrée au niveau de deux lignées de cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2) et alvéolaires (A549) par Richter *et al.* (2003). Au cours de notre travail, la production de RANTES n'a été mise en évidence qu'au niveau des cellules de la lignée H596. La non détection de la production de RANTES par les cellules de la lignée A549 peut être expliquée par la faible sensibilité de la trousse à l'égard de ce facteur (2000 pg/mL) ou bien par le fait que la transcription du gène de RANTES, détectée par la présence d'ARNm, n'est pas poursuivie par la synthèse de la protéine dans ces conditions. Une étude réalisée sur des cellules épithéliales alvéolaires de type II purifiées à partir de régions normales de poumon proches d'un carcinome a permis de montrer que parmi cinq chimiokines étudiées, MCP-1, IL-8 et GRO- α présentaient les plus fortes expressions, alors que celles de MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α) et de RANTES n'étaient souvent pas mises en évidence (Witherden *et al.*, 2004).

La sécrétion d'**IL-6** a été mise en évidence au cours de notre travail dans les surnageants des cellules des lignées H596 et H2087, et ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent la capacité de cellules tumorales à produire de l'IL-6 (Menetrier-Caux *et al.*, 1998). Dans un grand nombre de cancers et notamment chez des patients atteints de cancer du poumon (Mouawad *et al.*, 1999 ; Salgado *et al.*, 2003 ; Dowlati *et al.*, 1999), les taux d'IL-6 circulants sont élevés et corrélés au statut clinique et constituent un marqueur de mauvais pronostic (Zhang et Adachi, 1999). La production d'IL-6 pourrait

contribuer à un dysfonctionnement des lymphocytes T cytotoxiques en empêchant une réponse anti-tumorale de type Th1 (Frassanito *et al.*, 2001). En plus d'un rôle immunosuppresseur, l'IL-6 joue un rôle dans la stimulation de la synthèse et de la sécrétion du facteur Ang (Verselis *et al.*, 1999), précisément détecté dans notre étude.

Aucune production cytokinique n'a été observée en ce qui concerne l'IL-1, l'IL-10, l'IL-12, et le TNF- α quel que soit le surnageant étudié. L'absence d'expression de certaines de ces molécules est en accord avec les données de la littérature, puisque Herbeuval *et al.* (2004) ont également montré l'absence de production d'IL-10 par les cellules de la lignée A549 et que l'absence de production d'IL-10, d'IL-12 et de TNF- α a été montrée sur les cellules de cette même lignée non stimulées par Mikamo *et al.* (2004). L'absence d'expression constitutive d'IL-1 β et de TNF- α par les cellules de la lignée A549 a également été confirmée récemment (Wislez *et al.*, 2004).

En utilisant une technique sensible de RT-PCR ELISA, Salvi *et al.* (1999) ont montré que des cellules épithéliales bronchiques obtenues à partir de volontaires sains, ainsi que des cellules de lignées tumorales (A549 et 16HBE14o⁺) exprimaient de façon constitutive l'ARNm de l'IL-5. De plus, un marquage immunohistochimique sur tissu bronchique sain a montré une localisation de l'IL-5 au niveau de l'épithélium. Tout comme dans notre étude, ces auteurs n'ont, par contre, pas mis en évidence d'IL-5 dans les surnageants de culture de cellules de la lignée A549 et seuls de faibles taux ont été détectés après stimulation de ces cellules par TNF- α et IFN- γ . Ces résultats suggèrent une perte de production dans des cellules transformées par comparaison à des cellules saines.

L'ensemble de ces résultats montre une hétérogénéité importante dans la production des facteurs étudiés à l'exception de l'IL-8 et de Ang, suggérant des variations dans la communication via les médiateurs cytokiniques et la formation par ces cellules d'un microenvironnement cytokinique propre à chaque lignée tumorale. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature, notamment ceux obtenus sur les cellules de la lignée A549 qui constitue le modèle d'étude de prédilection. De façon générale, les facteurs sécrétés par les différentes lignées tumorales sont des chimiokines, à l'exception de l'IL-6, et/ou présentent des propriétés angiogéniques.



L'IL-12 est une cytokine produite par les cellules dendritiques matures en vue d'induire une réponse T de type Th1 caractérisée par la production d'IFN- γ par les lymphocytes T et induisant la production de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) (Macatonia *et al.*, 1995). L'IFN- γ sécrété par ces cellules non seulement inhibe le développement d'une réponse de type Th2 non cytotoxique, mais également augmente la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques (Snijders *et al.*, 1998). L'IL-12 sécrétée par les cellules dendritiques augmente également la cytotoxicité médiée par les cellules NK, ainsi que la production d'IFN- γ par ces cellules (Trinchieri, 2003). Un des mécanismes d'échappement tumoral à la surveillance immunitaire est l'inhibition de la production d'IL-12 par les cellules dendritiques matures (Kiercher *et al.*, 2000). Ainsi, des cellules dendritiques transfectées pour produire de l'IL-12 sont utilisées afin d'induire des réponses immunitaires anti-tumorales dans divers protocoles à visée thérapeutique (Sato *et al.*, 2002). Plusieurs essais portant sur des cellules tumorales génétiquement modifiées pour produire de l'IL-12 ont confirmé l'effet bénéfique de cette cytokine en terme d'amplification de l'immunité anti-tumorale (Mazzolini *et al.*, 2003).

Au cours de la réponse immunitaire, la maturation des cellules dendritiques est induite par différents signaux, notamment par des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α (Banchereau *et al.*, 2000). Après activation et maturation, les cellules dendritiques produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α , permettant d'induire une réponse cellulaire T efficace (Matzinger, 2002).

De nombreuses cytokines sécrétées, soit par les cellules tumorales, soit par les cellules du système immunitaire, ou les deux, peuvent exercer des effets immunosuppresseurs. Les plus connues sont probablement le TGF- β et l'IL-10. Des concentrations élevées d'IL-10 ont été trouvées dans le plasma chez des patients présentant différentes tumeurs solides, ainsi que des hémopathies malignes (Galizia *et al.*, 2002a) et ces taux peuvent également présenter un intérêt pronostique (Galizia *et al.*, 2002b ; Fayad *et al.*, 2001 ; de Vita *et al.*, 2000). Le contrôle de la production d'IL-10 par les cellules dendritiques est important à comprendre étant donné la capacité de cette cytokine à intervenir dans l'orientation vers une réponse immunitaire Th2 non cytotoxique, dans l'induction de cellules dendritiques tolérogènes et de cellules T régulatrices (Corinti *et al.*, 2002), ainsi que dans l'induction de l'anergie de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux (Steinbrink *et al.*, 1999). Les cellules tumorales peuvent exercer une activité suppressive non spécifique en sécrétant différents facteurs (Adénosine, Tryptophane) qui inhibent l'IL-12 et stimulent la production

d'IL-10 par les monocytes, contribuant ainsi aux effets suppresseurs (Link *et al.*, 2000 ; Mellor et Munn, 1999). De même, Monti *et al.* ont montré que les cellules tumorales sont capables de produire des facteurs (mucines) capables de bloquer la maturation des cellules dendritiques, orientant ainsi leur différenciation vers un profil tolérogène avec production d'IL-10 et inhibition de la production d'IL-12 (Monti *et al.*, 2004).

Ainsi, plusieurs cytokines impliquées dans l'activation ou la suppression des fonctions effectrices des cellules dendritiques telles que ces trois cytokines TNF- α , IL-12 et IL-10 sont produites par les dendritiques elles mêmes et agissent ainsi de façon autocrine. L'IFN- γ est un adjuvant important des réponses Th1 et agit directement sur les cellules dendritiques en induisant la libération d'IL-12 et de TNF- α (Corinti *et al.*, 2002).

Au cours de notre travail, l'impact direct éventuel des cytokines « anti-tumorales », TNF- α , IFN- γ et IL-12, et de la cytokine immunorégulatrice, IL-10, sur l'expression de tétraspanines et de chaînes des intégrines a été étudié au niveau des cellules de quatre lignées tumorales pulmonaires, après avoir vérifié leur non production par les cellules de ces mêmes lignées cellulaires.

Il existe un effet temps au niveau de l'expression de certains marqueurs étudiés. Seules les cellules de la lignée H596 ne présentent pas de variation d'expression de ces marqueurs en fonction du temps. A l'état basal, en ce qui concerne la lignée A549, l'expression des chaînes $\alpha 3$ et $\beta 1$ des intégrines diminue de façon continue au cours du temps, ainsi que celle de CD9 dès 12h. A l'inverse, l'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ augmente dès 12h au niveau des cellules de la lignée H2087, ainsi que celle de CD9. Par contre, l'expression de la tétraspanine CD63 augmente dans ces cellules à partir de 12h. De même, au niveau des cellules de la lignée H661, l'expression de CD63 est augmentée à partir de 12h et celle de CD29 est diminuée à 24h. Le fait d'exprimer les résultats par rapport à l'état basal à chaque temps d'incubation permet d'éliminer les variations dues à cet effet temps.

Aucun effet n'a été observé quels que soient la concentration et le temps d'incubation de la cytokine utilisée sur l'expression de la tétraspanine **CD9** sur trois lignées (A549, H596 et H661). Seules les cellules de la lignée H2087 semblent être sensibles aux stades précoces de la stimulation cytokinique (4h) quant à l'expression de cette molécule. Cette variation se traduit soit par une augmentation de son expression, c'est le cas avec l'IFN- γ quelle que soit la concentration utilisée, soit par une diminution, c'est le cas avec le TNF- α et l'IL-10. L'augmentation de l'expression de CD9 dans un environnement contenant de l'IFN- γ serait en faveur d'une restauration d'un phénotype non tumoral, voire d'une diminution du potentiel

métastatique concernant cette molécule. Cet effet pourrait s'ajouter à l'effet « anti-tumoral » de cette cytokine décrit précédemment. L'IL-10 qui est une cytokine immunosuppressive pourrait favoriser le potentiel tumorigène et/ou métastatique en diminuant l'expression de CD9 à la surface des cellules de cette lignée cellulaire.

La lignée A549 est la seule des quatre lignées tumorales étudiées sensible quant à l'induction de l'expression de la tétraspanine **CD82**. Cette molécule, dont l'expression est absente à l'état basal dans toutes les lignées, est induite par deux cytokines, précocement par l'IL-12 à toutes les concentrations et plus tardivement par le TNF- α aux deux plus fortes concentrations utilisées (10 et 100 ng/mL). Tout comme CD9, CD82 est un facteur anti-métastatique et apparaît donc inductible par deux cytokines susceptibles d'exercer une action anti-tumorale.

L'expression de la tétraspanine **CD81** n'est pas significativement inductible quelle que soit la lignée étudiée et la cytokine utilisée.

L'expression de **CD63** est sensible à la modulation cytokinique au niveau de deux lignées sur les quatre étudiées. Une augmentation précoce de son expression est observée en présence de la plus forte concentration d'IL-12 pour les lignées A549 et H2087, ainsi qu'à toutes les concentrations d'IFN- γ utilisées au niveau des cellules de la lignée H2087. Une augmentation plus tardive de l'expression de CD63 est observée en présence des plus fortes concentrations en TNF- α et en IL-10 utilisées au niveau des cellules de la lignée H2087. Concernant l'augmentation d'expression de cette tétraspanine, la lignée H2087 est la plus sensible aux différentes cytokines immunomodulatrices utilisées au cours de ce travail et cela indifféremment aux rôles de ces cytokines dans la réponse anti-tumorale.

Les quatre lignées étudiées sont sensibles quant à l'expression des **chaînes $\alpha 3$ (CD49c) et $\beta 1$ (CD29) des intégrines**, mais les effets sont très variables en fonction de la cytokine, de la dose et du temps d'incubation utilisés d'une lignée à l'autre.

L'observation la plus notable concerne les cellules de la lignée A549 où deux cytokines antagonistes, IL-10 et IL-12 présentent les mêmes effets au même temps et aux mêmes concentrations. Ainsi, une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est observée à 24h avec les trois concentrations les plus faibles, et une diminution de son expression est observée avec la concentration la plus forte.

La lignée H2087 est également sensible à la modulation et les effets observés le sont uniquement de façon précoce (4h). Par contre ils peuvent être variables, avec soit une

augmentation dans le cas de l'IFN- γ et de l'IL-12, soit une diminution dans le cas du TNF- α et de l'IL-10.

Il est intéressant de noter que l'expression de CD49c n'est pas observée dans les conditions basales 4h après le changement de milieu, mais que celle-ci est restaurée après incubation en présence de TNF- α et aux plus fortes concentrations d'IL-12 dans les cellules de la lignée H661. Paradoxalement, l'IL-12 diminue l'expression de CD29 dans ces mêmes cellules. De même, on peut noter que la tétraspanine CD63 n'est pas exprimée dans les conditions basales à 4h et que son expression est restaurée en présence des trois plus fortes concentrations en TNF- α .

L'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est diminuée dans le cancer du poumon (Adachi *et al.*, 1998), et si l'on considère comme bénéfique la restauration de son expression, les cytokines IFN- γ et IL-12 semblent être les plus intéressantes, tout en restant attentif aux concentrations utilisées. En effet, des concentrations trop élevées seraient susceptibles d'induire des effets inverses, c'est-à-dire la diminution de l'expression de cette intégrine. De même, l'utilisation d'IL-10 ou de TNF- α peut avoir des effets opposés selon la lignée étudiée. D'autre part, la cinétique d'action des différentes cytokines est à prendre en considération puisque leurs effets sont variables en fonction du temps.

A notre connaissance peu d'études se sont intéressées à la modulation de l'expression des tétraspanines par des cytokines. Les travaux de la littérature cités ci-après afin de discuter nos résultats concernent, de plus, des cellules dont l'origine n'est pas forcément épithéliale et/ou tumorale.

Une étude réalisée chez la souris sur des macrophages péritonéaux rapporte une diminution de l'expression de CD9 après incubation 48h en présence d'IFN- γ (Wang *et al.*, 2002). Les résultats obtenus lors de notre étude montrent un effet opposé de l'IFN- γ qui augmente l'expression de CD9 à la surface des cellules de la lignée H2087. Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués d'une part par l'origine des cellules, hématopoïétique ou épithéliale, par la nature tumorale ou non des cellules utilisées pour l'expérimentation, et d'autre part par les temps d'incubation différents entre les deux études. De façon comparable à l'absence de modification de l'expression de CD9 observée à la surface des trois autres lignées étudiées, Atsuta *et al.* (1997) n'ont pas mis en évidence de variation d'expression de cette molécule après stimulation par TNF- α ou IFN- γ de cellules épithéliales bronchiques transformées par un virus (BEAS-2B).

Wang *et al.* (2002) ont montré que, de façon comparable à nos résultats observés au niveau de toutes les lignées, l'expression de la tétraspanine CD81 sur des cellules macrophagiques n'est pas sensible à la présence d'IFN- γ .

Contrairement aux variations d'expression de CD29 observées dans le cas des quatre lignées tumorales étudiées, Atsuta *et al.* (1997) ont rapporté qu'aucune modification de l'expression de cette molécule n'est observée après stimulation des cellules BEAS-2B par TNF- α ou IFN- γ (1 ng/mL, 24h). Par contre, une capacité accrue de lymphocytes T à adhérer à la fibronectine via l'expression de CD29 a été montrée par Ariel *et al.* (2002) après stimulation par IL-12. Nous avons également mis en évidence une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ à la surface des cellules de la lignée A549 après une incubation de 24h en présence d'IL-12. Par ailleurs, Ishii *et al.* (1990) ont montré une diminution de l'expression de CD29 à la surface de cellules de Langerhans gingivales après incubation avec du TNF- α et ces résultats sont comparables avec la diminution d'expression de CD29 observée sur les cellules de la lignée H2087 après 4h d'incubation avec toutes les concentrations en TNF- α utilisées. De plus, cette diminution d'expression de la chaîne $\beta 1$ des intégrines est associée à une diminution de l'expression de la chaîne $\alpha 3$ (CD49c). L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ semble donc sensible à la stimulation par le TNF- α dans cette lignée. Dans un autre modèle, l'expression de CD29 associée à CD49d est augmentée après incubation pendant cinq jours de cellules dendritiques dérivées de monocytes en présence de 100 U/mL de TNF- α (Puig-Kröger *et al.*, 2000). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la différence de temps d'incubation entre les deux études. Une augmentation de l'expression des sous unités $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\beta 1$ (28 %, 90 % et 65 % respectivement) a également été observée après incubation 24h de cellules de mélanome avec 300 U/mL de TNF- α et aucune variation d'expression n'a été observée avec une concentration plus faible de 100 U/mL, suggérant l'importance de l'effet dose (Zhu *et al.*, 2002). Les concentrations de TNF- α utilisées au cours de notre étude s'échelonnent de 4-20 U/mL (0,1 ng/mL) à 4000-20000 U/mL (100 ng/mL). Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par Zhu *et al.* (2002) car nous n'observons pas d'effet dose quant à la diminution de l'expression de CD29 dans les cellules de la lignée H2087 stimulées par TNF- α . On peut penser que dans le cas de cellules *in vivo* présentant la même sensibilité au TNF- α que celles de la lignée H2087, le fait de se trouver dans un environnement contenant du TNF- α , produit notamment par des monocytes/macrophages infiltrant la tumeur, se traduit par une diminution de l'expression de CD29 et de CD49c et peut être corrélé à une augmentation de leur potentiel métastatique.

Les cellules de la lignée H2087 semblent également sensibles à une incubation relativement courte avec de l'IFN- γ puisque l'expression de CD63 est augmentée à toutes les concentrations utilisées à 4h. De même, Mahmudi-Azer *et al.* (2002) montrent que l'expression membranaire de cette tétraspanine est augmentée après stimulation d'éosinophiles circulants par 20 ng/mL de cette cytokine et avec un temps de stimulation encore plus court de 10 min.

L'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est augmentée à la surface des cellules de la lignée A549 après une incubation de 24h avec 10 ng/mL d'IL-10. Cette augmentation est également retrouvée à la surface de cellules mononucléées circulantes et de kératinocytes au même temps d'incubation et à la même concentration d'IL-10 que ceux utilisés au cours de notre étude (Seifert *et al.*, 2000). Ces auteurs montrent également une augmentation de l'expression de cette intégrine après 24h d'incubation en présence de 10 ng/mL d'IFN- γ , alors que cette augmentation n'est retrouvée qu'après 4h d'incubation en présence de la même concentration de cette cytokine à la surface des cellules de la lignée H2087.

La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature peut donner des informations discordantes, mais les variations observées entre les lignées tumorales étudiées au cours de notre étude et présentant une même origine épithéliale étant déjà très importantes, il semble difficile de dégager une unicité sur l'effet de la modulation des tétraspanines et des intégrines par les différents stimuli cytokiniques utilisés.

CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objet l'étude de l'expression de membres de la famille des tétraspanines et de la famille des intégrines $\beta 1$ au niveau de tissu pulmonaire sain et tumoral et au niveau de cellules de lignées tumorales de différentes origines tissulaires. Les facteurs sécrétés par différentes lignées tumorales d'origine pulmonaire ont de plus été étudiés. La modulation de l'expression des tétraspanines et des intégrines $\beta 1$ que ce soit par chélation des cations divalents contenus dans le milieu de culture ou par stimulation avec des cytokines a enfin été entreprise sur des cellules de lignées tumorales pulmonaires.

Les résultats obtenus montrent une grande hétérogénéité d'expression des tétraspanines et des intégrines $\beta 1$ au niveau des cellules des différentes lignées tumorales étudiées, et cela même lorsque l'origine tissulaire est identique. Ceci suggère l'importance du choix du modèle d'étude, et notamment dans le cas du cancer du poumon.

La diminution d'expression des tétraspanines CD9, CD82 et CD151 et de la chaîne $\beta 1$ des intégrines au niveau du tissu pulmonaire tumoral confirme l'implication de ces molécules dans ce type de cancer.

La modulation de l'expression des tétraspanines et des intégrines $\beta 1$ par chélation des cations divalents a permis de montrer que ceux-ci sont indispensables à l'expression membranaire de ces molécules et à la formation de contacts intercellulaires stables.

L'étude de la sécrétion de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, par les cellules de plusieurs lignées tumorales d'origine pulmonaire a également permis de montrer une hétérogénéité dans les profils de production. Seuls l'IL-8 (CXCL8) et le facteur Ang (aAngiogénine) sont systématiquement sécrétés par les cellules des quatre lignées étudiées, les autres facteurs sécrétés étant également tous favorables au développement tumoral. L'immunomodulation des tétraspanines et des intégrines $\beta 1$ par des cytokines immunosuppressives ou impliquées dans les réponses inflammatoires et/ou Th1 suggère l'importance du microenvironnement tumoral dans l'expression de ces molécules.

La grande hétérogénéité observée au niveau des différentes lignées tumorales étudiées, tant au niveau de la sécrétion de différents facteurs, qu'au niveau de l'expression des tétraspanines et des intégrines $\beta 1$, ainsi que des susceptibilités variables à différentes molécules immunorégulatrices, suggèrent des comportements cellulaires *in vitro* distincts. Pourtant, *in vivo*, ces cellules ont permis le développement de tumeurs primaires, et parfois même de métastases. La relation entre ces cellules tumorales et celles du système immunitaire serait intéressante à approfondir. D'abord au niveau de l'influence des différents facteurs

sécrétés par les cellules tumorales sur les cellules du système immunitaire. Ensuite au niveau des interactions cellulaires faisant intervenir des contacts moléculaires directs, et notamment entre des tétraspanines au niveau de ces deux types cellulaires. Une meilleure compréhension de l'influence des cellules tumorales sur un environnement qui *in vivo* leur est hostile permettra de mieux appréhender les mécanismes mis en œuvre par ces cellules lors de l'échappement tumoral.

FICHES TECHNIQUES

Fiche technique n°1

Culture cellulaire

Principe

Pour chaque lignée cellulaire tumorale, les cellules sont placées dans un milieu de culture contenant les nutriments et les facteurs de croissance nécessaires à leur survie et dans des conditions optimales (atmosphère saturée en eau, enrichie en CO₂, maintenue à 37°C) afin d'assurer une bonne prolifération cellulaire et obtenir un nombre de cellules suffisant à l'expérimentation. Les cellules sont manipulées dans des conditions limitant les risques de contamination sous hotte à flux laminaire et sont de plus cultivées en présence d'antibiotiques.

Matériels

- Hotte stérile à flux laminaire (SSVAM 19, ESI, Cachan, France)
- Etuve à CO₂ (IR Sensor CO₂ incubator, Sanyo, Tokyo, Japon)
- Flacons de culture de 80 cm² (Nunc EasY Flasks, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)
- Microscope inversé (Wild Heerbrugg, Suisse)
- Centrifugeuse (Jouan, St Herblain, France)
- Tubes à congélation de 1,8 mL (Nunc)

Réactifs

- Lignées cellulaires tumorales de poumon (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) :
 - Carcinome : A549
 - Adénocarcinomes : H1435, H1651
 - Carcinome épidermoïde : H596
 - Lignées provenant d'un site métastatique :
 - H661 : cellules provenant d'un ganglion lymphatique, site métastatique d'un cancer du poumon à grandes cellules (carcinome)
 - H2087 : cellules provenant d'un ganglion lymphatique, site métastatique d'un adénocarcinome du poumon
 - Lignées cellulaires de mésothéliome (ATCC) : 211H, H28, H2052

- Lignée cellulaire tumorale de colon :
 - Adénocarcinome colorectal : SW480 (ATCC)
 - Lignée cellulaire tumorale de sein :
 - T47D (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Royaume Uni)
- Milieux de culture : F12 HAM, DMEM-F12 HAM (PAA Laboratories, Linz, Autriche), RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO, USA)
- Sérum de veau fœtal (PAA Laboratories)
- Mélange d'antibiotiques (pénicilline (10000 U / mL), streptomycine (10000 µg / mL), fungizone (25 µg / mL), Gibco-BRL-Life Technologies, Rockville, MD, USA)
- Trypsine-EDTA 0,25 % (Sigma)
- DMSO (Diméthylsulfoxyde, Prolabo, Paris, France)

Mode opératoire

a. Culture cellulaire

Les cellules des différentes lignées adhérentes tumorales ont été cultivées en flacon de culture de 80 cm², jusqu'à confluence, dans environ 20 mL du milieu adapté, supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 0,5 % du mélange d'antibiotiques.

Les cellules de la lignée A549 ont été cultivées dans du milieu F12 HAM, celles des lignées H1651 et H2087 dans du milieu DMEM-F12 HAM, celles des lignées H28, H596, H661, H1435, H2052, 211H, T47D et SW480 dans du milieu RPMI 1640.

La manipulation des cellules a été réalisée sous hotte à flux laminaire avec du matériel stérile et les cellules ont été incubées dans une étuve permettant de maintenir une atmosphère saturée en eau, un apport contrôlé en CO₂ (6 %) et une température ambiante constante de 37°C.

Le renouvellement du milieu de culture a été effectué tous les 2 à 3 jours.

La confluence de la monocouche cellulaire a été estimée par observation à l'aide d'un microscope inversé.

b. Sous cultures

Des sous cultures ont également été réalisées afin d'augmenter le nombre d'échantillons cellulaires.

Après élimination du milieu de culture, la monocouche cellulaire est rapidement lavée avec 5 mL de Trypsine-EDTA 0,25 % en agitant doucement le flacon. Les cellules sont ensuite mises en suspension par incubation 5 min à 37°C avec 3 mL de Trypsine-EDTA 0,25 %, puis reprises dans un volume suffisant (7-8 mL) de milieu de culture complet. La suspension cellulaire est alors homogénéisée à l'aide d'une pipette par aspiration refoulement. Des aliquots de suspension cellulaire sont transférés dans un ou plusieurs flacons de culture contenant le milieu de culture adapté et placés à l'étuve.

c. Congélation

La congélation d'aliquots des différentes lignées étudiées a été entreprise afin de permettre la conservation d'un stock de cellules.

La suspension cellulaire homogène obtenue comme décrit précédemment est centrifugée 10 min à 125xg, le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture adapté complet. Les cellules sont ensuite comptées (Fiche technique n°11) et la suspension cellulaire est ajustée à 2×10^6 cellules / mL. Des aliquots de 0,5 mL de suspension cellulaire sont alors introduits dans des tubes à congélation contenant 0,5 mL de milieu complet refroidi sur glace pilée et contenant 10 % de DMSO. Les cellules sont mélangées par inversion et congelées à -80°C dans une boîte en polystyrène afin de permettre une congélation progressive. Les aliquots sont enfin conservés à -80°C.

d. Décongélation

La décongélation de la suspension cellulaire est réalisée par immersion rapide et agitation (environ 2 min) du tube à congélation dans un bain marie à 37°C. La suspension cellulaire décongelée est immédiatement transférée dans un flacon de culture contenant le milieu approprié complet et incubée à l'étuve.

Fiche technique n°2

Cytométrie de flux

Principe

Cette technique permet une analyse qualitative et quantitative précise de cellules marquées de manière directe ou indirecte par des anticorps conjugués à un ou plusieurs fluorochromes (Fiche technique n°3), ou dont le contenu en ADN a été rendu fluorescent (Fiche technique n°11).

La suspension cellulaire est entraînée par un courant liquidien dans une chambre, dont le diamètre se réduit progressivement afin de permettre un bon alignement des cellules qui vont ainsi défiler une à une devant le trajet d'un faisceau laser excitateur. Le passage des cellules devant le faisceau laser entraîne une diffraction de ce dernier. Par ailleurs, les fluorochromes portés par les cellules marquées, excités, émettent un signal lumineux dans une longueur d'onde spécifique.

Des miroirs dichroïques focalisent les signaux lumineux vers des détecteurs (photomultiplicateurs) qui les transforment en signaux électriques.

Des filtres dichroïques permettent de séparer dans le rayonnement émis les différentes longueurs d'onde (fluorescence verte, orange ou rouge...).

Parmi les signaux lumineux recueillis, deux donnent des renseignements morphologiques sur les cellules passant dans l'axe du laser : le Forward Scatter (FS) qui est capté par un détecteur situé dans l'axe du rayon incident et reflète la taille de la cellule, et le Side Scatter (SS) qui est capté par un détecteur situé à 90° et analyse la diffraction du laser liée aux organites intracellulaires. Il reflète l'aspect plus ou moins granuleux du cytoplasme des cellules.

La transcription des données apparaît sous la forme d'histogrammes sur un écran, puis sur papier. Ces histogrammes peuvent être mono- ou biparamétriques.

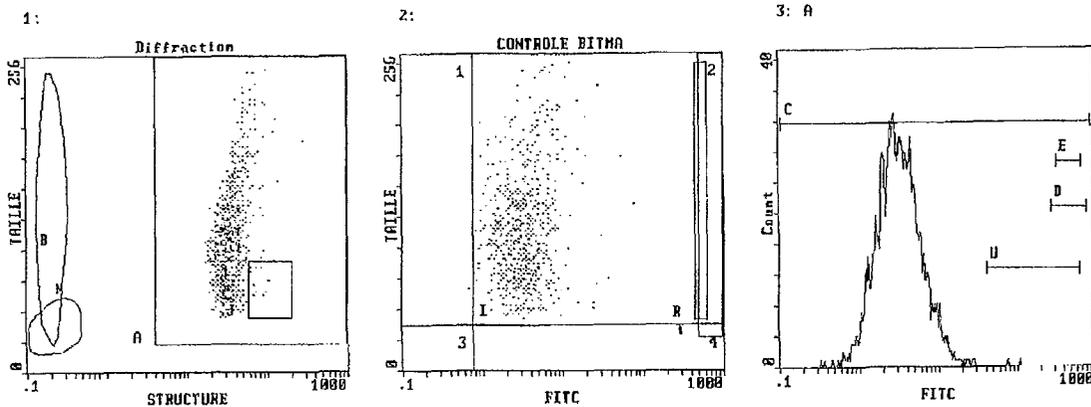
Les histogrammes suivants ont été utilisés lors de l'analyse en simple marquage (Figure n°19) :

- Histogramme biparamétrique Structure / Taille : chaque cellule est représentée par un point dont les coordonnées indiquent en abscisse la granulation cytoplasmique de la cellule et en ordonnée la taille de la cellule. Cet histogramme permet d'identifier les populations cellulaires analysées.

L'apparition d'un nuage dense de points correspondant aux cellules de lignées tumorales étudiées permet de dessiner une fenêtre d'intérêt (ou Bit Map) centrée sur la population cellulaire à étudier.

- Histogramme biparamétrique FITC / Taille : cet histogramme exprimant le Forward Scatter en fonction du logarithme de l'intensité de fluorescence permet de repérer si les cellules fluorescentes sont bien celles centrées par la fenêtre d'intérêt de l'histogramme précédent.
- Histogramme monoparamétrique FITC / Count : il est représentatif de la population cellulaire pour le paramètre donné, et permet d'analyser la répartition de l'intensité de fluorescence dans la population cellulaire comprise dans la Bit Map retenue. Grâce à des curseurs d'intégration, il est possible de définir des sous groupes pour lesquels sont calculés le pourcentage de cellules marquées et l'intensité de fluorescence moyenne (MFI : Mean Fluorescence Intensity).

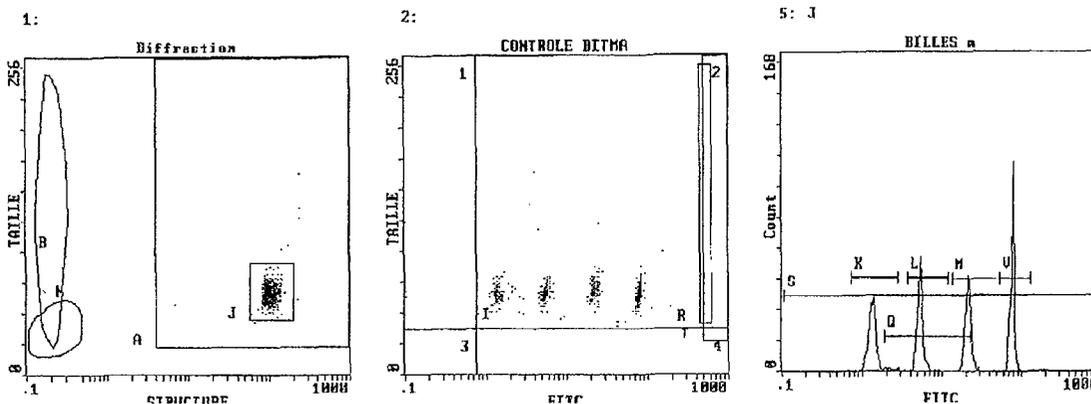
L'utilisation d'un mélange de microparticules de calibration (Immuno-Brite Standards kit, Beckman Coulter, Miami, FL, USA) correspondant à des équivalents de fluorescéine soluble permet, après plusieurs mesures successives, de calculer le coefficient de variation du cytomètre de flux, mais également de définir une équation permettant la conversion des MFI mesurées en MESF (Mean Equivalents of Soluble Fluorescein) à partir des valeurs de MFI mesurées pour chacun des types de microparticules contenu dans le mélange et dont les équivalents de fluorescéine soluble sont connus (31500, 115000, 460000, 1115000) (Figure n°20).



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	J J	1.58	79	72.8	71.0	59.7	63.0	2	21.57	15.22
	A A	100	4999	38.3	120.1	102.4	255.0	12	41.35	43.00
	I1 I	1.04	52	0.513	95.4	0.102	37.0	1	44.80	34.26
	I2 I	98.0	4948	3.34	120.4	7.96	255.0	10	68.20	43.00
	I3 I	0.00	0	****	****	****	****	**	**	**
I4 I	0.00	0	****	****	****	****	**	**	**	
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mid X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	4997	3.32	3.24	2.73	38	24.21	0.108	927.5

Figure n°19 : Histogrammes d'analyse en simple marquage en cytométrie de flux



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	J J	97.0	4851	102.8	85.1	95.3	66.0	34	14.98	10.93
	A A	100	4998	104.3	66.0	95.3	66.0	34	21.85	16.36
2	I1 I	0.18	9	0.174	64.8	0.102	56.0	1	80.20	33.13
	I2 I	99.8	4991	12.6	66.0	82.5	69.0	32	170.64	16.31
	I3 I	0.00	0	****	****	****	****	**	**	**
	I4 I	0.00	0	****	****	****	****	**	**	**
	I5 I	0.00	0	****	****	****	****	**	**	**
5	K K	23.1	1121	1.42	1.40	1.35	50	6.72	0.754	2.96
	L L	23.6	1145	5.55	5.52	5.61	72	4.48	3.74	12.3
	M M	23.1	1120	22.4	22.4	22.4	83	4.71	13.9	49.0
	O O	43.5	2109	9.67	5.98	5.61	72	4.48	1.96	23.8
	S S	100	4851	12.5	20.4	82.5	165	2.23	0.110	902.8
	V V	29.2	1417	80.4	81.3	82.5	165	2.23	54.6	134.1

Figure n°20 : Histogrammes d'analyse des billes de calibration Immuno-Brite

Fiche technique n°3

Technique d'immunofluorescence indirecte visant à caractériser des tétraspanines et des intégrines à la surface de différentes lignées de cellules tumorales par cytométrie de flux

Principe

La caractérisation de l'expression de tétraspanines et d'intégrines à la surface de cellules de différentes lignées tumorales adhérentes est réalisée à l'aide d'une technique d'immunofluorescence indirecte en cytométrie de flux (Fiche Technique n°2) sur cellules en suspension. Ces dernières sont marquées avec des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre une tétraspanine ou une chaîne des intégrines. L'utilisation simultanée d'un mélange de particules correspondant à des équivalents moyens de fluorescéine soluble (MESF) permet de déterminer l'équation d'une courbe reliant l'intensité moyenne de fluorescence mesurée à un nombre d'équivalents de fluorescéine soluble. La conversion de MFI en MESF permet la comparaison de valeurs obtenues à différentes dates puisque la variation potentielle des valeurs de MFI mesurées pour les échantillons biologiques est compensée par une variation équivalente des valeurs mesurées pour les microparticules de calibration.

Matériel

- Cytomètre de flux (EPICS XL, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
- Centrifugeuse (Jouan, St Herblain, France)

Réactifs

- Anticorps monoclonaux :
 - anti-CD3 (UCHT1), anti-CD9 (ALB6), anti-CD29 (K20), anti-CD82 (50F11) (Beckman Coulter-Immunotech, Marseille, France)
 - anti-CD151 (11B1G4, IB4B4, TS151, E. Rubinstein, U Inserm 268, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France)
 - anti-CD37 (BL14), anti-CD53 (Z53.1), anti-CD63 (H5C6), anti-CD81 (Z81.1), Co-029 (AZM22.1), TALLA-1/CD231 (AZM30), NAG-2 (2E12) (E. Rubinstein)
 - anti-CD49a (MTJ), anti-CD49b (10Pε9b), anti-CD49c (KID) (E. Rubinstein)

- ascites spécifiques de CD49d (8B5C12A9) et de CD49e (MI14A40) (E. Rubinstein)
- anti-CD49f (GoH3) (Pharmingen-Becton Dickinson, Franklin, NJ, USA)
- Anticorps de lapin anti-souris couplé à la fluorescéine (Dako, Glostrup, Danemark)
- Solution de Hanks (Hanks'Balanced Salt Solution, Sigma)
- Paraformaldéhyde (Sigma) 1 % en PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Billes de calibration (Immuno-Brite Standards kit, Beckman Coulter)

Mode opératoire

Cinquante μL d'une suspension cellulaire (Fiche technique n°1b) sont incubés 30 min à 4°C avec l'anticorps monoclonal dirigé contre la molécule étudiée et dilué selon les indications du fabricant. Un premier rinçage est ensuite effectué avec 1 mL de solution de Hanks et les cellules sont centrifugées 5 min à 600xg. Après élimination du surnageant, les cellules sont incubées 30 min à 4°C avec 10 μL d'une solution contenant un anticorps secondaire de lapin anti-immunoglobulines de souris conjugué au FITC. Un deuxième rinçage est effectué à nouveau avec 1 mL de solution de Hanks et les cellules sont centrifugées 5 min à 600xg. Le surnageant est éliminé et 0,3 mL de paraformaldéhyde / PBS sont ajoutés afin de fixer les cellules. Les cellules sont conservées à 4°C jusqu'à leur analyse en cytométrie de flux.

Fiche technique n°4

Immunofluorescence indirecte sur cellules ou sur cytocentrifugats

Principe

Les techniques d'immunofluorescence sur cellules sont des techniques sensibles et spécifiques qui permettent une analyse qualitative et quantitative de cellules marquées par un ou des anticorps couplés à un fluorochrome. Ces techniques présentent l'avantage, par rapport à la cytométrie de flux, de renseigner sur la localisation cellulaire du marquage fluorescent.

Matériels

- Microscope à fluorescence (Olympus BX60, Tokyo, Japon)
- Caméra et logiciel d'analyse d'images (Olympus DP70)
- Chambres humides

Réactifs

- Ethanol 95 %
- PBS 1x
- Hanks (Hanks'Balanced Salt Solution, Sigma)
- Anticorps monoclonaux et ascites
 - anti-CD9 (ALB6), anti-CD29 (K20), anti-CD82 (50F11) (Beckman Coulter-Immunotech, Marseille, France)
 - anti-CD151 (11B1G4, IB4B4, TS151, E. Rubinstein, U Inserm 268, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France)
 - anti-CD37 (BL14), anti-CD53 (Z53.1), anti-CD63 (H5C6), anti-CD81 (Z81.1), Co-029 (AZM22.1), TALLA-1/CD231 (AZM30), NAG-2 (2E12) (E. Rubinstein)
 - anti-CD49a (MTJ), anti-CD49b (10Pε9b), anti-CD49c (KID) (E. Rubinstein)
 - ascites spécifiques de CD49d (8B5C12A9) et de CD49e (MI14A40) (E. Rubinstein)
 - anti-CD49f (GoH3) (Pharmingen-Becton Dickinson, Franklin, NJ, USA)
- Anticorps de lapin anti-immunoglobulines de souris couplé au FITC (Dako, Glostrup, Danemark)

- PBS/Glycérol (7/3)

Mode opératoire

Les cellules cultivées jusqu'à confluence (Fiche technique n°1) en Lab-Tek sont directement manipulées dans les chambres de culture. Après élimination du milieu de culture, les cellules sont fixées par une incubation de 5 min à 4°C dans de l'éthanol 95 %, puis réhydratées à l'aide de 3 bains successifs de 5 min dans une solution de PBS. Les cellules sont ensuite incubées 1h à 4°C avec 100 µL d'une solution de Hanks contenant l'anticorps monoclonal dirigé contre la molécule étudiée et dilué selon les indications du fabricant. Une série de 3 lavages dans une solution de PBS permet *alors* l'élimination des anticorps libres, avant une incubation de 30 min à 4°C avec 100 µL d'une solution de Hanks contenant un anticorps secondaire de lapin anti-immunoglobulines de souris couplé au FITC. Les chambres de culture sont enfin décollées dans le cas des cellules cultivées en Lab-Tek après une nouvelle série de lavages et les monocouches cellulaires sont conservées en chambre humide dans une goutte de PBS/Glycérol avant observation au microscope à fluorescence.

Fiche technique n°5

Culture d'explants de trachée et de larynx

Principe

Des explants de trachée ou de larynx sont placés dans un milieu de culture contenant les nutriments et les facteurs de croissance nécessaires à leur survie et dans des conditions optimales (atmosphère saturée en eau, enrichie en CO₂, à 37°C) afin d'assurer une bonne prolifération cellulaire pour obtenir un nombre de cellules suffisant à l'expérimentation. Les cellules sont manipulées dans des conditions limitant les risques de contamination sous hotte à flux laminaire.

Matériels

- Hotte stérile à flux laminaire (SSVAM 19, ESI, Cachan, France)
- Etuve à CO₂ (IR Sensor CO₂ incubator, Sanyo, Tokyo, Japon)
- Plaques de culture (Nunc EasY Flasks, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)
- Microscope inversé (Wild Heerbrugg, Suisse)

Réactifs

- Echantillons tissulaires de trachée ou de larynx (CRB Nancy)
- Milieu de culture : BEBM (Biowhittaker Europe, Verviers, Belgique)
- Suppléments et facteurs de croissance : BEGM SingleQuots Supplements and Growth Factors (Biowhittaker)
- Trypsine-EDTA 0,25 % (Sigma, St Louis, MO, USA)

Mode opératoire

Le fond d'une plaque de culture est gratté à l'aide d'un scalpel et l'épithélium disséqué issu d'une trachée ou d'un larynx est placé au niveau des rainures. Après quelques instants permettant au tissu d'adhérer, celui-ci est doucement recouvert par un milieu spécifique (BEBM). La plaque est alors incubée à l'étuve. L'expansion du tissu est régulièrement observée au microscope inversé. Les cellules sont enfin mises en suspension à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA 0,25 % avant cyto-centrifugation (Fiche technique n°6) en vue d'une étude en immunofluorescence indirecte (Fiche technique n°4).

Fiche technique n°6

Cytocentrifugation

Principe

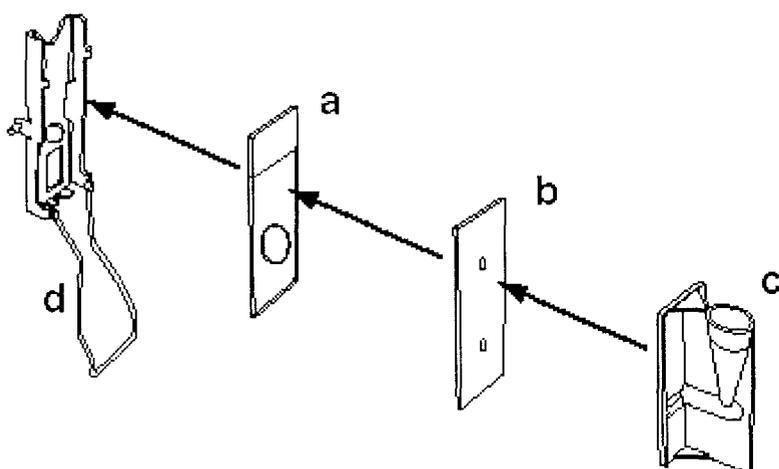
Les cellules d'une suspension cellulaire sont fixées sur lame et perméabilisées afin de permettre la réalisation d'une technique d'immunofluorescence indirecte (Fiche technique n°4).

Matériel

- Cytocentrifugeuse (Cytospin 2, Shandon, Runcorn, Royaume Uni)

Mode opératoire

Cinquante μL d'une suspension cellulaire sont déposés dans le fond des cônes de chaque chambre de centrifugation et centrifugés 5 min à 400 tours/min. La présence des cellules est vérifiée après séparation du support et les cellules sont entourées par un anneau de Rhodorsil (Rhodia Chem, Caronno Pertusella, Italie) avant étude en immunofluorescence indirecte (Fiche technique n°4).



Schématisation de l'assemblage d'une chambre de centrifugation

a. Lame de verre, b. Carte filtre, c. Chambre conique pour échantillon, d. Dispositif de maintien

Fiche technique n°7

Classification T.N.M

La classification T.N.M remplit plusieurs rôles

- aider le clinicien à établir le traitement,
- fournir des indications sur le pronostic,
- faciliter l'évaluation des résultats thérapeutiques,
- permettre l'échange de renseignements entre les centres de traitement,
- concourir à la poursuite des recherches concernant le cancer humain.

Cette classification repose sur la définition précise de l'envahissement de la maladie. La détermination de 3 critères est ainsi nécessaire :

- Critère T concernant la localisation primitive du néoplasme ;
- Critère N concernant l'adénopathie régionale ;
- Critère M décrivant la présence ou non de métastases à distance.

La technique de description et de classification applicable à toutes les localisations de cancer est composée en trois temps :

- Identification de l'extension de la maladie en utilisant les 3 symboles : T, N et M.
- Attribution à chacun d'entre eux d'une série de chiffres indiquant les degrés de l'envahissement ou de l'extension.
- Groupement des facteurs TNM en un petit nombre de classes cliniques.

Localisation primitive (T) :

T	Description
Tx	La tumeur primitive ne peut être étudiée
T0	Pas de tumeur primitive
T1	Atteinte très limitée
T2	Atteinte plus importante (en général, > 2 cm)
T3	Atteinte de tissus conjonctifs voisins
T4	Atteinte des organes voisins

Adénopathie régionale (N) :

N	Description
Nx	Impossible de statuer sur les ganglions
N0	Recherche négative des ganglions satellites
N1	Atteinte minime ganglionnaire des ganglions proximaux
N2	Atteinte majeure ganglionnaire des ganglions proximaux
N3	Atteinte des ganglions au-delà des ganglions proximaux

Métastases à distance (M) :

M	Description
Mx	Pas d'éléments permettant de statuer sur les métastases
M0	Il n'y a pas de métastase à distance
M1	Il existe une (ou des) métastases à distance

La localisation de la métastase est décrite par les suffixes :

pul : poumon ; oss : os ; hep : foie ; bra : cerveau ; lym : ganglion à distance ; pleu : plèvre ;
per : péritoine ; ski : peau ; oth : autre site.

Dans le cas du cancer du poumon :

Classification du T

Statut T	Description
TX	Tumeur prouvée par la cytologie bronchique, mais non visualisée ni à la radio, ni en bronchoscopie
T0	Pas de tumeur primaire
Tis	Carcinome in situ
T1	Tumeur de 3cm ou moins, entourée de parenchyme pulmonaire ou la plèvre, sans invasion des bronches lobaires proximales en bronchoscopie.
T2	Tumeur de plus de 3cm ou tumeur envahissant la plèvre viscérale ou associée à une atélectasie n'intéressant pas tout un poumon. A la bronchoscopie, la tumeur est située au niveau lobulaire et à au moins 2cm de la carène.
T3	Tumeur de taille indifférente avec une extension à la paroi thoracique, au diaphragme, à la plèvre ou au péricarde sans atteinte du cœur, des grands vaisseaux, de la trachée, de l'œsophage ou du corps vertébral Ou atteinte de la bronche principale sans atteinte de la carène Ou atélectasie de tout un poumon
T4	Atteinte du médiastin, du cœur, des grands vaisseaux, de la trachée, de l'œsophage, du corps vertébral, de la carène ou épanchement pleural positif.

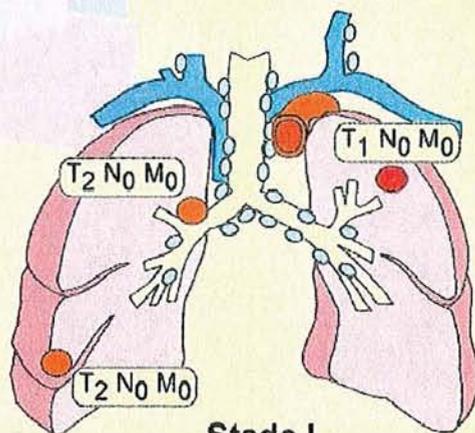
Classification du N

Statut N	Description
N0	Pas de métastases des ganglions régionaux
N1	Atteinte(s) ganglionnaire(s) homolatérale(s) péri-bronchique(s) et/ou homolatérale(s) hilare(s) y compris une extension directe à partir de la tumeur primitive.
N2	Adénopathie(s) régionale(s) médiastinale(s) homolatérale(s) et/ou sous-carénaire(s)
N3	Atteinte(s) ganglionnaire(s) médiastinale(s) contro-latérale(s), hilare(s) contro-latérale(s), scalénique(s) homo- ou contro-latérale(s) ou sus-claviculaire(s)

Regroupement en stades

Stades	Description
Stade 0	In situ
Stade 1	T1 N0 M0 ou T2 N0 M0
Stade 2	T1 N1 M0 ou T2 N1 M0 (pas d'atteinte médiastinale)
Stade 3a	Atteinte extra-pulmonaire (T3 N0 M0 ou T3 N1 M0, T3 N2 M0, T2 N2 M0)
Stade 3b	T1-4 N3 M0, T4 et N1-3 M0
Stade 4	Atteinte métastatique

Cancer du poumon stade I

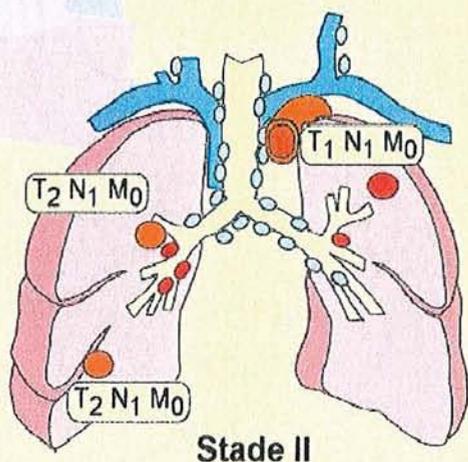


Cancer bronchique stade I

Ce stade regroupe les cancers T1 (stade Ia) et T2 (stade Ib), sans adénopathies ni métastases.

Ce sont les formes les plus opérables.

Cancer du poumon stade 2

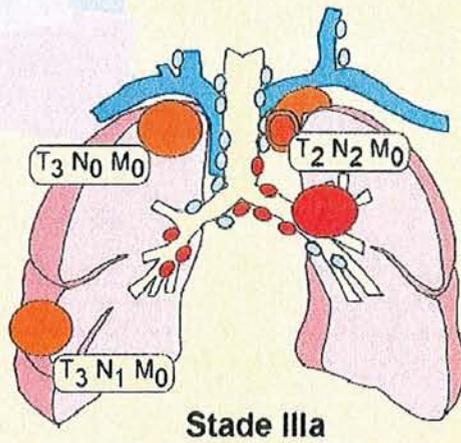


Cancer bronchique stade 2

Ce stade regroupe les cancers T1 N1 M0 (stade 2a), T2 N1 M0 (stade 2b), ou les formes T3 N0 M0 (rares formes stade 2b).

Ce sont des formes encore opérables.

Cancer du poumon stade 3 a

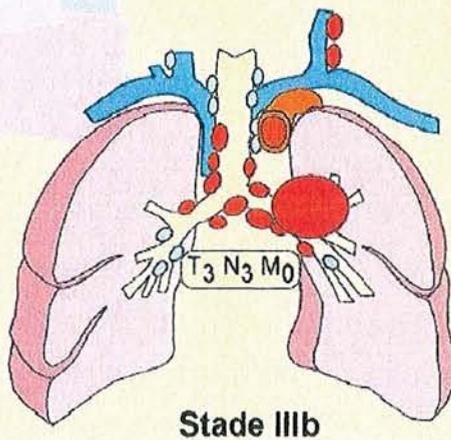


Cancer bronchique stade 3a

Ce stade regroupe les cancers T1 N2 M0 (non représentés ici), T2 N2 M0, ou les formes T3 N1 ou N2, M0.

Ces formes ne constituent généralement plus une bonne indication opératoire.

Cancer du poumon stade 3 b



Cancer bronchique stade 3b

Ce stade regroupe les cancers T1, T2 ou T3 avec des ganglions N3 et M0 ou encore les T4 tous N mais M0 (non montrés sur ce schéma)

Ces formes ne constituent plus une bonne indication opératoire.

Fiche technique n°8

Immunofluorescence indirecte sur coupe à la congélation

Principe

Les techniques d'immunofluorescence indirecte sur coupes de tissus sont des techniques sensibles et spécifiques qui permettent une analyse qualitative et quantitative des cellules et/ou des régions histologiques marquées par un ou des anticorps couplé à un fluorochrome. Ces techniques présentent l'avantage, par rapport à la cytométrie de flux, de renseigner sur la localisation histologique du marquage fluorescent.

Matériel

- Microtome réfrigéré (Jung CM 1800, Leica, Nussloch, Allemagne)
- Four à micro-ondes
- Microscope à fluorescence (Olympus BX60, Tokyo, Japon)
- Caméra et logiciel d'analyse d'images (Olympus DP70)

Réactifs

- Azote liquide
- Bleu de toluidine
- Rhodorsil (Rhodia Chem, Caronno Pertusella, Italie)
- Anticorps monoclonaux de souris :
 - anti-CD9 (ALB6), anti-CD29 (K20), anti-CD82 (50F11) (Beckman Coulter-Immunotech, Marseille, France)
 - anti-CD151 (TS151, E. Rubinstein, U Inserm 268, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France)
- Anticorps de lapin anti-immunoglobulines de souris couplé au FITC (Dako, Glostrup, Danemark)
- PBS 1x : Phosphate Buffered Saline, NaCl 140mM, KCl 2,5mM, KH₂PO₄ 1,8mM, Na₂HPO₄·2H₂O 10mM
- Solution de Hanks (Hanks'Balanced Salt Solution, Sigma)
- PBS/Glycérol (7/3)

Mode opératoire

Après réception au laboratoire dans du sérum physiologique, les échantillons tissulaires frais sont immergés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

Pour chaque prélèvement, des coupes sériées de 4 µm d'épaisseur sont réalisées à -30°C à l'aide d'un microtome réfrigéré. Les coupes sont recueillies sur une lame de verre dégraissée, séchées à l'air et fixées par chauffage 45 secondes dans un four à micro-ondes. Une coupe est colorée au bleu de toluidine pendant quelques secondes, rincée et réservée à l'étude des caractéristiques morphologiques du tissu pulmonaire. Les autres coupes sont marquées par une technique d'immunofluorescence indirecte : chaque coupe est limitée par un anneau de Rhodorsil et incubée 1 h en chambre humide dans 50 µL d'une solution de Hanks contenant l'anticorps monoclonal dirigé contre la molécule étudiée et dilué selon les indications du fabricant.

Les coupes sont lavées 3 fois 5 min dans du PBS et incubées 30 min en chambre humide avec 50 µL de solution d'anticorps secondaire de lapin anti-immunoglobulines de souris conjugué au FITC.

Les coupes sont enfin lavées 3 fois 5 min dans du PBS et conservées en chambre humide dans une goutte de PBS/Glycérol avant observation au microscope à fluorescence.

Fiche technique n°9

Immunoprécipitation

Principe

Les protéines membranaires de cellules de lignées tumorales, cultivées jusqu'à confluence (Fiche technique n°1), sont marquées à l'aide d'une solution contenant de la biotine. Un tampon de lyse contenant notamment un détergent (Triton X100) est alors utilisé afin d'obtenir un lysat cellulaire. L'incubation avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine d'intérêt et une solution contenant des billes de sépharose couplées à la protéine G permet après centrifugation de séparer le complexe ainsi formé des autres protéines contenues dans le lysat. Le complexe protéine/anticorps monoclonal/billes de sépharose-protéine G est dissocié lors de l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) réalisée afin de séparer les protéines selon leur masse moléculaire uniquement. Les protéines sont transférées sur membrane de PVDF et les profils de migration sont observés après révélation chémoluminescente utilisant la formation d'un complexe streptavidine couplée à la peroxydase de raifort / biotine portée par les protéines membranaires. Cette technique permet l'étude des protéines membranaires uniquement car elles seules sont couplées à la biotine utilisée au début de l'expérimentation.

Matériel

- Agitateur plat
- Agitateur rotatif
- Centrifugeuse (Jouan, St Herblain, France)
- Plaque chauffante
- Générateur (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Cuve d'électrophorèse : Mini Protean II Cell (Bio Rad Laboratories)
- Système de transfert : Mini Trans-blot transfer cell (Bio Rad Laboratories)
- Salle de développement photographique munie d'un éclairage rouge
- Cassette pour développement photographique (Kodak, Sigma)

Réactifs

- Solution de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution, Sigma)
- Biotine (EZ Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, Rockford, Illinois, USA)
- Tampon biotine : Hepes 10 mM, pH 7,3-7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,2 mM, MgCl₂ 0,2 mM
- TBS 10x : Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM
- Tampon de lyse : Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NaN₃ 0,02 %
- Triton X100 (Sigma)
- Inhibiteurs de protéases :
 - PMSF 200x : Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Sigma)
 - Leupeptine 1000x : 0,5 mg/mL (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) dans Trasylol 10000 KIU/mL (ou Aprotinine, Bayer Pharma, Wuppertal, Allemagne)
 - Pepstatine 1000x : 1 mg/mL dans éthanol (Roche Diagnostics)
- Billes de sépharose couplées à la protéine G (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, Amersham, Uppsala, Suède)
- Sérum de chèvre (Sigma)
- PBS 1x
- Anticorps monoclonal anti-CD9 (ALB6)
- Tampon Laemmli (Tris HCl pH 6,8, 0,0625 M, SDS 2 %, Glycérol 10 %, β-mercaptoéthanol 5 %, Bleu de Bromophénol 0,001 %)
- Gel d'électrophorèse : Ready Gels, 4-15 % Tris-HCl (Bio Rad Laboratories)
- Marqueurs de masse moléculaire : Biotinylated SDS Molecular Weight Standard Mixture (Sigma)
- Tampon de migration : tampon O'Farrell 10x : Tris base 0,25 M, Glycine 2 M, SDS 0,03 M, qsp 1 L H₂O
- Membrane de PVDF : Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)
- Tampon de transfert : Tris base 0,02 M, Glycine 0,15 M, Méthanol 200 mL, qsp 1 L H₂O
- Solution de saturation : PBS 1x - BSA 5 % (BSA, PAA Laboratories, Linz, Autriche)
- Solution de lavage : TBS – Tween 20 0,05 % (Tween 20, Sigma)
- Streptavidine couplée à la peroxydase de raifort : Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase (Amersham)

- Solution contenant le substrat de la peroxydase : Renaissance Western blot chemoluminescence Reagent Plus (NEN Life Science products, Boston, MA, USA)
- Film photographique : X-Omat Blue Film (Kodak, Sigma)
- Solutions de développement photographique : GBX Developer/Replenisher et GBX Fixer/Replenisher (Kodak, Sigma)

Mode opératoire

1. Biotinylation des protéines de surface de cellules adhérentes

Le tapis cellulaire est lavé 3 à 5 fois avec du milieu de culture, puis incubé 1h à 4°C sur un agitateur plat dans du tampon biotine contenant 0,5 mg/mL de biotine. Après élimination du tampon, les cellules sont incubées 10 min dans du milieu de culture froid afin de permettre le quenching de la biotine libre, puis lavées 3 à 5 fois avec du TBS froid.

2. Lyse des cellules

Les cellules sont alors incubées 1h à 4°C sur agitateur dans du tampon de lyse contenant 1% de détergent (Triton X100) et des inhibiteurs de protéases (PMSF, Leupeptine, Trasylol, Pepstatine). Le lysat cellulaire est centrifugé 25 min à 16000xg à 4°C de façon à éliminer les débris cellulaires.

3. Preclearing

Une étape de preclearing est réalisée de façon à éliminer du lysat les protéines susceptibles de se fixer aux billes de façon aspécifique. Pour un volume de 500µL de lysat, 20 µL de billes protéine G-Sepharose (diluées au ½ dans du PBS et préalablement lavées 5 fois v/v avec du PBS) et 4 µL de sérum de chèvre sont ajoutés et incubés une nuit en chambre froide sur agitateur rotatif. Le lysat est centrifugé 25 min à 16000xg à 4°C. Le surnageant est récupéré et les billes éliminées.

4. Immunoprécipitation

Cinq cents µL de lysat sont incubés 1h à 4°C sur agitateur rotatif avec l'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine d'intérêt et dilué selon les indications du fabricant. Cinquante µL de billes protéine G-Sepharose sont ajoutés et une incubation d'une nuit sur agitateur rotatif à 4°C est réalisée. Une centrifugation courte à 12000 tours/min permet l'élimination du surnageant. Les billes sont lavées 5 fois dans du tampon de lyse contenant 1 % de détergent et des inhibiteurs de protéases (Leupeptine, Trasylol, Pepstatine). Trente à 45 µL de tampon Laemmli sont ajoutés avant chauffage 3 min à 100°C.

5. SDS-PAGE – Western blot

Une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est réalisée à l'aide de la cuve Mini Protean II Cell dans du tampon de migration, afin de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire uniquement, à 200 V pendant environ 45 min. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF à l'aide du système Mini Trans-blot transfer cell dans du tampon de transfert, à 60 V pendant 1h30.

6. Révélation par chimioluminescence

La membrane portant les protéines est incubée 1h dans une solution de saturation (PBS-BSA 5 %) sous agitation douce, puis incubée 1h dans une solution de PBS-Tween 20 0,05 % contenant de la streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort diluée au 1/2000. La membrane est alors lavée 2 fois dans du PBS-Tween 20 0,05 % et incubée dans la solution contenant le chromogène. L'excès de réactif de détection est éliminé à l'aide d'un papier absorbant et la membrane est exposée sur un film photo après avoir été enveloppée dans du film plastique alimentaire. Les signaux sont détectés après différents temps d'exposition (1, 5, 10, 20 min) par la réalisation successive de développement (GBX Developer / Replenisher), lavage à l'eau, fixation (GBX Fixer / Replenisher) et lavage à l'eau. Les films développés sont scannés et analysés à l'aide du logiciel Quantity One.

Fiche technique n°10

Détermination du profil d'expression cytokinique

Principe

Le profil d'expression cytokinique dans un surnageant de culture est déterminé simultanément pour de multiples cytokines par immunocapture à l'aide de la trousse RayBio™ Human Cytokine Array 3.1. Cette dernière est constituée d'anticorps spécifiques fixés sur une membrane de nitrocellulose. La présence de cytokines est mise en évidence par chémoluminescence à l'aide d'une solution d'anticorps libres biotinylés spécifiques des mêmes cytokines, et d'une solution de streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort.

Le tableau ci-dessous indique la disposition sur la membrane des divers contrôles et anticorps de cette trousse.

RayBio™ Human Cytokine Array III & 3.1

a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
1 Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
2 Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
3 IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12 p40p70	IL-13	IL-15	IFN- γ
4 IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12 p40p70	IL-13	IL-15	IFN- γ
5 MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
6 MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
7 TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-1	Angiogenin	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos
8 TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-1	Angiogenin	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos

Matériel

- Scanner G710 Calibrating Imaging Densitometer (Bio Rad)
- Logiciel Quantity One (Bio Rad)

Réactifs

- Trousse RayBio™ Human Cytokine Array III (Tebu-bio SA, Le Perray en Yvelines, France)
- X-Omat Blue Film (Kodak, Sigma)
- GBX Developer / Replenisher (Kodak, Sigma)
- GBX Fixer / Replenisher (Kodak, Sigma)

Mode opératoire

La membrane est placée dans la cuve à incubation fournie, la face portant les anticorps dirigés contre les 42 cytokines étudiées sur le dessus.

Deux mL de la solution de saturation 1x sont ajoutés et la membrane est incubée 30 min à température ambiante.

La solution de saturation est ensuite éliminée et la membrane incubée avec 1 mL d'échantillon de surnageant ou de milieu de culture seul à tester, pendant 2 h à température ambiante.

La membrane est alors lavée 3 fois 5 min avec 2 mL de tampon de lavage I 1x à température ambiante et sous agitation, puis 2 fois 5 min avec 2 mL de tampon de lavage II 1x.

La membrane est incubée 2 h avec 1 mL de la solution contenant le mélange d'anticorps spécifiques des cytokines recherchées, conjugués à la biotine et dilué selon les instructions du fabricant (1/250 dans la solution de saturation 1x).

La membrane est lavée selon les mêmes étapes de lavage que celles décrites précédemment.

La membrane est incubée 60 min dans une solution de streptavidine conjuguée à la peroxydase de Raifort diluée au 1/1000 dans la solution de saturation 1x.

La membrane est lavée selon les mêmes étapes de lavage que celles décrites précédemment.

La détection des cytokines est réalisée par incubation 5 min dans un mélange v/v de 2 tampons de détection fournis avec la trousse.

L'excès de réactif de détection est éliminé à l'aide d'un papier absorbant et la membrane est exposée sur un film photo après avoir été enveloppée dans du film plastique alimentaire.

Les signaux sont détectés après différents temps d'exposition (1, 5, 10, 20 min) par la réalisation successive de développement (GBX Developer / Replenisher), lavage à l'eau, fixation (GBX Fixer / Replenisher) et lavage à l'eau.

Les films développés sont scannés et analysés à l'aide du logiciel Quantity One.

Fiche technique n°11

Analyse du cycle cellulaire et compte de cellules

Principe

Lors du processus de multiplication, les cellules quittent le stade G0 pour entrer dans le cycle cellulaire qui se déroule en plusieurs phases avant d'aboutir à la mitose. La phase G1, caractérisée par une synthèse protéique, est suivie par une phase S au cours de laquelle le contenu en ADN augmente de 2n à 4n, ce dernier correspondant à la phase G2. Il est possible d'évaluer le contenu en ADN des cellules en suspension après perméabilisation des membranes cytoplasmique et nucléaire, par marquage à l'aide d'un fluorochrome s'intercalant dans la double hélice (iodure de propidium) et analyse par cytométrie de flux (Fiche technique n°2).

Des billes de calibration dont la concentration est définie par le fabricant permettent la détermination de la concentration des cellules étudiées. L'ajout d'un volume de billes à un volume équivalent de suspension cellulaire permet ainsi la quantification du nombre de noyaux présents dans celle-ci.

Matériels

- Cytomètre de flux (EPICS XL, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
- Logiciel Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA)

Réactifs

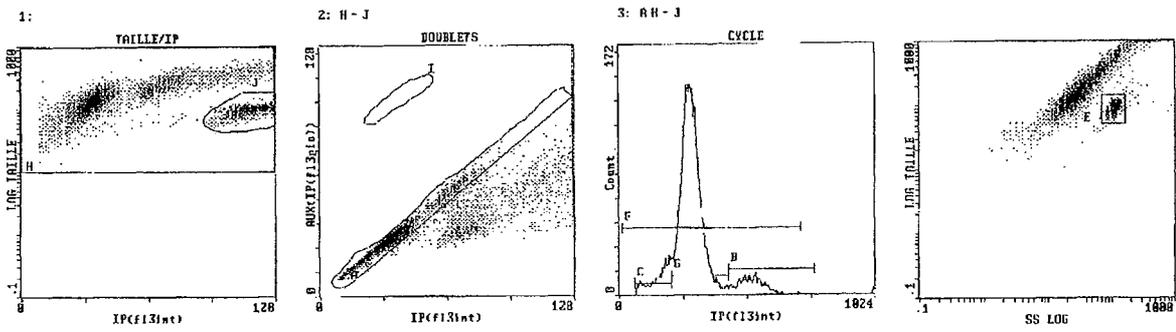
- Trousse de réactifs DNA-Prep (Beckman Coulter, Miami, FL, USA)
- Billes de calibration (Flow Count Fluorospheres, Beckman Coulter)

Mode opératoire

Cinquante μL de suspension cellulaire sont lysés à l'aide de 50 μL d'une solution de perméabilisation (DNA-Prep LPR) et l'ADN des cellules est marqué à l'aide de 300 μL d'une solution contenant de l'iodure de propidium et de la RNase (DNA-Prep Stain). Cinquante μL de billes de calibration homogénéisées sont alors ajoutés et l'analyse du marquage est effectuée en cytométrie de flux.

L'histogramme de cytométrie correspondant à la distribution linéaire de fluorescence (Figure n°21) est analysé à l'aide du logiciel Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, San

Diego, CA, USA) qui utilise un modèle dérivé de celui de Dean et Jett pour calculer les proportions de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (Figure n°22).



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled, counts adjusted by: 931/4329

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	J J	16.0	831	114.9	92.0	127.0	102.4	25	6.97	17.42
	H H	100	5826	65.5	157.2	127.0	952.9	208	58.87	71.93
2	A A	71.8	3516	37.3	30.3	34.0	29.0	81	33.73	32.76
	I I	0.00	0	****	****	****	****	**	**	**
5	E CAL931	16.0	931	111.3	91.1	110.0	102.4	46	13.48	17.01

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	B B	9.73	342	536.4	530.6	559.0	4	0.19	436.0	780.0
	C C	10.9	383	160.1	172.0	211.0	8	0.58	62.0	211.0
	F F	99.8	3507	300.3	286.0	284.0	36	9.19	12.0	726.0
	G G	79.8	2807	290.5	287.0	284.0	36	9.19	208.0	436.0

Figure n°21 : Histogrammes d'analyse du contenu en ADN en cytométrie de flux

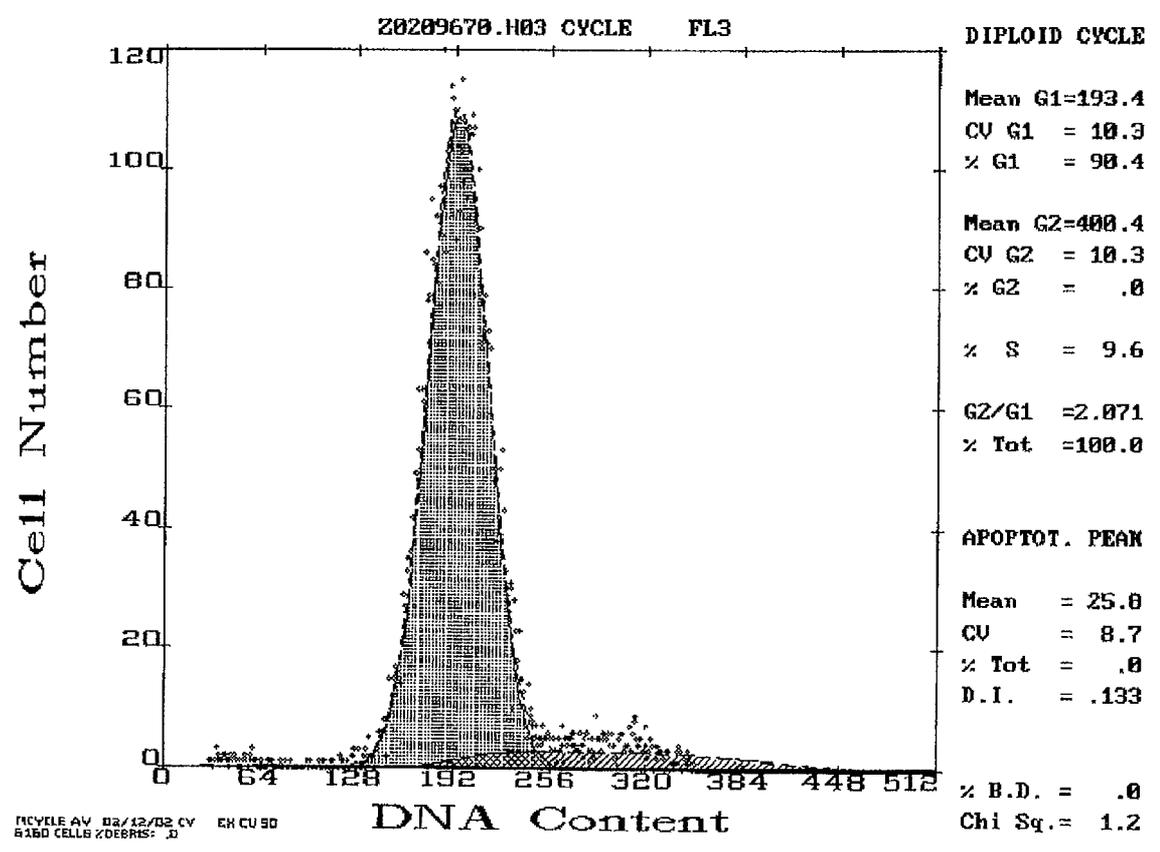


Figure n°22 : Histogramme d'interprétation du cycle cellulaire

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adachi M, Taki T, Ieki Y, Huang CL, Higashiyama M, Miyake M. Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1996;56(8):1751-5.

Adachi M, Taki T, Huang C, Higashiyama M, Doi O, Tsuji T, Miyake M. Reduced integrin alpha3 expression as a factor of poor prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol.* 1998;16(3):1060-7.

Airola K, Johansson N, Kariniemi AL, Kahari VM, Saarialho-Kere UK. Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. *J Invest Dermatol.* 1997;109(2):225-31.

Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 1990;50(20):6757-64.

Amano T, Furuno T, Hirashima N, Ohyama N, Nakanishi M. Dynamics of intracellular granules with CD63-GFP in rat basophilic leukemia cells. *J Biochem.* 2001;129(5):739-44.

Amiot M. Identification and analysis of cDNA clones encoding CD53. A pan-leukocyte antigen related to membrane transport proteins. *J Immunol.* 1990;145(12):4322-5.

Angelisova P, Vlcek C, Stefanova I, Lipoldova M, Horejsi V. The human leucocyte surface antigen CD53 is a protein structurally similar to the CD37 and MRC OX-44 antigens. *Immunogenetics.* 1990;32(4):281-5.

Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, Kunkel SL, Morris SB, Xue YY, Burdick MD, Glass MC, Iannettoni MD, Strieter RM. Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *J Clin Invest.* 1998;102(3):465-72.

Ariel A, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA, Lider O, Hershkovich R. IL-12 and IL-18 induce MAP kinase-dependent adhesion of T cells to extracellular matrix components. *J Leukoc Biol.* 2002;72(1):192-8.

Atsuta J, Sterbinsky SA, Plitt J, Schwiebert LM, Bochner BS, Schleimer RP. Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(5):571-82.

Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer.* 1999;79:1347-55.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.

Bascom RA, Manara S, Collins L, Molday RS, Kalnins VI, McInnes RR. Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disk rim protein family implicated in human retinopathies. *Neuron.* 1992; 8(6):1171-84.

Baudoux B, Castanares-Zapatero D, Leclercq-Smekens M, Berna N, Poumay Y. The tetraspanin CD9 associates with the integrin alpha6beta4 in cultured human epidermal keratinocytes and is involved in cell motility. *Eur J Cell Biol.* 2000;79(1):41-51.

Behr S, Schriever F. Engaging CD19 or target of an antiproliferative antibody 1 on human B lymphocytes induces binding of B cells to the interfollicular stroma of human tonsils via integrin alpha4beta1 and fibronectin. *J Exp Med.* 1995;182(5):1191-9.

Bell GM, Seaman WE, Niemi EC, Imboden JB. The OX-44 molecule couples to signaling pathways and is associated with CD2 on rat T lymphocytes and a natural killer cell line. *J Exp Med.* 1992;175(2):527-36.

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Rigolin GM, Escribano L, Lemez P, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Lanza F, van't Veer M; EGIL, European Group on Immunological Classification of Leukemias. CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review. *Leukemia*. 2004;18(3):394-400.

Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci*. 2001;114:4143-51.

Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem*. 1997;272(24):15496-500.

Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1198(1):11-26.

Boucheix C, Perrot JY, Mirshahi M, Giannoni F, Billard M, Bernadou A, Rosenfeld C. A new set of monoclonal antibodies against acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 1985;9(5):597-604.

Boucheix C, Benoit P, Frachet P, Billard M, Worthington RE, Gagnon J, Uzan G. Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J Biol Chem*. 1991;266(1):117-22.

Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(9):1189-205.

Boudreau N, Bissell MJ. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(5):640-6.

Bradbury LE, Kansas GS, Levy S, Evans RL, Tedder TF. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol*. 1992;149(9):2841-50.

Bradbury LE, Goldmacher VS, Tedder TF. The CD19 signal transduction complex of B lymphocytes. Deletion of the CD19 cytoplasmic domain alters signal transduction but not complex formation with TAPA-1 and Leu 13. *J Immunol*. 1993;151(6):2915-27.

Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reissfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 1994;79(7):1157-64.

Butler GS, Hutton M, Wattam BA, Williamson RA, Knauper V, Willenbrock F, Murphy G. The specificity of TIMP-2 for matrix metalloproteinases can be modified by single amino acid mutations. *J Biol Chem*. 1999;274(29):20391-6.

Callaway MP, Briggs JC. The incidence of late recurrence (greater than 10 years); an analysis of 536 consecutive cases of cutaneous melanoma. *Br J Plast Surg*. 1989;42(1):46-9.

Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Koop S, Morris VL, Khokha R, Groom AC. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev*. 1995;14(4):279-301.

Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(17):1260-70.

Chao C, Lotz MM, Clarke AC, Mercurio AM. A function for the integrin alpha6beta4 in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res*. 1996;56(20):4811-9.

Charrin S, Le Naour F, Oualid M, Billard M, Faure G, Hanash SM, Boucheix C, Rubinstein E. The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem*. 2001;276(17):14329-37.

Chattopadhyay N, Wang Z, Ashman LK, Brady-Kalnay SM, Kreidberg JA. Alpha3 beta1 integrin-CD151, a component of the cadherin-catenin complex, regulates PTPmu expression and cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 2003;163(6):1351-62.

Claas C, Seiter S, Claas A, Savelyeva L, Schwab M, Zoller M. Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *J Cell Biol.* 1998;141(1):267-80.

Claas C, Stipp CS, Hemler ME. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem.* 2001;276(11):7974-84.

Clark KL, Zeng Z, Langford AL, Bowen SM, Todd SC. PGRL is a major CD81-associated protein on lymphocytes and distinguishes a new family of cell surface proteins. *J Immunol.* 2001;167(9):5115-21.

Classon BJ, Williams AF, Willis AC, Seed B, Stamenkovic I. The primary structure of the human leukocyte antigen CD37, a species homologue of the rat MRC OX-44 antigen. *J Exp Med.* 1989;169(4):1497-502.

Clemans DL, Bauer RJ, Hanson JA, Hobbs MV, St Geme JW 3rd, Marrs CF, Gilsdorf JR. Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* 2000;68(8):4430-40.

Cockett MI, Murphy G, Birch ML, O'Connell JP, Crabbe T, Millican AT, Hart IR, Docherty AJ. Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem Soc Symp.* 1998;63:295-313.

Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 2002;109(8):987-91.

Corinti S, Chiarantini L, Dominici S, Laguardia ME, Magnani M, Girolomoni G. Erythrocytes deliver Tat to interferon-gamma-treated human dendritic cells for efficient initiation of specific type 1 immune responses in vitro. *J Leukoc Biol.* 2002;71(4):652-8.

Crawford HC, Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis.* 1994;14:234-45.

Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31221-4.

De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Roscigno A, Lieto E, Catalano G. Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Chest.* 2000;117(2):365-73.

Dedhar S, Saulnier R, Nagle R, Overall CM. Specific alterations in the expression of alpha 3 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in highly invasive and metastatic variants of human prostate carcinoma cells selected by in vitro invasion through reconstituted basement membrane. *Clin Exp Metastasis.* 1993;11(5):391-400.

Degos L. Annual guest lecture, Leukaemia Research Fund (UK): differentiation therapy and leukemia. *Leukemia.* 1993;7(5):766-72.

Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood.* 2001;97(2):339-45.

Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science.* 1995;268(5212):884-6.

Dong JT, Suzuki H, Pin SS, Bova GS, Schalken JA, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res.* 1996;56(19):4387-90.

Dowlati A, Levitan N, Remick SC. Evaluation of interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid and serum of patients with lung cancer. *J Lab Clin Med.* 1999;134(4):405-9.

Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:457-81.

Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL. Role of angiogenic factors: coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. *Laryngoscope*. 1999;109(5):687-93.

Engering A, Pieters J. Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *Int Immunol*. 2001;13(2):127-34.

Engering A, Kuhn L, Fluitsma D, Hoefsmit E, Pieters J. Differential post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. *Eur J Biochem*. 2003;270(11):2412-20.

Engers R, Gerharz CD, Donner A, Mrzyk S, Krause-Paulus R, Petek O, Gabbert HE. In vitro invasiveness of human epithelioid-sarcoma cell lines: association with cell motility and inverse correlation with the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases. *Int J Cancer*. 1999;80(3):406-12.

Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*. 1998;273(32):20121-7.

Evans TR, Kaye SB. Retinoids: present role and future potential. *Br J Cancer*. 1999;80:1-8.

Fan J, Hooker CW, McManus DP, Brindley PJ. A new member of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) of proteins from schistosomes, expressed by larval and adult *Schistosoma japonicum*. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1329(1):18-25.

Fan J, Brindley PJ. Characterization of cDNAs encoding a new family of tetraspanins from schistosomes : the Sj25 family. *Gene*. 1998;219(1-2):1-8.

Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, Kurzrock R. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*. 2001;97(1):256-63.

Fearon DT, Carter RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:127-49.

Finch JL, Miller J, Aspinall JO, Cowled PA. Cloning of the human uroplakin 1B cDNA and analysis of its expression in urothelial-tumor cell lines and bladder-carcinoma tissue. *Int J Cancer*. 1999;80(4):533-8.

Fitter S, Tetaz TJ, Berndt MC, Ashman LK. Molecular cloning of cDNA encoding a novel platelet-endothelial cell tetra-span antigen, PETA-3. *Blood*. 1995;86(4):1348-55.

Fitter S, Sincock PM, Jolliffe CN, Ashman LK. Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with beta1 and alphaIIb beta3 integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *Biochem J*. 1999;338:61-70.

Folkman J, Ingber D. Inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol*. 1992; 3(2):89-96.

Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol Med*. 1995;1(2):120-2.

Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS*. 1997;79:1-8.

Frassanito MA, Cusmai A, Dammacco F. Deregulated cytokine network and defective Th1 immune response in multiple myeloma. *Clin Exp Immunol*. 2001;125(2):190-7.

Freemantle SJ, Dmitrovsky E. Clinical link between p53 and angiogenesis in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(4):883-4.

Friedl P, Brocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(1):41-64.

Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis*. 1985;3(4):257-79.

Gabbert H. Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations. *Cancer Metastasis Rev*. 1985;4(4):293-309.

- Gabbert HE, Gerharz CD, Biesalski HK, Engers R, Luley C.** Terminal differentiation and growth inhibition of a rat rhabdomyosarcoma cell line (BA-HAN-1C) in vitro after exposure to retinoic acid. *Cancer Res.* 1988;48(18):5264-9.
- Gabbert HE, Meier S, Gerharz CD, Hommel G.** Incidence and prognostic significance of vascular invasion in 529 gastric-cancer patients. *Int J Cancer.* 1991;49(2):203-7.
- Gabbert HE, Meier S, Gerharz CD, Hommel G.** Tumor-cell dissociation at the invasion front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients. *Int J Cancer.* 1992;50(2):202-7.
- Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, Meier S, Moll R, Birchmeier W, Hommel G.** Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. *Int J Cancer.* 1996;69(3):184-9.
- Galizia G, Lieto E, De Vita F, Romano C, Orditura M, Castellano P, Imperatore V, Infusino S, Catalano G, Pignatelli C.** Circulating levels of interleukin-10 and interleukin-6 in gastric and colon cancer patients before and after surgery: relationship with radicality and outcome. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22(4):473-82.
- Galizia G, Orditura M, Romano C, Lieto E, Castellano P, Pelosio L, Imperatore V, Catalano G, Pignatelli C, De Vita F.** Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. *Clin Immunol.* 2002;102(2):169-78.
- Gaugitsch HW, Hofer E, Huber NE, Schnabl E, Baumruker T.** A new superfamily of lymphoid and melanoma cell proteins with extensive homology to *Schistosoma mansoni* antigen Sm23. *Eur J Immunol.* 1991;21(2):377-83.
- Gerharz CD, Bracke ME, Mareel MM, Gabbert HE.** Modulation of invasive potential in different clonal subpopulations of a rat rhabdomyosarcoma cell line (BA-HAN-1) by differentiation induction. *Clin Exp Metastasis.* 1993;11(1):55-67.
- Giancotti FG, Ruoslahti E.** Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell.* 1990;60(5):849-59.
- Giancotti FG, Ruoslahti E.** Integrin signaling. *Science.* 1999;285(5430):1028-32.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74(2):111-22.
- Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W.** Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* 1997;389(6646):77-81.
- Gooding JM, Yap KL, Ikura M.** The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays.* 2004;26(5):497-511.
- Gui GP, Wells CA, Yeomans P, Jordan SE, Vinson GP, Carpenter R.** Integrin expression in breast cancer cytology: a novel predictor of axillary metastasis. *Eur J Surg Oncol.* 1996;22(3):254-8.
- Hammond C, Denzin LK, Pan M, Griffith JM, Geuze HJ, Cresswell P.** The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol.* 1998;161(7):3282-91.
- Hart IR.** Perspective: tumour spread : the problems of latency. *J Pathol.* 1999;187(1):91-4.
- Hasegawa S, Koshikawa N, Momiyama N, Moriyama K, Ichikawa Y, Ishikawa T, Mitsuhashi M, Shimada H, Miyazaki K.** Matrilysin-specific antisense oligonucleotide inhibits liver metastasis of human colon cancer cells in a nude mouse model. *Int J Cancer.* 1998;76(6):812-6.
- Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, Satoh S, Kobayashi N, Yamaoka Y, Miyake M.** Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer.* 2003;89(1):158-67.

Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol.* 2002;3(8):461-9.

Hemler ME, Mannion BA, Berditchevski F. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1287:67-71.

Herbeuval JP, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol.* 2004;172(7):4630-6.

Herzberg F, Schoning M, Schirner M, Topp M, Thiel E, Kreuser ED. IL-4 and TNF- α induce changes in integrin expression and adhesive properties and decrease the lung-colonizing potential of HT-29 colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 1996;14(2):165-75.

Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK. Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer.* 1999;85(2):375-82.

Higashiyama M, Taki T, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Koh T, Kodama K, Doi O, Miyake M. Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1995;55(24):6040-4.

Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Adachi M, Huang CL, Taki T, Kasugai T, Ishiguro S, Nakamori S, Miyake M. Immunohistochemically detected expression of motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) in lung adenocarcinoma and its relation to prognosis. *Int J Cancer.* 1997;74(2):205-11.

Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, Takami K, Adachi M, Taki T, Ishiguro S, Nakamori S, Yoshie O, Miyake M. KAI1/CD82 expression in nonsmall cell lung carcinoma is a novel, favorable prognostic factor: an immunohistochemical analysis. *Cancer.* 1998;83(3):466-74.

Hinoda Y, Adachi Y, Takaoka A, Mitsuuchi H, Satoh Y, Itoh F, Kondoh Y, Imai K. Decreased expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in gastric cancer. *Cancer Lett.* 1998;129(2):229-34.

Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *Lancet.* 2000;355(9202):479-85.

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995;1(2):149-53.

Horejsi V, Vlecek C. Novel structurally distinct family of leucocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. *FEBS Lett.* 1991;288(1-2):1-4.

Horvath G, Serru V, Clay D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30537-43.

Hotta H, Ross AH, Huebner K, Isobe M, Wendeborn S, Chao MV, Ricciardi RP, Tsujimoto Y, Croce CM, Koprowski H. Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* 1988;48(11):2955-62.

Hua J, Muschel RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res.* 1996;56(22):5279-84.

Huang CI, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol.* 1998;153(3):973-83.

Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, Sasada R, Miyake M. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J Exp Med.* 1993;177(5):1231-7.

Imai T, Fukudome K, Takagi S, Nagira M, Furuse M, Fukuhara N, Nishimura M, Hinuma Y, Yoshie O. C33 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation is a member of a new family of transmembrane proteins including CD9, CD37, CD53, and CD63. *J Immunol.* 1992;149(9):2879-86.

Imai T, Yoshie O. C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J Immunol.* 1993;151(11):6470-81.

Ishii T, Walsh LJ, Seymour GJ, Powell RN. Modulation of Langerhans cell surface antigen expression by recombinant cytokines. *J Oral Pathol Med.* 1990;19(8):355-9.

Iwata S, Kobayashi H, Miyake-Nishijima R, Sasaki T, Souta-Kuribara A, Nori M, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. Distinctive signaling pathways through CD82 and beta1 integrins in human T cells. *Eur J Immunol.* 2002;32(5):1328-37.

Jankowski SA, Mitchell DS, Smith SH, Trent JM, Meltzer PS. SAS, a gene amplified in human sarcomas, encodes a new member of the transmembrane 4 superfamily of proteins. *Oncogene.* 1994;9(4):1205-11.

Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE. Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;244(2):414-20.

Jiang WG. Cell adhesion molecules in the formation of liver metastasis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1998a;5(4):375-82.

Jiang WG. Regulation of cell adhesion, a central mechanism in the anticancer action of essential fatty acids. *Int J Mol Med.* 1998b;1(3):621-5.

Kai HS, Butler GS, Morrison CJ, King AE, Pelman GR, Overall CM. Utilization of a novel recombinant myoglobin fusion protein expression system to characterize the tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-4 and TIMP-2 C-terminal domain and tails by mutagenesis. The importance of acidic residues in binding the MMP-2 hemopexin C-domain. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48696-707.

Kaji K, Takeshita S, Miyake K, Takai T, Kudo A. Functional association of CD9 with the Fc gamma receptors in macrophages. *J Immunol.* 2001;166(5):3256-65.

Kanetaka K, Sakamoto M, Yamamoto Y, Yamasaki S, Lanza F, Kanematsu T, Hirohashi S. Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2001;35(5):637-42.

Karamatic-Crew V, Burton N, Kagan A, Green CA, Levene C, Flinter F, Brady LR, Daniels G, Anstee DJ. CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood.* 2004 Jul 20. <http://www.bloodjournal.org/cgi/reprint/104/8/2217>

Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature.* 1997;390:632-6.

Keely P, Parise L, Juliano R. Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. *Trends Cell Biol.* 1998;8(3):101-6.

Ki Hong W, Lippman SM, Hittelman WN, Lotan R. Retinoid chemoprevention of aerodigestive cancer: from basic research to the clinic. *Clin Cancer Res.* 1995;1(7):677-86.

Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164(3):1269-76.

Kim LT, Yamada KM. The regulation of expression of integrin receptors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997;214(2):123-31.

Klein-Soyer C, Azorsa DO, Cazenave JP, Lanza F. CD9 participates in endothelial cell migration during in vitro wound repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(2):360-9.

Knobeloch KP, Wright MD, Ochsenbein AF, Liesenfeld O, Lohler J, Zinkernagel RM, Horak I, Orinska Z. Targeted inactivation of the tetraspanin CD37 impairs T-cell-dependent B-cell response under suboptimal costimulatory conditions. *Mol Cell Biol.* 2000;20(15):5363-9.

Kobayashi T, Vischer UM, Rosnoble C, Lebrand C, Lindsay M, Parton RG, Kruithof EK, Gruenberg J. The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 2000;11(5):1829-43.

Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med.* 2003;198(8):1201-12.

Kopczynski CC, Davis GW, Goodman CS. A neural tetraspanin, encoded by late bloomer, that facilitates synapse formation. *Science.* 1996;271(5257):1867-70.

Kropshofer H, Spindeldreher S, Rohn TA, Platania N, Grygar C, Daniel N, Wolpl A, Langen H, Horejsi V, Vogt AB. Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat Immunol.* 2002;3(1):61-8.

Lanza F, Wolf D, Fox CF, Kieffer N, Seyer JM, Fried VA, Coughlin SR, Phillips DR, Jennings LK. cDNA cloning and expression of platelet p24/CD9. Evidence for a new family of multiple membrane-spanning proteins. *J Biol Chem.* 1991;266(16):10638-45.

Lazo PA, Cuevas L, Gutierrez del Arroyo A, Orue E. Ligation of CD53/OX44, a tetraspan antigen, induces homotypic adhesion mediated by specific cell-cell interactions. *Cell Immunol.* 1997;178(2):132-40.

Le Naour F, Charrin S, Labas V, Le Caer JP, Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins connect several types of Ig proteins: IgM is a novel component of the tetraspanin web on B-lymphoid cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53(3):148-52.

Lebel-Binay S, Lagaudriere C, Fradelizi D, Conjeaud H. CD82, member of the tetra-span-transmembrane protein family, is a costimulatory protein for T cell activation. *J Immunol.* 1995;155(1):101-10.

Ledbetter JA, Shu G, Clark EA. Monoclonal antibodies to a new gp40-45 (CD37) B-cell-associated cluster group modulate B-cell proliferation. In *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, Crumpton MJ, Gilks W, Gotch FM, Hogg N, Horton M, Ling N, MacLennan ICM, Mason DY, Milstein C, Spiegelhalter D, Waldmann H (eds), Oxford University Press. Oxford. 1987:p339-40.

Leeman MF, Curran S, Murray GI. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol.* 2003;201(4):528-34.

Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N. The regulation of integrin function by Ca(2+). *Biochim Biophys Acta.* 2000;1498:91-8.

Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:89-109.

Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, Wilder RL, Elenkov IJ. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol.* 2000;164(1):436-42.

Lippman SM, Benner SE, Hong WK. Cancer chemoprevention. *J Clin Oncol.* 1994;12(4):851-73.

Lippman SM, Heyman RA, Kurie JM, Benner SE, Hong WK. Retinoids and chemoprevention: clinical and basic studies. *J Cell Biochem Suppl.* 1995;22:1-10.

Lombardi DP, Geradts J, Foley JF, Chiao C, Lamb PW, Barrett JC. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1999;59(22):5724-31.

Longo N, Yanez-Mo M, Mittelbrunn M, de la Rosa G, Munoz ML, Sanchez-Madrid F, Sanchez-Mateos P. Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood*. 2001;98(13):3717-26.

Lozahic S, Christiansen D, Manie S, Gerlier D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein. CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol*. 2000;30(3):900-7.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 1995;154(10):5071-9.

Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*. 1997;11(6):428-42.

Maecker HT, Levy S. Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *J Exp Med*. 1997;185(8):1505-10.

Maecker HT, Do MS, Levy S. CD81 on B cells promotes interleukin 4 secretion and antibody production during T helper type 2 immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(5):2458-62.

Maecker HT. Human CD81 directly enhances Th1 and Th2 cell activation, but preferentially induces proliferation of Th2 cells upon long-term stimulation. *BMC Immunol*. 2003;4(1):1. <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/4/1>

Mahmudi-Azer S, Downey GP, Moqbel R. Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood*. 2002;99(11):4039-47.

Mainiero F, Murgia C, Wary KK, Curatola AM, Pepe A, Blumemberg M, Westwick JK, Der CJ, Giancotti FG. The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO J*. 1997;16(9):2365-75.

Mantegazza AR, Barrio MM, Moutel S, Bover L, Weck M, Brossart P, Teillaud JL, Mordoh J. CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells. *Blood*. 2004;104(4):1183-90.

Marches R, Scheuermann RH, Uhr JW. Cancer dormancy: role of cyclin-dependent kinase inhibitors in induction of cell cycle arrest mediated via membrane IgM. *Cancer Res*. 1998;58(4):691-7.

Mareel MM, Van Roy FM, Bracke ME. How and when do tumor cells metastasize? *Crit Rev Oncog*. 1993;4(5):559-94.

Matsumoto AK, Martin DR, Carter RH, Klickstein LB, Ahearn JM, Fearon DT. Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J Exp Med*. 1993;178(4):1407-17.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-5.

Mazzolini G, Prieto J, Melero I. Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr Pharm Des*. 2003;9(24):1981-91.

Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today*. 1999;20(10):469-73.

Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, Blay JY. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1998;92(12):4778-91.

Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem*. 1991;266(5):3239-45.

Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis. *Eur J Cancer*. 1998;34(2):214-21.

Michaux G, Cutler DF. How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of weibel-palade bodies. *Traffic*. 2004;5(2):69-78.

- Mikamo H, Johri AK, Paoletti LC, Madoff LC, Onderdonk AB.** Adherence to, invasion by, and cytokine production in response to serotype VIII group B Streptococci. *Infect Immun.* 2004;72(8):4716-22.
- Mishima T, Murata J, Toyoshima M, Fujii H, Nakajima M, Hayashi T, Kato T, Saiki I.** Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clin Exp Metastasis.* 1998;16(6):541-50.
- Miyake M, Koyama M, Seno M, Ikeyama S.** Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility. *J Exp Med.* 1991;174(6):1347-54.
- Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Itoi S, Koh T, Taki T.** Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res.* 1995;55(18):4127-31.
- Miyake M, Nakano K, Itoi SI, Koh T, Taki T.** Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 1996;56(6):1244-9.
- Miyazaki T, Muller U, Campbell KS.** Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *EMBO J.* 1997;16(14):4217-25.
- Momoi A, Murao K, Imachi H, Ishida T, Cao WM, Sato M, Takahara J.** Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 expression in cytokine-treated human lung epithelial cells by thiazolidinedione. *Chest.* 2001;120(4):1293-300.
- Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Taylor SM, DeClerck YA.** Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. *Cancer Res.* 1994;54(20):5467-73.
- Monti P, Leone BE, Zerbi A, Balzano G, Cainarca S, Sordi V, Pontillo M, Mercalli A, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L.** Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10 high IL-12 low regulatory dendritic cell. *J Immunol.* 2004;172(12):7341-9.
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo Jr LD, Thomson AW.** Endocytosis, Intracellular Sorting and Processing of Exosomes by Dendritic Cells. *Blood.* 2004. <http://www.bloodjournal.org/cgi/reprint/2004-03-0824v1>
- Morris VL, Koop S, MacDonald IC, Schmidt EE, Grattan M, Percy D, Chambers AF, Groom AC.** Mammary carcinoma cell lines of high and low metastatic potential differ not in extravasation but in subsequent migration and growth. *Clin Exp Metastasis.* 1994;12(6):357-67.
- Mouawad R, Khayat D, Merle S, Antoine EC, Gil-Delgado M, Soubrane C.** Is there any relationship between interleukin-6/interleukin-6 receptor modulation and endogenous interleukin-6 release in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy? *Melanoma Res.* 1999;9(2):181-8.
- Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE.** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut.* 1998;43(6):791-7.
- Nakanishi Y, Ochiai A, Akimoto S, Kato H, Watanabe H, Tachimori Y, Yamamoto S, Hirohashi S.** Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin and plakoglobin in esophageal carcinomas and its prognostic significance: immunohistochemical analysis of 96 lesions. *Oncology.* 1997;54(2):158-65.
- O'Brien AD, Standiford TJ, Christensen PJ, Wilcoxon SE, Paine R.** Chemotaxis of alveolar macrophages in response to signals derived from alveolar epithelial cells. *J Lab Clin Med.* 1998;131(5):417-24.

Olson KA, Fett JW, French TC, Key ME, Vallee BL. Angiogenin antagonists prevent tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(2):442-6.

Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol.* 1990 ;10(8):4007-15.

Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature.* 1997;385(6616):537-40.

Peñas PF, Garcia-Diez A, Sanchez-Madrid F, Yanez-Mo M. Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration. *J Invest Dermatol.* 2000;114(6):1126-35.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 1998;392(6672):190-3.

Polito AJ, Proud D. Epithelia cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102(5):714-8.

Puig-Kroger A, Sanz-Rodriguez F, Longo N, Sanchez-Mateos P, Botella L, Teixeira J, Bernabeu C, Corbi AL. Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol.* 2000;165(8):4338-45.

Qian F, Vaux DL, Weissman IL. Expression of the integrin alpha 4 beta 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell.* 1994;77(3):335-47.

Rabbani SA, Xing RH. Role of urokinase (uPA) and its receptor (uPAR) in invasion and metastasis of hormone-dependent malignancies. *Int J Oncol.* 1998;12(4):911-20.

Racila E, Hsueh R, Marches R, Tucker TF, Krammer PH, Scheuermann RH, Uhr JW. Tumor dormancy and cell signaling: anti-mu-induced apoptosis in human B-lymphoma cells is not caused by an APO-1-APO-1 ligand interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(5):2165-8.

Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J.* 1994;7(11):2062-72.

Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Int J Oncol.* 1998;13(5):893-906.

Richter M, Cantin AM, Beaulieu C, Cloutier A, Larivee P. Zinc chelators inhibit eotaxin, RANTES, and MCP-1 production in stimulated human airway epithelium and fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285(3):L719-29.

Rollins BJ. JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer Cells.* 1991;3(12):517-24.

Roussel E, Gingras MC, Ro JY, Branch C, Roth JA. Loss of alpha 1 beta 1 and reduced expression of other beta 1 integrins and CAM in lung adenocarcinoma compared with pneumocytes. *J Surg Oncol.* 1994;56(3):198-208.

Rowin ME, Whatley RE, Yednock T, Bohnsack JF. Intracellular calcium requirements for beta1 integrin activation. *J Cell Physiol.* 1998;175(2):193-202.

Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudriere-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol.* 1996;26(11):2657-65.

Sabichi AL, Lerner SP, Grossman HB, Lippman SM. Retinoids in the chemoprevention of bladder cancer. *Curr Opin Oncol.* 1998;10(5):479-84.

Salgado R, Junius S, Benoy I, Van Dam P, Vermeulen P, Van Marck E, Huget P, Dirix LY. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer.* 2003;103(5):642-6.

Salvi S, Semper A, Blomberg A, Holloway J, Jaffar Z, Papi A, Teran L, Polosa R, Kelly F, Sandstrom T, Holgate S, Frew A. Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20(5):984-91.

Sandhu JK, Privora HF, Wenckebach G, Birnboim HC. Neutrophils, nitric oxide synthase, and mutations in the mutatest murine tumor model. *Am J Pathol.* 2000;156(2):509-18.

Satoh Y, Esche C, Gambotto A, Shurin GV, Yurkovetsky ZR, Robbins PD, Watkins SC, Todo S, Herberman RB, Lotze MT, Shurin MR. Local administration of IL-12-transfected dendritic cells induces antitumor immune responses to colon adenocarcinoma in the liver in mice. *J Exp Ther Oncol.* 2002;2(6):337-49.

Sauer G, Windisch J, Kurzeder C, Heilmann V, Kreienberg R, Deissler H. Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion. *Clin Cancer Res.* 2003;9(17):6426-31.

Schwartz-Albiez R, Dorken B, Hofmann W, Moldenhauer G. The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *J Immunol.* 1988;140(3):905-14.

Secrist H, Levy S, DeKruyff RH, Umetsu DT. Ligation of TAPA-1 (CD81) or major histocompatibility complex class II in co-cultures of human B and T lymphocytes enhances interleukin-4 synthesis by antigen-specific CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1996;26(7):1435-42.

Seifert M, Sterry W, Effenberger E, Rexin A, Friedrich M, Haeussler-Quade A, Volk HD, Asadullah K. The antipsoriatic activity of IL-10 is rather caused by effects on peripheral blood cells than by a direct effect on human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2000;292(4):164-72.

Serini G, Trusolino L, Saggiorato E, Cremona O, De Rossi M, Angeli A, Orlandi F, Marchisio PC. Changes in integrin and E-cadherin expression in neoplastic versus normal thyroid tissue. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(7):442-9.

Serru V, Le Naour F, Billard M, Azorsa DO, Lanza F, Boucheix C, Rubinstein E. Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J.* 1999;340:103-11.

Serru V, Dessen P, Boucheix C, Rubinstein E. Sequence and expression of seven new tetraspans. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1478(1):159-63.

Shaw S. Concepts in cross-lineage (Blind Panel) analysis of expression of differentiation antigens. In *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.* Schlossman S, Boumsell L, Gilks W, Harlan J, Tedder T, Todd R (eds), Oxford University Press. Oxford. 1994:p3-7.

Shaw AR, Domanska A, Mak A, Gilchrist A, Dobler K, Visser L, Poppema S, Fliegel L, Letarte M, Willett BJ. Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers beta 1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1995;270(41):24092-9.

Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell.* 1997;91(7):949-60.

Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D. Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp.* 1999;65:233-43.

Shigeta M, Sanzen N, Ozawa M, Gu J, Hasegawa H, Sekiguchi K. CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC- and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol.* 2003;163(1):165-76.

Sincock PM, Mayrhofer G, Ashman LK. Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(4):515-25.

Sincock PM, Fitter S, Parton RG, Berndt MC, Gamble JR, Ashman LK. PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *J Cell Sci.* 1999;112:833-44.

Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP. CD63 associates with CD11/CD18 in large detergent-resistant complexes after translocation to the cell surface in human neutrophils. *FEBS Lett.* 2000;469(1):52-6.

Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, Orringer MB, Whyte RI, Burdick MD, Wilke CA, Strieter RM. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J Exp Med.* 1994;179(5):1409-15.

Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol.* 1998;10(11):1593-8.

Stallmach A, von Lampe B, Matthes H, Bornhoft G, Riecken EO. Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation. *Gut.* 1992;33(3):342-6.

Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood.* 1999;93(5):1634-42.

Sterk LM, Geuijen CA, Oomen LC, Calafat J, Janssen H, Sonnenberg A. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol.* 2000;149(4):969-82.

Sterk LM, Geuijen CA, van den Berg JG, Claessen N, Weening JJ, Sonnenberg A. Association of the tetraspanin CD151 with the laminin-binding integrins alpha3beta1, alpha6beta1, alpha6beta4 and alpha7beta1 in cells in culture and in vivo. *J Cell Sci.* 2002;115:1161-73.

Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 1993;7(15):1434-41.

Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opdenakker G, Van Damme J, Kunkel SL. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol.* 1995;57(5):752-62.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 1995;270(10):5331-8.

Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC, Laug WE, DeClerck YA. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res.* 1998;58(10):2209-16.

Sugiura T, Berditchevski F. Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J Cell Biol.* 1999;146(6):1375-89.

Szala S, Kasai Y, Steplewski Z, Rodeck U, Koprowski H, Linnenbach AJ. Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(17):6833-7.

Tai XG, Yashiro Y, Abe R, Toyooka K, Wood CR, Morris J, Long A, Ono S, Kobayashi M, Hamaoka T, Neben S, Fujiwara H. A role for CD9 molecules in T cell activation. *J Exp Med.* 1996;184(2):753-8.

Takagi S, Fujikawa K, Imai T, Fukuhara N, Fukudome K, Minegishi M, Tsuchiya S, Konno T, Hinuma Y, Yoshie O. Identification of a highly specific surface marker of T-cell acute lymphoblastic leukemia and neuroblastoma as a new member of the transmembrane 4 superfamily. *Int J Cancer.* 1995;61(5):706-15.

Takaoka A, Hinoda Y, Satoh S, Adachi Y, Itoh F, Adachi M, Imai K. Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene.* 1998a;16(11):1443-53.

Takaoka A, Hinoda Y, Sato S, Itoh F, Adachi M, Hareyama M, Imai K. Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Jpn J Cancer Res.* 1998b;89(4):397-404.

Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer.* 1998;83(6):1153-62.

Tani T, Karttunen T, Kiviluoto T, Kivilaakso E, Burgeson RE, Sipponen P, Virtanen I. Alpha 6 beta 4 integrin and newly deposited laminin-1 and laminin-5 form the adhesion mechanism of gastric carcinoma. Continuous expression of laminins but not that of collagen VII is preserved in invasive parts of the carcinomas: implications for acquisition of the invading phenotype. *Am J Pathol.* 1996;149(3):781-93.

Tarrant JM, Groom J, Metcalf D, Li R, Borobokas B, Wright MD, Tarlinton D, Robb L. The absence of Tssc6, a member of the tetraspanin superfamily, does not affect lymphoid development but enhances in vitro T-cell proliferative responses. *Mol Cell Biol.* 2002;22(14):5006-18.

Tarrant JM, Robb L, van Spriell AB, Wright MD. Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol.* 2003;24(11):610-7.

Testa JE, Brooks PC, Lin JM, Quigley JP. Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res.* 1999;59(15):3812-20.

They C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol.* 1999;147(3):599-610.

Todd SC, Lipps SG, Crisa L, Salomon DR, Tsoukas CD. CD81 expressed on human thymocytes mediates integrin activation and interleukin 2-dependent proliferation. *J Exp Med.* 1996;184(5):2055-60.

Todd SC, Doctor VS, Levy S. Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1399(1):101-4.

Todres E, Nardi JB, Robertson HM. The tetraspanin superfamily in insects. *Insect Mol Biol.* 2000;9(6):581-90.

Tokuhara T, Hasegawa H, Hattori N, Ishida H, Taki T, Tachibana S, Sasaki S, Miyake M. Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):4109-14.

Tomlinson MG, Wright MD. A new transmembrane 4 superfamily molecule in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Evol.* 1996;43(3):312-4.

Toyo-oka K, Yashiro-Ohtani Y, Park CS, Tai XG, Miyake K, Hamaoka T, Fujiwara H. Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association. *Int Immunol.* 1999;11(12):2043-52.

Travis GH, Sutcliffe JG, Bok D. The retinal degeneration slow (rds) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein. *Neuron.* 1991;6(1):61-70.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(2):133-46.

Tsitsikov EN, Gutierrez-Ramos JC, Geha RS. Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10844-9.

Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J Gastroenterol.* 1994;29(4):423-9.

Verselis SJ, Olson KA, Fett JW. Regulation of angiogenin expression in human HepG2 hepatoma cells by mediators of the acute-phase response. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;259(1):178-84.

Vitetta ES, Tucker TF, Racila E, Huang YW, Marches R, Lane N, Scheuermann RH, Street NE, Watanabe T, Uhr JW. Tumor dormancy and cell signaling. V. Regrowth of the BCL1 tumor after dormancy is established. *Blood.* 1997;89(12):4425-36.

Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* 1991;66(1):107-19.

Wahl LM, Kleinman HK. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(21):1583-4.

Wang M, Liu YE, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen EM, Shi YE. Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Oncogene.* 1997;14(23):2767-74.

Wang XQ, Evans GF, Alfaro ML, Zuckerman SH. Down-regulation of macrophage CD9 expression by interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(3):891-7.

Wang Z, Symons JM, Goldstein SL, McDonald A, Miner JH, Kreidberg JA. $\alpha 3\beta 1$ integrin regulates epithelial cytoskeletal organization. *J Cell Sci.* 1999;112(17):2925-35.

Weinel RJ, Rosendahl A, Pinschmidt E, Kisker O, Simon B, Santoso S. The alpha 6-integrin receptor in pancreatic carcinoma. *Gastroenterology.* 1995;108(2):523-32.

Weiss L, Dimitrov DS, Angelova M. The hemodynamic destruction of intravascular cancer cells in relation to myocardial metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(17):5737-41.

Werb Z, Ashkenas J, MacAuley A, Wiesen JF. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res.* 1996;29(9):1087-97.

Wice BM, Gordon JI. A tetraspan membrane glycoprotein produced in the human intestinal epithelium and liver that can regulate cell density-dependent proliferation. *J Biol Chem.* 1995;270(37):21907-18.

Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(4):1402-7.

Wislez M, Philippe C, Antoine M, Rabbe N, Moreau J, Bellocq A, Mayaud C, Milleron B, Soler P, Cadranel J. Upregulation of bronchioloalveolar carcinoma-derived C-X-C chemokines by tumor infiltrating inflammatory cells. *Inflamm Res.* 2004;53(1):4-12.

Witherden DA, Boismenu R, Havran WL. CD81 and CD28 costimulate T cells through distinct pathways. *J Immunol.* 2000;165(4):1902-9.

Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, Ratcliffe C, Pastorino U, Tetley TD. Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30(4):500-9.

Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991;5(8):2145-54.

Wright MD, Henkle KJ, Mitchell GF. An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumor-associated antigen. *J Immunol.* 1990;144(8):3195-200.

Wright MD, Tomlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today.* 1994;15(12):588-94.

Yanez-Mo M, Alfranca A, Cabanas C, Marazuela M, Tejedor R, Ursa MA, Ashman LK, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol.* 1998;141(3):791-804.

Yanez-Mo M, Tejedor R, Rousselle P, Sanchez -Madrid F. Tetraspanins in intercellular adhesion of polarized epithelial cells: spatial and functional relationship to integrins and cadherins. *J Cell Sci.* 2001;114:577-87.

Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(13):5284-8.

Yauch RL, Berditchevski F, Harler MB, Reichner J, Hemler ME. Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell.* 1998;9(10):2751-65.

Yauch RL, Kazarov AR, Desai B, Lee RT, Hemler ME. Direct extracellular contact between integrin alpha3beta1 and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem.* 2000;275(13):9230-8.

Yokota J, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.* 2004;95(3):197-204.

Yu J, Lin JH, Wu XR, Sun TT. Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. *J Cell Biol.* 1994;125(1):171-82.

Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31226-32.

Yuan A, Yang PC, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(5):1957-63.

Yuan A, Yu CJ, Luh KT, Kuo SH, Lee YC, Yang PC. Aberrant p53 expression correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and interleukin-8 mRNA and neoangiogenesis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(4):900-10.

Zhang GJ, Adachi I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res.* 1999;19:1427-32.

Zhang XA, Lane WS, Charrin S, Rubinstein E, Liu L. EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63(10):2665-74.

Zhu N, Eves PC, Katerinaki E, Szabo M, Morandini R, Ghanem G, Lorigan P, MacNeil S, Haycock JW. Melanoma cell attachment, invasion, and integrin expression is upregulated by tumor necrosis factor alpha and suppressed by alpha melanocyte stimulating hormone. *J Invest Dermatol.* 2002;119(5):1165-71.

ARTICLES

Tetraspan and Beta-1 Integrins Expression Pattern of the Epithelial Lung Adenocarcinoma Cell Line A549 and Its Sensitivity to Divalent Cations

Frédéric Massin,¹ Eric Rubinstein,² Gilbert C. Faure,¹ Yves Martinet,³ Claude Boucheix,² and Marie C. Béné^{1*}

¹Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine de Nancy, Vandoeuvre lès Nancy, France

²U Inserm 268, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

³Service de Pneumologie, CHU de Nancy, Vandoeuvre lès Nancy, France

Background: Tetraspans are ubiquitous integral transmembrane molecules associated on the cell surface with such adhesion molecules as integrins. Their expression has been shown to vary in tumors, but has seldom been described on lung tumoral epithelial cells, and the conditions required for a proper association of tetraspans and integrins have not yet been fully explored.

Methods: We investigated the expression of 10 tetraspans and six $\beta 1$ integrins on the tumoral lung epithelial cell line A549. Cells were examined both in quantitative flow cytometry and as monolayers, under normal or chelated conditions, in order to determine the cation dependency of their expression.

Results: Five tetraspans and four $\beta 1$ integrins are expressed on the membrane of A549 cells. Both quantitative and qualitative surface and cytoplasmic modifications of this pattern were induced in chelating conditions, suggesting the importance of divalent cations for the expression of these molecules.

Conclusions: These data indicate that a specific pattern of tetraspans and integrins, relying strongly on the availability of divalent cations in the microenvironment, is expressed by tumoral epithelial cells.

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key terms: tetraspans; $\beta 1$ integrins; chelation; epithelial cells; lung cancer

The tetraspans compose a large superfamily (>20 members) of surface molecules characterized by the presence of four highly conserved hydrophobic transmembrane domains delimiting three short cytoplasmic domains and two extracellular loops of unequal size. These molecules, discovered at the beginning of the 1990s, have significant sequence similarity to each other and, for some of them, a signature sequence is present between transmembrane domains 2 and 3 (1,2,3). This superfamily appears to be ancient, since members are found in *Schistosoma* (4), *Drosophila* (5), and in the nematode *Caenorhabditis elegans* (6). The expression of tetraspans on a wide variety of cell and tissue types, moreover, suggests a key role in cellular function (2,3), as it seems that all nucleated cells express several tetraspans (7). Indeed, tetraspans have been shown to be associated with such cellular activities as cell adhesion, motility, proliferation, differentiation, and activation, and are coupled to signal transduction pathways (1–3,8).

The involvement of tetraspans in the modulation of tumor cell metastasis (tumor progression) seems to be of particular interest (9). The expression of some tetraspans

such as CD9, CD63, and CD82, has been reported to be inversely correlated with the metastatic potential of several cancers (1). This inhibitory effect on metastasis might be related to the involvement of tetraspans in cell motility (10). This was indirectly shown in vitro by monoclonal antibodies to tetraspans (11,12). A positive tumor metastasis effect of the expression of the tetraspan Co-O29 (13) has also been reported, suggesting that inside the tetraspan superfamily different molecules may present opposite roles.

The involvement of tetraspans in cell motility may also be related to the fact that they associate in numerous cell types with $\beta 1$ integrins (22,26,27,35). Indeed, a growing

Contract grant sponsor: French Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Technologies; Contract grant number: EA 3443.

*Correspondence to: M.C. Béné, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, BP 184, 54500, Vandoeuvre lès Nancy, France.

E-mail: bene@grip.u-nancy.fr

Received 6 July 2003; Accepted 5 January 2004

Published online 14 June 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.20010

number of coimmunoprecipitation studies points out the association of tetraspans in large membrane molecular complexes designated as "the tetraspan web" (15), where tetraspans were found to associate with each other and to nontetraspan surface molecules such as HLA-DR (15,17), and the $\beta 1$ integrins (11,16,18-23).

Integrins are divalent cation-binding molecules, and changes in their ability to bind to Ca^{2+} or Mg^{2+} modify their expression and properties (24). Their physical association with tetraspans could also depend on the availability of metal ions, as many cell-cell interactions require the presence of divalent cations for better stability (25). Indeed, the homotypic adhesion of rat B-lymphoma cells through CD53 was shown to depend on divalent cations (25), and Rowin et al. (26) have shown that calcium chelation inhibited the activation of $\beta 1$ integrins. With regard to the metastatic potential of tumor cells, Mishima et al. (27) have observed that calcium chelation inhibited the invasive properties of several types of cancer.

Here we report on a study designed to define the pattern of expression of a large panel of tetraspans and $\beta 1$ integrins on epithelial bronchial tumor cells, and to understand the influence of divalent cations on this pattern. Suspensions were used to determine membrane expression and adherent layers for intracellular partition.

MATERIALS AND METHODS

Cell Line and Culture

Human lung adenocarcinoma cells (A549; ATCC, CCL-185) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and maintained for 30 subcultures. Cells were grown to confluence in 80 cm^2 flasks (EasY Flasks; Nalge Nunc International, Rochester, NY) or in chamber slides (Lab-Tek II chamber slide system; Nalge Nunc International) containing Ham's F12 medium (Nutrient Mixture F-12 Ham; Sigma, St. Louis, MO) with L-glutamine and sodium bicarbonate, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma), and 0.5% of an antibiotics mixture (penicillin [10,000 U/ml], streptomycin [10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$], fungizone [25 $\mu\text{g}/\text{ml}$]; Gibco-BRL-Life Technologies, Rockville, MD). Cells were cultured in a controlled water-saturated atmosphere with 6% CO_2 at 37°C (IR Sensor CO_2 incubator; Sanyo, Tokyo, Japan) and subcultured after trypsinization using Trypsin-EDTA (0.25% trypsin-EDTA solution, Sigma). The culture medium was renewed every three days.

Antibodies

The 11 anti-tetraspan monoclonal antibodies (MoAbs) and ascites used for this study were ALB-6 (CD9) (28), BL14 (CD37), Z53.1 (CD53), Z81.1 (CD81), AZM22.1 (Co-029), AZM30 (TALLA-1) (29), H5C6 (CD63) (30), γC11 (CD82) (31), and 2E12 (NAG-2) (32). Two anti-CD151 MAbs, 11B1G4 (11) and IB4B4 (E. Rubinstein), recognizing two different epitopes on this tetraspan, were also used in cell immunophenotyping. The anti- $\beta 1$ integrin CD29 and negative control anti-CD3 used for this study were, respectively, K20 and UCHT1, obtained from Beckman-Coulter (Brea, CA). MoAb to integrin alpha-chains

$\alpha 1/\text{CD49a}$ (MTJ), $\alpha 2/\text{CD49b}$ (10Pe9b), and $\alpha 3/\text{CD49c}$ (KID) were provided by E. Rubinstein, as well as the ascites 8B5C12A9 and MIR14A40, respectively specific for $\alpha 4/\text{CD49d}$ and $\alpha 5/\text{CD49e}$ integrin chains. The MoAb to integrin $\alpha 6/\text{CD49f}$ (GoH3) was obtained from Pharmin-gen-Becton Dickinson (Franklin, NJ).

Flow Cytometry

The A549 cell layer was dispersed using a 0.25% Trypsin-EDTA solution and resuspended in 6.0 to 8.0 ml of growth medium. The cell suspension was centrifuged 10 min at 125 g at +4°C and the supernatant was discarded. Cells were then resuspended in Hank's medium at $50-60 \times 10^6$ cells/ml. A total of 50 μl aliquots of this A549 cell suspension were incubated with 5 μl of the corresponding MoAb for 30 min at 4°C. After this incubation, the cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) with 2% BSA (Path-O-Cyte; Bayer Corporation, Kankakee, IL) (PBS-BSA), adjusted to pH 7.2 with sodium bicarbonate and further incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated rabbit anti-mouse antibody (Dako, Glostrup, Denmark) for 30 min at 4°C. Cells were washed and resuspended in 0.3 ml of PBS with 1% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany). The cells were then analyzed by flow cytometry (EPICS XL; Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Cell analysis was gated both on forward- and side-scatter intensities.

Quantification of the Expression of the Molecules Tested

Calibration was performed by 10 measurements of a mix of microbeads corresponding to mean equivalents of soluble fluorescein (MESF) (Immunobrite, Beckman-Coulter). This allowed the determination of a coefficient of variation of the flow cytometer that was equal to 1%.

In order to account for potential autofluorescence and/or nonspecific binding of MoAbs, all data were compared to those obtained with the control MoAb anti-CD3. The molecules tested were considered as significantly expressed when the median fluorescence intensity ratio (MFI) (fluorescence intensity value of a molecule tested \div fluorescence intensity value of the negative control CD3) was strictly higher than 2. Quantitation of the expression of the molecules was performed using the same mix of calibrated microbeads as cited above, allowing MESF units to be obtained. Data were expressed as mean MFI \pm SE and MESF \pm SE, representative of 10 separate experiments.

In Situ Labeling

Cells grown to confluence in chamber slides were processed directly in the Lab-Tek II wells. Cells were fixed 5 min in ethanol 95% at +4°C, then rehydrated and incubated for 1 h with 5 μl of the corresponding MoAb at room temperature in a moist chamber. The slides were then washed three times in PBS, and further incubated with FITC conjugated rabbit anti-mouse antibody (Dako, Glostrup, Denmark) for 30 min. After a new series of washes, the chamber's wells were removed, the cell layers were mounted in PBS/glycerol (3/7) and placed in a moist

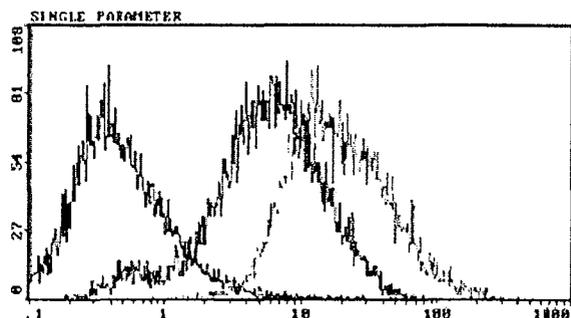


Fig. 1 Typical flow cytometry histograms obtained for (from left to right) CD3, CD9, and CD29 expression on A549 cells grown in normal conditions. Fluorescence intensity is on the abscissa and cell counts are on the ordinate.

chamber until examined in UV-light microscopy (BH-2; Olympus, Tokyo, Japan) within 4 h after processing.

Chelation Conditions

Cell cultures were performed as above, first in a series of parallel experiments with the addition of 0.1, 0.5, 1, or 5 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany) to the culture medium. In order to assess cell viability under these conditions, aliquots of each suspension were stained for DNA quantification using the DNA-Prep Reagents kit (Beckman-Coulter), then processed in flow cytometry for cell cycle analysis. The histogram of linear fluorescence distribution was then submitted to a polynomial analysis derived from the Dean and Jett model (33), with the specific software Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). The presence of sub-G1 DNA peaks was interpreted as

apoptotic cells. Apoptosis remained absent or very low since 0.7% and 7.5% of sub-G1 cells were noted only for cells cultured with 1 and 5 mM EDTA, respectively. Flow cytometry and in situ labeling were therefore performed with cultures supplemented with 1 mM EDTA. These conditions are similar to those previously used by Lazo et al. (25).

RESULTS

Expression Pattern of Tetraspans and β 1 Integrins on Epithelial A549 Cells Assessed by flow Cytometry in Normal and Chelated Conditions

The expression of tetraspans and β 1 integrins on the surface of A549 cells was first analyzed by flow cytometry (Fig. 1) and quantified as MESF using a mix of calibrated microbeads (Table 1). Using the MFI ratio of each marker compared to that of the negative control CD3, five tetraspans among the 10 tested were positively expressed at the cell surface. CD9 presented the highest level of expression followed by CD151 and CD63 in a first group and by CD81 and NAG-2 in a second. Among the seven integrin chains studied, five were also expressed on the cell surface. CD29 appeared as the major integrin chain expressed, followed by the four integrin alpha chains CD49c, CD49f, CD49e, and CD49b. The other molecules tested in this study showed a MFI ratio lower than 2, and were thus considered as not expressed on the surface of A549 cells.

When A549 cells were grown to confluence in medium containing 1 mM EDTA, several anomalies were noted. The cells grew more slowly (time to confluence was five days instead of three) and bound more loosely to the flask surface than in nonchelated conditions. CD9 was the only

Table 1
Quantitative Expression of Tetraspans and Integrin Chains on A549 cells

	Molecules tested	Non-chelated conditions	Chelated conditions	
Tetraspans	CD9	20,691 ± 2,690	12,039 ± 1,565	
	CD37	1,396 ± 181	2,281 ± 297	
	CD53	1,457 ± 189	2,110 ± 274	
	CD63	5,836 ± 759	4,367 ± 568	
	CD81	4,081 ± 531	3,102 ± 403	
	CD82	1,983 ± 258	3,583 ± 466	
	CD151 (IB4B4)	6,734 ± 875	3,897 ± 507	
	CD151 (11B1G4)	5,509 ± 716	4,897 ± 637	
	Co-029	1,396 ± 181	2,122 ± 276	
	NAG-2	3,950 ± 514	3,620 ± 471	
	TALLA-1	1,534 ± 199	2,212 ± 288	
	Integrins	CD29/ β 1	63,664 ± 8,276	49,788 ± 6,472
		CD49a/ α 1	1,379 ± 179	2,338 ± 304
CD49b/ α 2		6,285 ± 817	5,550 ± 722	
CD49c/ α 3		21,221 ± 2,759	15,753 ± 2,048	
CD49d/ α 4		1,588 ± 206	2,351 ± 306	
CD49e/ α 5		7,713 ± 1,003	3,563 ± 463	
CD49f/ α 6		7,795 ± 1,013	4,530 ± 589	
Control	CD3	1,155 ± 58	2,240 ± 112	

Mean equivalents (\pm SE) of soluble fluorescein (MESF) values measured in flow cytometry in non-chelated and chelated conditions for 10 tetraspans and 7 integrin chains. Boldface values correspond to the molecules positively expressed (MFI ratio >2). The MESF values of the negative control CD3 are presented in the last line.

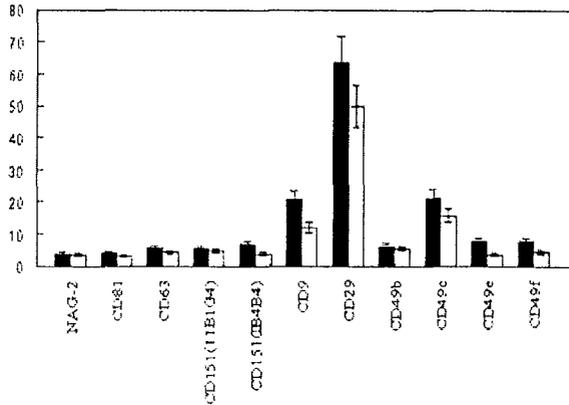


Fig. 2. Neau equivalent of soluble fluorescein (NESF) values topped by SE of the 10 molecules considered, expressed by A549 cells in the absence (black bars) and presence (white bars) of 1 mM EDTA.

tetraspan still expressed in chelated conditions, and its expression measured as a CD9/CD3 NESF ratio (5.4) was more than three times lower than in normal conditions (17.9). The $\beta 1$ integrin chain, CD29, also remained present but its expression evaluated as CD29/CD3 NESF ratio (22.2) was reduced more than twice compared to normal conditions (55.1). Among CD49 integrin α chains, only CD49c and b remained detectable, again with a significantly lower expression.

Expression and Localization of Tetraspans and $\beta 1$ Integrins on A549 Cells Grown in Chamber Slides Under Normal or Chelated Conditions

To further specify the cellular localization of the molecules examined, microscopic immunofluorescence studies were performed on A549 cells grown in chamber slides. The expression and partition of tetraspans and $\beta 1$ integrins were thus studied on cells in an adherent condition. The anti-CD63 MoAb clearly stained intracellular vesicles (Fig. 3). The anti-CD9 MoAb revealed a high pericellular staining with a reinforcement at cell-cell contacts (Fig. 3). CD151 was shown to be discretely localized at the cells' periphery and at cell-cell contacts. The integrin beta1 chain CD29 (Fig. 3), and the alpha chains CD49c and CD49e (Fig. 3) showed a pericellular localization with reinforcements at cell-cell contacts, whereas CD49b and CD49f presented a more faint pericellular staining.

In chelation experiments, the cell layers also were looser on Lab-Tek cells and it took longer for the cells to reach confluence. CD63 was still expressed in intracellular vesicles (Fig. 4) and CD9 was found expressed in the cytoplasm (Fig. 4). No reinforcement was detected at cell-cell contacts and no labeling was observed for CD151. Conversely, de novo expression of three other tetraspans was found to be confined to the cytoplasm: CD53, usually with bright labeling (Fig. 4), CD81 (Fig. 4), and Co-029 (Fig. 4). CD29 was the only integrin chain to

be detected, yet fluorescence intensity was patchy, definitely lower than in the absence of EDTA, and the cytoplasm was clearly stained. No increased background was noticed in the CD3 negative control.

DISCUSSION

In this study, the expression pattern of 10 tetraspans and seven integrin chains was determined and quantified at the surface of A549 lung adenocarcinoma cells by flow cytometry. It thus appeared that five tetraspans and five integrin chains were expressed at the cell surface. CD9 was the major tetraspan expressed by A549 cells, while the $\beta 1$ integrin chain CD29 was present at a high density associated with four α integrin chains of the CD49 cluster of differentiation. These data are consistent with a possible association of these molecules in a tetraspan/integrin web, as reported by Rubinstein et al (15).

The cellular localization of the molecules tested was further examined *in situ* by immunofluorescence. CD63 displayed a specific localization in intracytoplasmic vesicles. All other molecules were present in the cytosol and/or at the periphery, with an homogeneous partition and reinforcements at cell-cell contacts, consistent with the possible focalization of these molecules in such organized structures as filopodia (14).

These results are comparable with the flow cytometry data presented by Peñas et al. (14) on normal keratinocytes in primary culture reporting the expression of the tetraspans CD9, CD81, and CD151 on the cell surface with a major fluorescence intensity observed for CD9, which appeared to be at least 10 times more highly expressed than CD151. In our study, comparison of the expression of CD9 and CD151, however, showed a less marked dif-

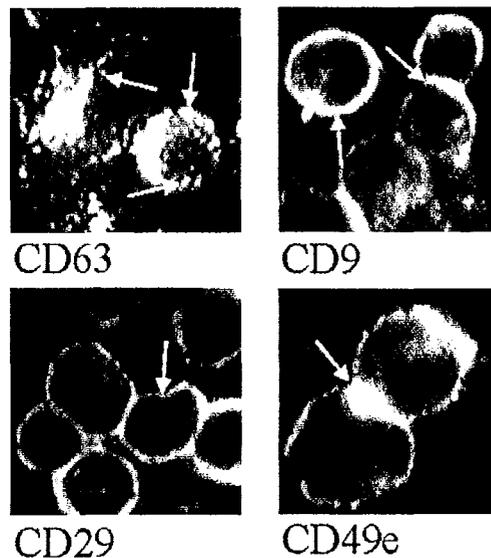


Fig. 3. *In situ* labeling of A549 cells grown on Lab-Tek II chambers. Indirect immunofluorescence. Initial magnification 400 \times . Arrows point to the features discussed in the text.

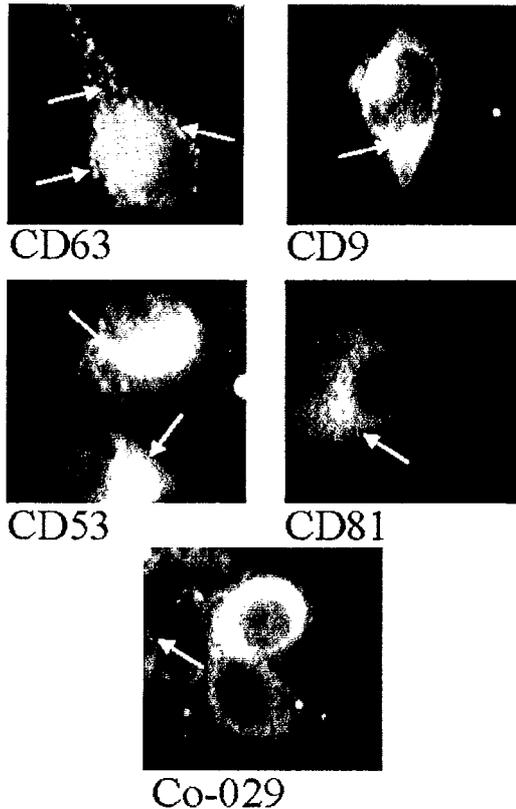


Fig. 4 In situ labeling of A549 cells grown on Lab-Tek II chambers in the presence of 1 mM EDTA. Indirect immunofluorescence. Initial magnification 400X. Arrows point to the features discussed in the text.

ference, CD9 being expressed only about 3.5 times more than CD151. This might indicate a downregulation of CD9 expression on the tumoral epithelial cells A549, a feature reported by Miyake et al. (34) and Higashiyama et al. (32) in the advanced stages of breast and lung cancer, respectively. The data reporting a decrease in a tetraspan expression associated with tumoral progression are also confirmed for such tetraspans as CD82 and CD63. Dong et al. (35) showed that a partial or complete loss of CD82 expression is associated with the progression of prostatic cancer to a metastatic state and Radford et al. (36) proposed that a loss of CD63 expression in melanoma cells could allow their invasion into deeper layers of the dermis. The quantitation of several tetraspans expression on the same cell line allows the comparison of their expressions to each other and the determination of an expression ratio. It would thus be interesting to compare these ratios between cell lines or cancer stages to determine if it would be a prognostic factor.

When A549 cells were cultured in chelating conditions, although viability remained satisfactory and no apoptosis was detected, macroscopic alterations were noted, characterized by slower growth and looser cell layers. This is consistent with previous observations on different cell

types (25), and suggests that the molecular interactions required for growth and proper cell-cell contacts were disturbed by the chelation of divalent cations. CD9 was the only tetraspan still detectable in flow cytometry on the surface of A549 cells grown in chelating conditions, yet with a threefold reduced expression. Chelation also reduced CD29 expression about twofold and abrogated the expression of two CD49 chains. Within adherent cells, immunofluorescence labeling showed the disappearance of CD151 and integrin alpha chains, suggesting that divalent cations are required for the expression of these molecules, either directly or through their interaction with other molecules. The tetraspans that were expressed, as well as CD29, displayed cytoplasmic accumulation, suggesting that the transport of the tetraspans and integrin chains to the membrane relies on divalent cations. The appearance of previously absent tetraspans in the cytoplasm could be interpreted as an attempt at restoring a tetraspan web. Serru et al. (16), in cell lysis experiments using conditions that specifically disrupt tetraspan/tetraspan interactions and preserve tetraspan/nontetraspan molecule interactions, have shown that CD81 and CD151 seem to play a key role in interconnecting other tetraspans to such nontetraspan partners as $\beta 1$ integrins. It is interesting to note here that the disappearance of CD151 expression in A549 cells in chelated conditions seemed to be counterbalanced by the appearance of cytoplasmic CD81. Finally, the reinforcements of labeling at cell-cell contacts were no longer seen and, when present, the pericellular labeling often was patchy, indicating a possible disruption of the molecular interactions observed in the presence of divalent cations. Chelation in the study of Peñas et al. (14), also was reported to disrupt the adhesion and stratification of keratinocytes and lower CD151 expression.

In conclusion, this study reports on the membrane and cytoplasmic expression pattern of tetraspans and $\beta 1$ integrins on lung tumoral cells, which differs from that of such normal epithelial cells as keratinocytes (14), possibly in relation to their malignant origin (32). It further demonstrates that both tetraspans and $\beta 1$ integrins also depend on divalent cations for a proper surface expression and adequate cell contacts, conditions that are likely to be impaired in cancer growth.

LITERATURE CITED

1. Hemler ME, Mannion BA, Berditchevski F. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:67-71.
2. Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997;11:428-442.
3. Wright MD, Tomlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* 1994;15:588-594.
4. Wright MD, Henkle KJ, Mitchell GF. An immunogenic M_r 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumor-associated antigen. *J Immunol* 1990;144:3195-3200.
5. Koczynski CC, Davis GW, Goodman CS. A neural tetraspanin, encoded by *late bloomer*, that facilitates synapse formation. *Science* 1996;271:1867-1870.
6. Tomlinson MG, Wright MD. A new transmembrane 4 superfamily molecule in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Evol* 1996;43:312-314.

7. Shaw S. In: Schlossman S, Boumsell L, Gilks W, Harlan J, Tedder T, Todd R, editors. Leukocyte typing V. Oxford: Oxford University Press; 1994. p 3-7.
8. Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998;16:89-109.
9. Boucheix C, Duc GHT, Jasmin C, Rubinstein E. Tetraspanins and malignancy. *Exp Rev Mol Med* 2001; <http://www-ermm.cbccu.cam.ac.uk/01002381h.htm>.
10. Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, Sasada R, Miyake M. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human Motility-related Protein (MRP-1/CD9) DNA. *J Exp Med* 1993;177:1231-1237.
11. Sincock PM, Fitter S, Parton RG, Berndt MC, Gamble JR, Ashman LK. CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localized to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiples integrins and modulates cell function. *J Cell Sci* 1999;112:833-844.
12. Yañez-Mó M, Alfranca A, Cabañas C, Marazuela M, Tejedor R, Ursa MA, Ashman LK, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with $\alpha_3\beta_1$ integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol* 1998;141:791-804.
13. Claas C, Seiter S, Claas A, Savelyeva L, Schwab M, Zoller M. Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *J Cell Biol* 1998;141:267-280.
14. Peñas PF, García-Díez A, Sánchez-Madrid F, Yañez-Mó M. Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration. *J Invest Dermatol* 2000;114:1126-1135.
15. Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudrière-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* 1996;26:2657-2665.
16. Serru V, Le Naour F, Billard M, Azorsa DO, Lanza F, Boucheix C, Rubinstein E. Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/ $\alpha_4\beta_1$, CD151/ $\alpha_3\beta_1$, CD151/ $\alpha_6\beta_1$) under conditions disrupting tetraspans interactions. *Biochem J* 1999;340:103-111.
17. Angelisova P, Hilgert I, Horejsi V. Association of four antigens of the tetraspan family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics* 1994;39:249-256.
18. Berditchevski F, Odintsova E. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* 1999;146:477-492.
19. Fitter S, Sincock PM, Jolliffe CN, Ashman LK. Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with β_1 and $\alpha_{1b}\beta_3$ integrins in haematopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *Biochem J* 1999;338:61-70.
20. Hirano T, Higuchi T, Ueda M, Inoue T, Kataoka N, Maeda M, Fujiwara H, Fujii S. CD9 is expressed in extravillous trophoblasts in association with integrin α_3 and integrin α_5 . *Mol Hum Reprod* 1999;5:162-167.
21. Rubinstein E, Le Naour F, Billard M, Prenant M, Boucheix C. CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes. *Eur J Immunol* 1994;24:3005-3013.
22. Sterk LMT, Geuijen CAW, Oomen LCJM, Calafat J, Janssen H, Sonnenberg A. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin $\alpha_6\beta_4$ and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol* 2000;149:969-982.
23. Yauch RL, Kazarov AR, Desai B, Lee RT, Hemler ME. Direct extracellular contact between integrin $\alpha_3\beta_1$ and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem* 2000;275:9230-9238.
24. Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N. The regulation of integrin function by Ca^{2+} . *Biochim Biophys Acta* 2000;1498:91-98.
25. Lazo PA, Cuevas L, Gutierrez del Arroyo A, Orúe E. Ligation of CD53/OX44, a tetraspan antigen, induces homotypic adhesion mediated by specific cell-cell interactions. *Cell Immunol* 1997;178:132-140.
26. Rowin ME, Whatley RE, Yednock T, Bohnsack JF. Intracellular calcium requirements for β_1 integrin activation. *J Cell Physiol* 1998;175:193-202.
27. Mishima T, Murata J, Toyoshima M, Fujii H, Nakajima M, Hayashi T, Kato T, Saiki I. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:541-550.
28. Azorsa DO, Cazenave JP, Lanza F. In: Kishimoto T, Kikutani H, von Borne AEGK, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H, editors. Leukocyte typing VI. New York: Garland Publishing; 1998. p 631-632.
29. Azorsa DO, Hyman JA, Hildreth JEK. CD63/Pltgp40: a platelet activation antigen identical to the stage-specific, melanoma-associated antigen ME491. *Blood* 1991;78:280-284.
30. Lebel-Binay S, Lagaudrière C, Fradelizi D, Conjeaud H. CD82, member of the tetra-span-transmembrane protein family, is a costimulatory protein for T cell activation. *J Immunol* 1995;155:101-110.
31. Tachibana I, Bodorova J, Berditchevski F, Zutter MM, Hemler ME. NAG-2, a novel transmembrane 4 superfamily (TM4SF) protein that complexes with integrins and other TM4SF proteins. *J Biol Chem* 1997;272:29181-29189.
32. Higashiyama M, Taki T, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Koh T, Kodama K, Doi O, Miyake M. Reduced motility protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995;55:6040-6044.
33. Dean P, Jett J. Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow micro-fluorimetry. *J Cell Biol* 1974;60:523.
34. Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Itoi S, Koh T, Taki T. Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:4127-4131.
35. Dong JT, Suzuki H, Pin SS, Bova GS, Schlaken JA, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res* 1996;56:4387-4390.
36. Radford KJ, Mallesh J, Hersey P. Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int J Cancer* 1995;62:631-635.



Article accepté en octobre 2004 dans ONCOLOGY REPORTS



Comparative T cell oligoclonality in lung, tumor and lymph nodes in human non-small cell lung cancer

By Sophie Derniame¹, Jean-Michel Vignaud², Gilbert C. Faure¹, Marie C Béné¹, and Frédéric Massin¹

1. Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine et CHU de Nancy, BP184, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France

2. Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU de Nancy 29 Avenue du Maréchal De Lattre de Tassigny, 54000 Nancy, France

Corresponding author : Professor Marie C Béné, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, BP184, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France +33 383.68.36.60, fax : +33 383.44.60.22, e-mail : bene@medecine.uhp-nancy.fr

Key words : lung cancer, immune responses to cancer, oligoclonality, TCR, flow cytometry, multiplex PCR.

Running title : T-cell oligoclonality in lung cancer

Abstract

In lung cancer as in other malignancies, tumor formation induces the development of local and systemic antitumoral immune responses. The tumor itself becomes surrounded by a local stroma reaction containing inflammatory cells, a large part of which being tumor infiltrating T-lymphocytes. This study was designed to investigate the potential clonality of these T-cells in non-small cell lung cancer.

Two complementary methods were used: exploration of the Vbeta TCR repertoire usage in flow cytometry and analysis of the Vgamma TCR repertoire in multiplex PCR and gradient gel electrophoresis. These techniques were applied respectively to eluted fresh lymphocytes and extracted DNA from healthy lung tissue, tumor and lymph nodes from 44 patients.

There was a good correlation between the two techniques used. An oligoclonal repertoire restriction was noted in most of the cases and in the three types of tissues studied suggesting the presence of tumor-specific clones. Moreover, Vbeta14 appeared to be the most frequent specificity used whatever the tissue considered, while Vbeta13.1 appeared to be selectively used in the stroma reaction of epidermoid lung carcinomas. A restricted TCRgamma band was also present in these tumors, and two more bands of TCRgamma were selectively present in adenocarcinomas. The demonstration of both alpha-beta and gamma-delta TCR restriction suggests both the recruitment of specific T-cells and their local proliferation within the tumoral tissue. The same feature in healthy lung tissue indicates that it might already be the site of specific anti-tumoral T-cell reactivity.

In conclusion, this study reports on the presence of oligoclonal T-cell responses in most cases of non-small cell lung cancer. The comparison of tumor, healthy tissue and lymph nodes showed some degree of patient-dependent similarities suggestive of tumor specificity.

Introduction

The immune system constantly exerts a surveillance role in order to eradicate potentially tumoral transformed cells (1). This has long been demonstrated in animal models or human observations of high cancer incidence in immunocompromised individuals (2). Several mechanisms have been demonstrated to be responsible for this immunological control, including anti-tumoral antigens antibodies, cytotoxic through ADCC, natural killer cell responses related to the deregulation of MHC class I on tumor cells, and tumor-antigen specific cytotoxic T lymphocytes (1, 3-6). The development of such anti-tumoral immune responses implies the participation of all actors and machinery of specific immunity, including cell proliferation and the generation of both effector and memory cells (4). Once cancer is clinically obvious, it may be because these mechanisms have been overwhelmed or because the tumor cells found a way to escape the immune system (5, 7, 8). In the former case, traces of an active anti-tumoral immune response may be found in the form of T-cell clones, bearing the same $\alpha\beta$ -TCR and/or carrying the same TCR- γ rearrangement amplified during cell proliferation (1). Conversely, if tumor expansion results from immune escape, there may remain no anti-tumoral T-cells in the stroma reaction at the time of tumor resection (5).

In lung cancer the malignant tissue is partially infiltrated and surrounded by a local stroma reaction as in many other tumors such as breast (9, 10), colorectal (11), prostatic (12), ovarian (13), gastric (14), colon (15), bladder (16) and skin cancer (17). The stroma reaction is a non tumoral connective tissue which provides nutrition and support to tumoral tissue and is constantly remodeling. The stroma reaction is constituted of extracellular matrix, neoangiogenesis and inflammatory cells (18). Characterization of these inflammatory cells in

lung cancer has shown that they were in large part T lymphocytes (19-21), as in other tumors (16, 17) with a few macrophages and NK cells. Tumor infiltrating T-cells (TIL) have been demonstrated to be specific of tumor antigens in some instances (22-25) yet little is known about the specificity of T-cells in the stroma reaction of lung cancer (26).

They might be part of the normal lymphocytic population of the lung tissue, or anti-tumoral cells, overwhelmed by the tumor cells, yet displaying TCR characteristics suggestive of their specificity, i.e. clonality.

To examine whether restricted anti-tumoral T-cell responses remained in non small cell lung cancer patients we used two complementary approaches of TCR restriction investigation concomitantly in tumoral tissues, normal lung tissue and lymph nodes from 44 patients.

Materials and methods

Patients

The population studied comprised 44 patients, 38 males (mean age 61 ± 10 years old) and 6 females (mean age 59 ± 10 years old). Seventeen patients had been diagnosed with adenocarcinoma, 23 with epidermoid carcinoma and 4 with large cells carcinoma. All were eligible for surgery as first intention therapy.

Tissue samples

Lung tissue samples used in these studies were obtained immediately after curative surgery. Three types of samples were provided by the pathologist after macroscopic examination of surgical material, within hours after the completion of surgery. These samples were respectively (i) tumor tissue, (ii) apparently normal lung tissue cut-out as far as possible from the tumor and (iii) an intrapulmonary lymph node. All samples were placed in saline at room temperature and were processed within six hours of surgery. Part of each sample was used for elution of lymphocytes from fresh tissue. The remnant was snap-frozen in liquid nitrogen then stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use. When lymph nodes were too small, they were preferentially snap-frozen and not eluted.

Lymphocyte suspensions

For each sample, the part reserved for lymphocyte elution was placed in Hank's buffer (Sigma, St Louis, MO) in a Petri dish, minced with scissors, then gently shredded using the MediMachine (Dako, Glostrup, Denmark). The cell eluate was suck out of the Medicon cell (Dako) using an insulin-type 1 mL syringe and placed in about 10 mL of Hank's medium. This solution was gently layered over a Ficoll-Hypaque gradient (Lymphoprep, Nycomed,

Oslo, Norway) and centrifuged for 30 min at 400 g at room temperature. The lymphocyte layer was then collected, washed once in Hank's medium and resuspended for use in flow cytometry. Suspensions were adjusted at 10^6 /mL.

Flow cytometry

The proportion of T-cell subsets in the purified lymphocyte suspension was assessed in flow cytometry using a four color panel of TetraChrome® CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) monoclonal antibodies (MoAb). The expression pattern of TCR V β genes on eluted lymphocytes was performed in a flow cytometry technique using the IOTest® Beta Mark TCR V β Repertoire Kit (Beckman Coulter). This reagents' kit contains 8 mixtures of 3 MoAb specific each for one V β segment. In each of the 8 vials, one of the MoAb is conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), another to phycoerythrin (PE) and the third to both FITC and PE. Two-colors biparametric analysis thus allows to evaluate the proportions of cells labeled with each of the 3 antibodies in each test. The 24 MoAbs provided in the reagents' set account for more than 70 % of the normal human V β TCR repertoire of peripheral lymphocytes (27).

Fifty microliters aliquots of all cell suspensions were incubated with 5 μ L aliquots of tetreaChrome® or of the 8 MoAbs combinations for 30 min at 4 °C, washed once in Hank's buffer then resuspended/fixed in 300 μ L of 0.1% paraformaldehyde (Sigma) in phosphate buffered saline (PBS).

All samples were then processed in flow cytometry using an EPICS-XL4CMCL (Beckman Coulter) with lymphocyte gating on a forward/side scattergram. Data were expressed as percentages of labeled cells within the lymphocyte population.

TCR γ amplification

All T-cells expressing an $\alpha\beta$ TCR have previously rearranged their $\gamma\delta$ TCR in the course of intrathymic maturation. Most of these rearrangements are unproductive, yet can be detected within the DNA. Demonstration of a restricted TCR γ repertoire in a lymphocyte population suggests that one or several clones proliferated locally from one or several common ancestor T-cells.

In order to examine the TCR γ repertoire of T-cells within the sampled tissues, a small fraction of the frozen material was thawed in STE buffer (Saline-Tris-EDTA ; NaCl 0.2 mM, Tris-HCl pH 8.0 10 μ M (Merck, Eurolab Polylabo, Créteil, France), EDTA 0.2 μ M (TITRIPLEX® III, Merck)) containing 105 mg/L of proteinase K (Merck) and 0.5 % of sodium dodecyl sulfate (SDS RECTAPUR®, Prolabo, Paris, France) for 12 hours at 56 °C. DNA was then phenol-extracted using the APPLIGENE® kit (Prolabo). The amount of DNA recovered from each sample was assessed in spectrophotometry (Beckman DU®640, Beckman Instruments®, Gagny, France) and adjusted at 100 ng/ μ L

Extracted DNA was then amplified by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) using 8 primers supplemented with a GC clamp (Genset Oligos, Paris, France) allowing amplification of the V and J TCR γ repertoires, as reported previously.

PCRs were performed in the following conditions: 2.6 ng extracted DNA, 5 μ L reaction buffer, 2.5 mM magnesium chloride, 30 U/mL Goldstar Red™ Taq polymerase (Eurogentec, Liège, Belgium), 4 mM dNTPs (Master Mix, Eurogentec) and primers. The latter were used at the following concentrations: 1.61 μ M V1G, 2.22 μ M V9G, 1.83 μ M V10G, 2.65 μ M V11G, 2.51 μ M J1, 1.34 μ M JP, 1.89 μ M JP1B, 1.84 μ M JP2B. Forty cycles of amplification were performed for each sample, using a Gene Amp® PCR system 9700 Thermocycler (Perkin Elmer Biosystems, Courtaboeuf, France) under the conditions reported

by Theodorou et al. (28). For each PCR, three controls were processed: one without DNA, a positive one (DNA from a Sezary T lymphoma) and a negative one (B-lineage lymphoma DNA). Two checks of denaturing gradient gel electrophoresis (DCode™ Control Kit for DGGE/CDGE/TTGE, Bio-Rad) were also used, respectively a PCR amplification of a human wild type genomic DNA fragment and the same fragment containing mutation of a G into A in exon 8 of the p53 (Ras) gene.

Separation of the amplicons was then performed in denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) or temporal temperature gel electrophoresis (TTGE). Briefly, for the samples of 21 patients DGGE was used as follows. A 6.5 % polyacrylamide gel was prepared so as to contain a 10 % to 60 % linear denaturing gradient, using the Gradient Delivery System Model 475 (Bio-Rad, Hercules, CA). The 100 % denaturation solution consisted in urea (Prolabo) at 425 g/L and 40 % formamide (Prolabo) in 3.125 % TAE (Tris Acetic EDTA buffer, Bio-Rad) supplemented with 0.065 % Temed (Bio-Rad) and 0.525 % ammonium persulfate (Merck). The gradient was formed by progressive dilution of the urea solution in H₂O. After polymerization, each gel was loaded with 20 µL aliquots of amplification products supplemented with 3.2 µL of bromophenol and xylen cyanol blue (0.25 %) in 40 % sucrose. Marcel™ (Appligene, Prolabo) molecular weight markers were loaded in parallel. Migration was then allowed to proceed at 56 °C for 5 to 6 hours in TAE, at a constant voltage of 110 V, using the DCode™ Universal Mutation System (Bio-Rad).

The samples of 23 patients were analyzed in TTGE, using a temperature gradient, and not a denaturing gradient, to separate the DNA. Briefly, a 6.5 % polyacrylamide (Bio-Rad) gel was prepared in 1.25 % TAE (Bio-Rad), supplemented with 0.065 % Temed (Bio-Rad) and 0.525 % ammonium persulfate (Merck). The polymerisation, loading, migration and staining were performed in the same conditions as for DGGE and with the same controls and

molecular weight markers. The gradient was formed by a progressive decrease of the migration temperature from 61 °C to 51 °C over 4 hours (2.5 °C/h).

After completion of the migration, gels were silver-stained as follows. Gels were fixed by trichloroacetic acid (Prolabo) at 200 g/L, washed in a 50 % ethanol, 10 % acetic acid (Merck) solution then in a 10 % ethanol, 5 % acetic acid solution. The gels were then sensitized by 25 % glutaraldehyde (Sigma) and washed again in the 50 % ethanol 10 % acetic acid solution and in H₂O. Next, staining was achieved with silver nitrate (Prolabo) at 5 g/L, followed by one wash in H₂O and revelation by a 0.016 % sodium carbonate (Prolabo) and formaldehyde (Sigma) at 750 µL/L solution. Color development was stopped by an acetic acid 5 % solution and the gels were preserved in a glycerol (Prolabo) 5 %, acetic acid 50 % solution. The gels were finally dried at hot temperature under vacuum in the Drygel jr. (Hoefer Scientific Instrument, Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Bands were scanned using the Bio Rad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad) and analyzed using the Quantity One Quantitation Software (Bio-Rad).

Statistics

Statistical analysis was applied to the identification of T-cell subsets, using the Student's T test.

Results

Characterisation of T lymphocytes

In all cases, only CD3+ T-cells were eluted from the fresh lung tissue samples, and $\alpha\beta$ TCR studies are thus representative of the intratissular population

Although CD4+ cells were as expected predominant in *lymph nodes* with a mean \pm SE CD4/CD8 ratio of 4 ± 1.6 , the proportions were significantly reversed in lung tissue. Indeed, CD8+ cells were the major population both in *healthy lung tissue* (mean \pm SE CD4/CD8 ratio 0.88 ± 0.17 , $p < 0.001$) as well as in *tumor tissue* (mean \pm SE CD4/CD8 ratio 0.58 ± 0.07 , $p < 0.001$).

V β TCR repertoire

Two-color flow cytometry allowed to appreciate usage of the 24 V β TCR segments for which MoAbs were available. Oligoclonality was considered each time a V β TCR segment was observed on more than 5 % of the lymphocyte population studied. All specificities were detected at least once. Data are summarized in figure 1.

Twenty-seven *lymph nodes* samples were large enough to allow lymphocyte elution. V β 14 was the most frequently used specificity in these lymph nodes followed by V β 12, V β 16 and V β 20, then V β 3, V β 8 and V β 21.3. There was one clone in 3 cases, more than one in 22 cases, and no V β T-cell restriction was noted in 2 cases.

Among the 44 samples of apparently *healthy lung tissue* studied, V β 14 again appeared to be the most frequently used segment, followed by V β 3, V β 8, V β 16, V β 20 and V β 21.3. Some significant oligoclonality was also observed for V β 7.2 and V β 12. Again, there was one clone in 4 cases, more than one in 24 cases, and no V β T-cell restriction was noted in 16 cases.

In the 44 *tumor samples* studied, V β 14 was again the most frequently used specificity, followed by V β 16, V β 20 and V β 21.3, then V β 3, V β 8, V β 12 and V β 7.2. There was one clone in 4 cases, more than one in 33 cases, and no V β T-cell restriction was noted in 7 cases.

Interestingly, although a few (less than 5%) V β 11+ and V β 18+ cells were observed in some healthy tissues (V β 11 : 6/44, V β 18 : 5/44) and lymph nodes (V β 11 : 5/27, V β 18 : 5/27), these specificities were never observed on intra-tumoral lymphocytes.

In summary, oligoclonal populations could be observed in the three types of tissue samples studied. Moreover, several TCR β specificities were observed only in the tumor tissue of a given patient, with an apparent selectivity depending on the type of tumor, i.e. V β 13.1 (10/23) and V β 13.2 (7/23) in epidermoid carcinoma, V β 5.2 (5/17) and V β 7.2 (6/17) in adenocarcinoma or V β 3, V β 16 and V β 20 (1/4) in large cell carcinoma, yet again without attaining the 5% threshold in all cases.

Overall, V β 13.1 (23/44) and V β 13.2 (14/44) appeared to be the most tumor-specific, while V β 4 (11/44) and V β 22 (11/44) were more frequently observed in apparently healthy lung tissue. V β 14 was clearly predominant in the three types of tissues.

Table 1 shows the frequency of concomitant expression of the V β clones observed in the three types of tissues for each patient. This discloses that clones present in tumoral tissue were also often present in the corresponding lymph node, while the correlation was much weaker with apparently healthy lung tissue

TCR γ repertoire restriction

DGGE/TTGE allows to discriminate between DNA fragments of similar size differing by one base pair thus polyclonal populations of T-cells carrying different TCR γ rearrangements will yield a smear after silver staining of a DGGE/TTGE gel, while clones will yield the amplification of exactly similar fragments migrating in the same position and

resulting in a band. Thus a monoclonal T-cell population will yield one band, while an oligoclonal population will yield several bands (Figure 2).

All tissues from the 44 patients studied (44 lymph nodes, 44 healthy lung tissues and 44 tumoral tissues) were submitted to γ TCR multiplex amplification and DGGE/TTGE. This allowed to observe repertoire restriction and oligoclonality, characterized by 19 different size bands numbered from 1 to 19 in decreasing relative size. All controls were satisfactory, i.e. a single band in the Sezary T lymphoma and no band for the B-cell lymphoma (Figure 2).

Among the 132 tissue samples studied, 3 presented neither band nor smear, suggesting the absence of T-cells in the sample, and 23 presented a smear related to a polyclonal non-restricted T-cell population. This 26 samples group contained 10 of the tumor samples. Table 2 shows the number of cases displaying one or several bands in the different tissues.

In *lymph nodes*, band 19 was the most frequent. Bands 13, 4, 8, 10, 12 and 15 were also very frequent, slightly more than bands 3, 5 and 14, 2, 7 and 11. There were one band in 2 samples, and more than in 19.

Band 19 also was the most frequent in *healthy lung tissue*, followed by bands 2, 3 and 10. Other bands were less represented. There were one band in 3 samples, and more than in 29.

Conversely, in *tumoral tissue*, bands 2, 13, 10 and 19 were the most frequent, followed by bands 3, 7, 8, 11 and 12. Several bands: 13 (8/23), 11 (4/23) and 10, 12, 15 (3/23) appeared to be specific of epidermoid carcinomas since they were present in tumoral tissue but absent from healthy tissue of the same patients. Similarly, bands 2 (7/17) and 7 (5/17) appeared to be specific of adenocarcinoma while large cells carcinoma displayed band 10 (2/4), absent from the corresponding healthy tissue. Tumor-specific bands apparently were bands 13 (16 cases) and 11 (13 cases). There were one band in 2 samples, and more than in 35.

Tumoral tissues presented the largest diversity of bands, followed by lymph nodes and healthy lung tissues. Band 19 was the most frequent, especially in the two latter tissues, while band 13 was most frequently observed in tumors and lymph nodes. Bands 6, 14 and 16 were similarly represented in all tissues.

Comparison of the three samples, patient by patient, allowed to demonstrate the presence of the same band or bands in all tissues in 11 cases, and in both tumor and lymph node in 16 cases.

Comparison of both techniques

Tissue by tissue comparison of the presence or absence of $V\beta$ and $V\gamma$ restriction allowed to observe a similar degree of clonality in 85% of informative cases in tumors. Similar data were observed in 87.5 % of the cases for healthy lung tissue and 91.3 % for lymph nodes.

Discussion

In this study, two complementary approaches were used to investigate the potential oligoclonality of T-cell infiltration in non-small cell lung cancer in a large series of 132 tissue samples (healthy lung parenchyma, tumor and lymph node) from 44 patients. Repertoire restriction was observed in 34 of the 44 tumors tested, both within V β usage and at the TCR γ level. This suggests that in 10 cases, tumor escape was successful and no more tumor-specific T-cells remained in the tissue. In the other cases, such T-cells were present and some V β specificities even appeared to be selectively present in a given type of tumor, i.e. a V β clone and a V γ clone in epidermoid carcinomas, two V γ clones in adenocarcinomas. These data suggest both the recruitment of T-cells with a given specificity and their proliferation in situ in the tumoral microenvironment.

Some of the clones observed in tumoral tissue were also present in regional lymph nodes, suggesting the circulation of these T-cells between the tumor and the relevant lymphoid tissue.

Moreover, the CD4/CD8 ratio was found to be reversed compared to the normal situation in both tumor tissue and healthy lung tissue. This suggests that the cells recruited and/or activated in lung tissue are preferentially cytotoxic T-cells possibly involved in direct lysis of tumoral cells. This also indicates that anti-tumoral immune reactions already develop in clinically healthy lung tissue, as discussed below.

Indeed, some degree of oligoclonality was also noted within apparently healthy lung tissue. In 12 cases, these clones were different from those observed in the corresponding tumor tissue, while similar clones were observed in 16 cases. T-cell specificities present in healthy lung tissue but absent from tumors could represent efficient tumor-specific cells,

controlling tumor proliferation within still healthy tissue. Such cells might have apoptosed through tumor-escape mechanisms when they are no longer detectable in tumors (29, 30). Conversely, T-cell specificities present in both normal and tumoral tissue may again indicate T-cell trafficking within the lung.

In the other hand, V β usage restriction suggests either the recruitment of cells with a tumor-specific TCR, or their local proliferation, or both. Such usage restriction has been reported in other tumor tissues than lung cancer (31- 33). In patients with non-small cell lung carcinoma, Echchakir et al (34) have reported that clones V β 12, V β 16, V β 17, V β 20 and V β 21, depending on the patients, were mostly expressed in tumors rather than in the peripheral blood. These specificities were also frequently observed in our series of three types of tissues.

However, here, V β 14 appeared to be the most frequent specificity used, whatever the tissue considered. No such predominance of V β 14 has been described in other cancers. It has been only reported in a few patients with autoimmune disorders (35). V β 14 usage could therefore be specific of lung tissue in smokers.

V β 13.1 appeared to be somewhat selectively used in the stroma reaction of epidermoid lung carcinomas, while it was absent from healthy lung tissue of the same patients. This might suggest that T-cells using this V β segment display specificity towards a tumor-specific antigen. V β 13.1 oligoclonality was indeed reported in the literature in other types of tumors such as ovarian (36), breast (32) and pancreatic cancers (32, 37).

The presence of TCR γ segments of the same size and sequence, yielding bands after multiplex PCR and DGGE/TTGE, is strongly suggestive of the presence of a clone derived from a common ancestor (38). This type of oligoclonality accounts for local proliferation. This technique was initially developed for the analysis of clonality in T-cell lymphoma (28,

39). This sensitive tool has however seldom been applied to solid tumors such as non-small cell lung carcinomas, most reported studies having used Southern blotting (40- 43).

Here, two clones (TCR γ bands 2 and 7) appeared to proliferate specifically in adenocarcinomas while band 13 seemed to be associated to epidermoid carcinomas.

Interestingly, some degree of oligoclonality was also noted within apparently healthy lung tissue. In 12 cases, these clones were different from those observed in the corresponding tumor tissue. T-cell specificities present in healthy lung tissue but absent from tumors could represent efficient tumor-specific cells, controlling tumor proliferation within still healthy tissue. Such cells might have apoptosed through tumor-escape mechanisms when they are no longer detectable in tumors.

The few studies reporting TCR repertoire analysis in lung cancer have mostly compared intra-tumoral cells with peripheral blood T-cells (34), but not with apparently healthy tissue or lymph nodes from the same surgical specimen as we did here. It is of interest to note the excellent correlation we observed between our two approaches of TCR usage restriction. This supports the fact that targeted T-cells responses develop in lung cancer, first in apparently healthy lung tissue, then in the tumor itself, yet that in about 25% of the patients, tumor escape is associated with the absence of specific T-cells.

These data are encouraging for subsequent approaches aiming at identifying the antigens recognized by such clones. It is of interest that some specificities, expressed in lung tissue devoid of tumoral cells are absent from the tumor itself. This suggests that such cells are able to contain tumor development to some extent, yet are induced to apoptose once malignant cells achieve escape from the immune system.

Acknowledgements

This work as supported by grants from the French Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et des Technologies to EA3443, from the French Ligue contre le Cancer to Sophie Derniame and by the prix Wittner to Sophie Derniame

REFERENCES

1. Straten PT, Schrama D, Andersen MH and Becker JC: T-cell clonotypes in cancer. *J Translat Med* 2: 1-11, 2004.
2. Effros RB. Replicative senescence of CD8 T cells: potential effects on cancer immune surveillance and immunotherapy: *Cancer Immunol Immunother* [Epub ahead of print], 2004.
3. Rook AH, McGinnis KS, Richardson SK *et al*: The use of cytokines, fusion proteins and antibodies to treat cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Ther* 16: 331-336, 2003.
4. Gabrilovich D and Pisarev V: Tumor escape from immune response: mechanisms and targets of activity. *Curr Drug Targets* 4: 525-536, 2003.
5. Garcia-Lora A, Algarra I, Collado A and Garrido F: Tumor immunology, vaccination and escape strategies. *Eur J Immunogenet* 30: 177-183, 2003.
6. Trapani JA and Sutton VR: Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Cur Opin Immunol* 15: 533-543, 2003.
7. Terabe M, Park JM and Berzofsky: Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 53: 79-85, 2004.
8. Wojtowicz-Praga S: Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF- β inhibitors. *Invest New Drug* 21: 21-32, 2003.
9. Ben-Hur H, Cohen O, Schneider D *et al*: The role of lymphocytes and macrophages in human breast tumorigenesis: an immunohistochemical and morphometric study. *Anticancer Res* 22: 1231-1238, 2002.
10. Tomes L, Emberley E, Niu Y *et al*: Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 81: 61-69, 2003.

11. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Ian Swift R and Muti Abulafi A: Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumor expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 107: 541-550, 2003.
12. Yeung F and Chung LW: Molecular basis of co-targeting prostate tumor and stroma. *J Cell Biochem Suppl* 38: 65-72, 2002.
13. Zhang L, Yang N, Conejo-Garcia JR *et al*: Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 264-272, 2003.
14. Ohno S, Tachibana M, Fujii T, Ueda S, Kubota H and Nagasue N: Role of stromal collagen in immunomodulation and prognosis of advanced gastric carcinoma. *Int J Cancer* 97: 770-774, 2002.
15. Ohtani H: Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue : desmoplasia and tumor immunity. *Tohoku J Exp Med* 187: 193-202, 1999.
16. Tsujihashi H, Matsuda H, Uejima S, Akiyama T and Kurita T: Immunoresponse of tissue infiltrating lymphocytes in bladder tumors. *J Urol* 141: 1467-1470, 1989.
17. Hernberg M, Turunen JP, Muhonen T and Pyrhonen S: Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy. *J Immunother* 20: 488-495, 1997.
18. Vignaud JM, Marie B, Picard E *et al*: Tumor stroma formation in lung cancer. In: *Clinical and biological basis of lung cancer prevention*. Martinet Y, Hirsch FR, Martinet N, Vignaud JM and Mulshine JL (ed.) Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland, pp.75-93, 1998.
19. Kuo SH, Chang DB, Lee YC and Luh KT: Tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer are activated T lymphocytes. *Respirology* 3: 55-59, 1998.

20. Viale M, Ferrini S, Serrano S, Serrano D, Ardizzoni A and Nicolin A: Peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer: analysis at the population and clonal level. *Tumori* 76: 488-494, 1990.
21. Salgaller ML: The development of immunotherapies for non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2: 265-278, 2002.
22. Tsuda N, Nonaka Y, Shichijos S *et al*: UDP-Gal: betaGlcNac beta1, 3-galactosyltransferase, polypeptide 3 (GALT3) is a tumor antigen recognised by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes from patients with brain tumor. *Br J Cancer* 87: 1006-1012, 2002.
23. Benlalam H, Labarriere N, Linard B *et al*: Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy. *Eur J Immunol* 31: 2007-15, 2001.
24. Robbins PF, El-Gami, M, Li YF, Zeng G, Dudley M and Rosenberg SA: Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J Immunol* 169: 6036-6047, 2002.
25. Saeterdal I, Bjorheim J, Lislrud K *et al*: Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13255-13260, 2001.
26. Mami-Chouaib F, Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I and Chouaib S: Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen. *Immunol Rev* 188: 114-121, 2002.
27. Kolopp-Sarda MN, Renoult E, Gregoire MJ, Bene MC, Kessler M, and Faure GC.: Increased usage of TCR V-beta8 in kidney transplant recipients with aberrant immune reconstitution and clinical complications. *Transplantation*. 67:1441-1446, 1999.

28. Theodorou I, Bigorgne C, Delfau MH *et al*: VJ rearrangements of the TCR γ locus in peripheral T-cell lymphomas: analysis by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Pathol* 178: 303-310, 1996.
29. Batra RK, Lin Y, Sharma S, Dohadwala M, Luo J, Pold M and Dubinett SM: Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators enhance apoptosis in activated T lymphocytes through an I kappa B kinase-dependent mechanism. *Cancer Res* 63: 642-646, 2003.
30. Mitani K, Nishioka Y, Yamabe K, Ogawa H, Miki T, Yanagawa H and Sone S: Soluble Fas in malignant pleural effusion and its expression in lung cancer cells. *Cancer Sci* 94: 302-307, 2003.
31. Baier PK, Wimmenauer S, Hirsch T, Von Specht BU, Von Kleist S, Keller H and Farthmann EH: Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Tumour Biol* 19: 205-212, 1998.
32. Kirii Y, Magarian-Blander J, Alter MD, Kotera Y and Finn OJ: Functional and molecular analysis of T cell receptors used by pancreatic-and breast tumor-(mucin-) specific cytotoxic T cells. *J Immunother* 21: 188-197, 1998.
33. Halapi E: Oligoclonal T cells in human cancer. *Med Oncol* 15: 203-211, 1998.
34. Echchakir H, Asselin-Paturel C, Dorothee G, Grunnenwal, D, Chouaib S and Mami-Chouaib F: Analysis of T-cell-receptor β -chain-gene usage in peripheral-blood and tumor-infiltrating lymphocytes from human non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 81: 205-213, 1999.
35. Yamamoto T, Katayama I and Nishioka K: Analysis of T cell receptor V beta repertoires of annular erythema associated with Sjogren's syndrome. *Eur J Dermatol* 8: 248-251, 1998.

36. Peoples GE, Davey MP, Goedegebuure PS, Schoof DD and Eberlein TJ: T cell receptor V beta 2 and V beta 6 mediate tumor-specific cytotoxicity by tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Immunol* 151: 5472-5480, 1993.
37. Mukherjee P, Ginardi AR, Tinder TL, Sterner CJ and Gendler SJ: MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes eradicate tumors when adoptively transferred in vivo. *Clin Cancer Res* 7: 848s-855s, 2001.
38. Delfau-Larue MH, Dalac S, Lepage E, Petrella T, Wechsler J, Farcet JP, and Bagot M: Prognostic significance of a polymerase chain reaction-detectable dominant T-lymphocyte clone in cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Blood* 92: 3376-3380, 1998.
39. Nagasawa T, Nakatsuka S, Miwa H, Kanno H, Itami S, Yoshikawa K and Aozasa K: Analysis of T cell antigen receptor gamma chain gene rearrangement by polymerase chain reaction in combination with denaturing gradient gel electrophoresis in the differential diagnosis of cutaneous T-lymphoproliferative diseases. *J Dermatol* 27: 238-243, 2000.
40. Yoshino I, Yano T, Yoshikai Y, Murata M, Sugimachi K, Kimura G and Nomoto K: Oligoclonal T lymphocytes infiltrating human lung cancer tissues. *Int J Cancer* 47: 654-658, 1991.
41. Nitta T, Sato K, Okumura K and Steinman L: An analysis of T-cell receptor variable-region genes in tumor-infiltrating lymphocytes within malignant tumors. *Int J Cancer* 49: 545-550, 1991.
42. Mathoulin MP, Xerri L, Jacquemier J, Adelaide J, Parc P and Hassoun J: Unrestricted T-cell receptor V-region gene repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes from human breast carcinomas. *Cancer* 72: 506-510, 1993.
43. Imahayashi S, So T, Sugaya M *et al*: Establishment of an immortalized T-cell line from lung cancer tissue: phenotypic and functional analyses. *Int J Clin Oncol* 7: 38-44, 2002.

Figure 1 : Exploration of TCR $\alpha\beta$ clonality. V β usage was assessed in flow cytometry.

Data are expressed as percentage of expression of each V β respectively on cells from lymph nodes (\blacktriangle), clinically healthy lung tissue (\blacksquare) and tumoral lung tissue (\bullet).

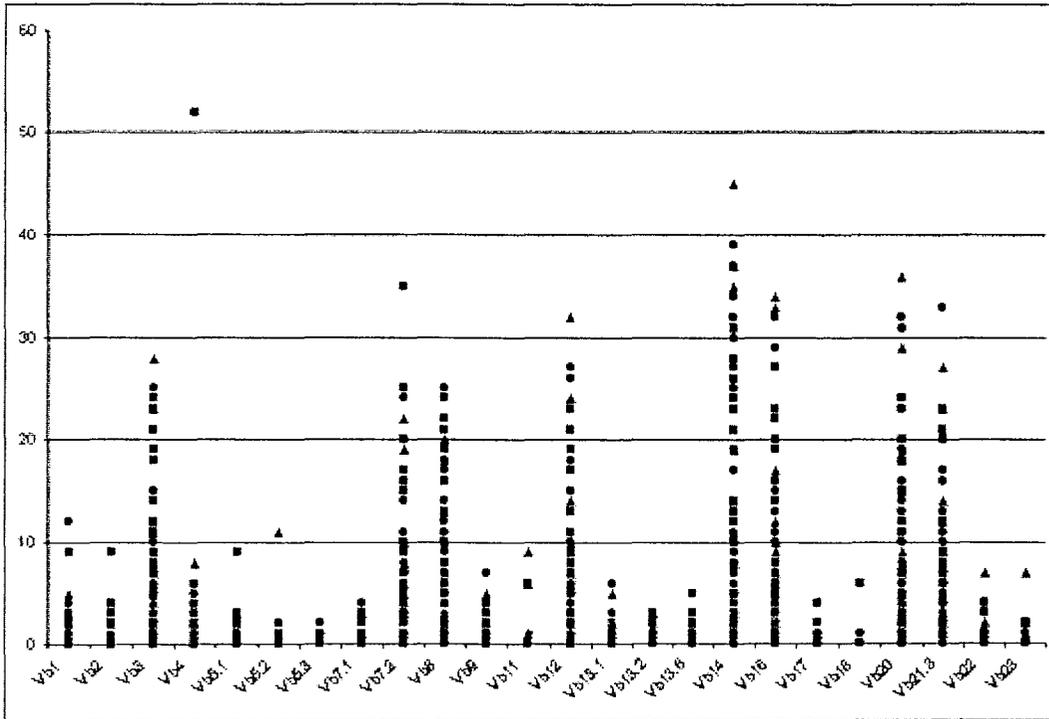


Figure 2. DGGE controls and typical examples of oligoclonality in lung tissue.

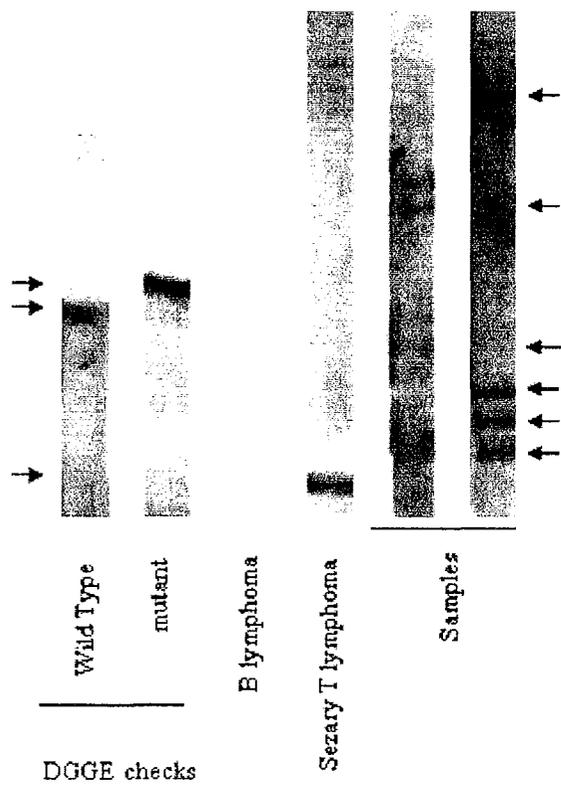


Table 1 : Concomitant presence of V β clones in individual patients. Data are expressed as the number of cases where the same V β specificity was observed as a clone in more than one of the three tissues tested.

	Lymph nodes Tumors and Healthy lung tissues (n=27)	Lymph nodes and Tumors (n=27)	Lymph nodes and Healthy lung tissues (n=27)	Tumors and Healthy lung tissues (n=44)
V β 3	7	13	7	17
V β 7.2	5	8	5	14
V β 8	9	13	9	21
V β 12	8	13	8	16
V β 14	12	16	13	19
V β 16	7	15	7	18
V β 20	9	15	9	20
V β 21.3	8	13	8	20

Table 2 : Exploration of TCR γ clonality. $V\gamma$ rearrangement was assessed by multiplex PCR followed by DGGE/TGGE. Clones were defined by the presence of a well defined band. Data are expressed as number of positive cases, i.e. displaying a given band in the different tissues tested.

Band #	Healthy lung tissues	Tumors	Lymph nodes
	(n=44)	(n=44)	(n=44)
	Positive cases	Positive cases	Positive cases
1	9	12	8
2	14	16	9
3	13	13	11
4	10	12	13
5	8	10	11
6	10	9	8
7	10	13	9
8	11	13	13
9	2	7	5
10	12	15	13
11	7	13	9
12	9	13	13
13	6	16	16
14	11	10	11
15	10	12	13
16	9	8	8
17	4	5	8
18	9	8	7
19	18	15	19



Nom : **Monsieur MASSIN**
Prénom : **Frédéric**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°980

Nancy, le 6 décembre 2004

Le Président de l'Université


Jean-Pierre FINANCE

RESUME

Les tétraspanines s'associent, entre autres avec des intégrines, dans un réseau multimoléculaire à la surface de nombreux types cellulaires, et interviennent dans de multiples fonctions cellulaires et notamment dans le processus d'invasion tumorale.

Dans cette étude l'expression de tétraspanines et d'intégrines $\beta 1$ a été explorée dans le cadre du cancer du poumon, au niveau de cellules de lignées tumorales et d'échantillons de tissu sain et tumoral. L'influence d'un chélateur et de 4 cytokines sur l'expression de ces marqueurs a également été étudiée. Les techniques d'immunofluorescence indirecte utilisées ont permis une analyse en cytométrie de flux et/ou en microscopie UV. Les profils de sécrétion cytokinique de lignées cellulaires ont enfin été déterminés par une technique de cytokine array.

Nos résultats montrent une grande hétérogénéité, tant au niveau de l'expression des molécules étudiées qu'au niveau des facteurs sécrétés par les cellules des différentes lignées tumorales étudiées, et confirment l'implication de CD9, CD82, CD151 et de CD29 dans le cancer du poumon. Les cations divalents apparaissent de plus indispensables à l'expression membranaire des molécules étudiées et à la formation de contacts intercellulaires stables.

En conclusion, l'immunomodulation des tétraspanines et des intégrines $\beta 1$, exprimées par les cellules épithéliales pulmonaires tumorales, par des cytokines immunosuppressives ou impliquées dans les réponses inflammatoires et/ou Th1 confirme l'importance du microenvironnement tumoral dans l'expression de ces molécules.

EXPRESSION OF TETRASPANS AND BETA1 INTEGRINS, AND IMMUNOMODULATION IN LUNG CANCER

Tetraspans associate with integrins in multimolecular complexes on the surface of various cell types and are involved in numerous cell functions and notably in tumour invasion.

The expression of tetraspans and $\beta 1$ integrins has been studied here in lung cancer on tumoral cell lines and on normal and tumoral pulmonary tissue samples. The influence of a chelator and of 4 cytokines on the expression of the molecules tested was also studied. The indirect immunofluorescence techniques used allowed flow cytometry and/or UV-light microscopy analysis. Determination of cytokines secretion patterns was obtained from different cell lines by a cytokine array technique.

Our results show an important heterogeneity in the expression of the molecules studied and in the factors secreted by cells of the different cell lines, and support the involvement of CD9, CD82, CD151 and of CD29 in lung cancer. Moreover, expression of the molecules tested and adequate cell contacts seem to strongly rely on divalent cations availability.

In conclusion, the immunomodulation of tetraspans and $\beta 1$ integrins expressed by pulmonary epithelial tumoral cells, by immunosuppressive cytokines or cytokines involved in the inflammatory and/or Th1 responses supports the major role of tumoral microenvironment in expression of these molecules.

BIOLOGIE CELLULAIRE

MOTS CLES : tétraspanines, intégrines $\beta 1$, cancer du poumon, cellules épithéliales, chélation, immunomodulation, cations divalents, cytokines

Laboratoire d'Immunologie du Prof GC FAURE

Faculté de Médecine de Nancy
Ave de la Forêt de Haye BP 184
54500 Vandoeuvre lès Nancy