

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Caractérisation de l'influence de l'interleukine-13
sur la croissance tumorale**

Par
Julie Mercier

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en immunologie et virologie

Jury d'évaluation

Président du jury

et examinateur interne : Claude Daniel, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe : Jean-François Gauchat, Université de Montréal

Directeur de recherche : Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier

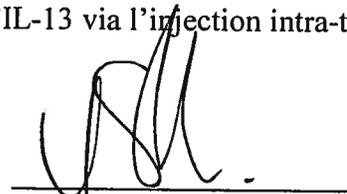
© droits réservés de Julie Mercier, 2003

Résumé

Étant donné que l'environnement péri-tumoral semble jouer un rôle prépondérant dans le développement de tumeurs et que la littérature suggère que l'inflammation serait bénéfique à la croissance tumorale, nous nous sommes intéressés à une cytokine anti-inflammatoire, soit l'IL-13 et nous avons étudié son influence dans le développement du lymphome. L'IL-13 est une protéine soluble sécrétée principalement par les cellules Th₂ activées. Elle possède de nombreuses propriétés et fonctions biologiques similaires à une autre cytokine, l'IL-4 dû au partage d'une sous-unité commune de leur récepteur, soit la chaîne IL-4R α . Le patron d'expression des récepteurs de l'IL-13 est toutefois plus restreint que celui de l'IL-4, notamment en ce qui a trait aux cellules T qui n'expriment pas de récepteur fonctionnel de l'IL-13. Des études récentes réalisées au sein de notre laboratoire ont permis d'étudier l'effet *in vivo* de l'IL-13 sur le développement du lymphome. En utilisant des transfectants stables de cellules de lymphome surexprimant de façon constitutive l'IL-13 murine, nous avons ainsi démontré que le développement de tumeurs était supprimé de façon significative chez les souris ayant reçu ces cellules par voie sous-cutanée et intra-thymique comparativement aux souris ayant reçu les cellules témoins. **L'objectif général de mon projet de recherche visait à caractériser le mécanisme d'action utilisé par l'IL-13 pour induire une protection contre le développement tumoral.** En premier lieu, nous avons voulu mieux comprendre le pouvoir anti-tumoral de l'IL-13. Nous avons, pour ce faire, réalisé des expériences de prolifération à partir de splénocytes murins fraîchement isolés placés en culture avec des cellules de lymphome afin de déterminer l'effet de l'IL-13 sur la prolifération des cellules du système immunitaire. En second lieu, nous avons ciblé les cytokines et les mécanismes susceptibles d'être modulés par l'IL-13. En comparant l'activité *in vivo* de lymphomes témoins ou surexprimant l'IL-13, nous avons démontré que la migration des différentes populations leucocytaires dans l'environnement péri-tumoral n'était pas modulée de façon significative par la présence de l'IL-13. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de l'expression des gènes reconnus comme étant impliqués dans l'invasion tumorale, notamment les gènes codant pour les métalloprotéases de la matrice (MMPs) et les médiateurs de l'inflammation tels que le

TNF α et l'IL-1 β . Suite à ces résultats, nous avons développé un protocole d'analyse génomique nous permettant d'analyser de façon plus globale les gènes susceptibles d'être modulés par cette cytokine et ce, au niveau des cellules péri-tumorales. Plusieurs gènes dont l'expression était modulée par l'IL-13 ont ainsi pu être identifiés. Finalement, nous avons déterminé si le pouvoir anti-tumoral de l'IL-13 était restreint au lymphome ou si cet effet protecteur contre le développement tumoral pouvait être observé chez d'autres types de cancer. Pour ce faire, des transfectants stables de carcinome mammaire murin 4T1 surexprimant constitutivement l'IL-13 ont été générés. Nos résultats ont démontré que l'IL-13 ralentit de façon significative la croissance de tumeurs mammaires, de même que leurs métastases. Finalement, nous avons développé un vecteur adénoviral exprimant l'IL-13 capable d'infecter les cellules lymphomateuses, ce qui nous permettra éventuellement d'évaluer l'effet thérapeutique de l'IL-13 via l'injection intra-tumorale de ce vecteur.


Julie Mercier


Yves St-Pierre

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Yves St-Pierre, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir soutenu et conseillé durant mes études de maîtrise. Je voudrais également remercier Doris Legault et Claire Beauchemin pour leur support technique.

Je remercie tous les étudiants avec qui il m'a été donné de travailler au laboratoire pour leurs conseils, leurs encouragements et leur bonne humeur. Un gros merci à toutes ces personnes pour les discussions et les moments agréables passés en leur compagnie.

Je tiens également à remercier le Dr Bernard Massie de nous avoir gracieusement fourni le vecteur adénovirus afin de nous permettre de réaliser une partie de mes études ainsi que Valérie Lavastre, étudiante dans le laboratoire du Dr Denis Girard, pour son expertise en matière du modèle de la poche d'air murine.

Finalement, je remercie la Fondation Armand-Frappier et le Fonds de recherche FCAR pour leur soutien financier tout au long de mes études de maîtrise.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	VIII
INTRODUCTION	1
1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	2
1.1 LYMPHOME	2
<i>1.1.1 Les différents stades du lymphome</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2 Problématiques associées aux traitements des lymphomes.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3 L'utilisation de la thérapie génique dans le traitement du lymphome</i>	<i>5</i>
1.2 IMPORTANCE DE L'INTERACTION DES CELLULES TUMORALES AVEC L'ENVIRONNEMENT PÉRI-TUMORAL DANS LE DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES	6
<i>1.2.1 Le rôle des médiateurs inflammatoires dans l'évolution de la tumeur</i>	<i>7</i>
<i>1.2.2 Les MMPs et la progression tumorale.....</i>	<i>8</i>
1.3 L'INTERLEUKINE -13.....	14
<i>1.3.1 Les propriétés de l'IL-13</i>	<i>16</i>
<i>1.3.2 Utilisation d'un modèle expérimental de lymphome murin pour étudier l'effet de l'IL-13 sur la croissance tumorale</i>	<i>19</i>
2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
2.1 LIGNÉES CELLULAIRES ET RÉACTIFS	23
2.2 ANIMAUX	24
2.3 TEST DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE	25
<i>2.3.1 Isolation de splénocytes murins.....</i>	<i>25</i>
<i>2.3.2 Mise en co-culture de splénocytes</i>	<i>25</i>
2.4 MODÈLE DE POCHE D'AIR.....	27
<i>2.4.1 Analyses de cytométrie en flux.....</i>	<i>27</i>
<i>2.4.2 Isolation d'ARN et RT-PCR semi-quantitatif</i>	<i>28</i>
<i>2.4.3 Zymographie.....</i>	<i>30</i>
2.5 MATRICES D'ADN COMPLÉMENTAIRES	30
<i>2.5.1 Extraction de l'ARN de thymus.....</i>	<i>30</i>
<i>2.5.2 Vérification de l'intégrité des ARNs de thymus.....</i>	<i>31</i>
<i>2.5.3 Hybridation aux membranes</i>	<i>32</i>
2.6 GÉNÉRATION DE TRANSFECTANTS STABLES DE CELLULES 4T1	34
2.7 MESURE DE L'IL-13 PAR ELISA.....	34
2.8 CROISSANCE TUMORALE ET MÉTASTASIE <i>IN VIVO</i>	35
<i>2.8.1 Modèle d'injection sous-cutanée de cellules B16.....</i>	<i>35</i>

2.8.2	<i>Modèle d'injection sous-cutanée, pour les cellules 4T1, au niveau de la glande mammaire</i>	35
2.8.3	<i>Modèle d'injection intraveineuse des cellules S19</i>	36
2.9	CLONAGE DU GÈNE DE L'IL-13 MURINE DANS UN VECTEUR ADÉNOVIRAL	36
2.10	TRANSFECTION TRANSITOIRE AVEC VECTEURS VIRAUX AD-IL-13#2 ET #7	37
3.0	RÉSULTATS	38
3.1	CARACTÉRISATION DU MODÈLE DE LYMPHOME MURIN 267	38
3.1.1	<i>Caractérisation in vitro</i>	38
3.1.2	<i>Caractérisation in vivo</i>	46
3.1.3	<i>Influence de l'IL-13 sur la métastase d'un lymphome T agressif</i>	51
3.2	ÉTUDE DE LA CAPACITÉ DE L'IL-13 À INHIBER LA TUMORIGÉNICITÉ DES CELLULES DU CARCINOME MAMMAIRE	53
3.2.1	<i>Modèle du carcinome mammaire 4T1</i>	53
3.3.	CARACTÉRISATION DES TRANSFECTANTS	53
3.3.1	<i>Production d'IL-13 par les transfectants stables 4T1</i>	54
3.3.2	<i>Expression de l'ARNm du récepteur fonctionnel de l'IL-13 par les transfectants 4T1</i>	55
3.4	RÉSULTATS IN VIVO	56
3.4.1	<i>Carcinome mammaire 4T1</i>	56
3.5	CONSTRUCTION D'UN VECTEUR ADÉNOVIRAL EXPRIMANT L'IL-13	58
3.5.1	<i>Choix du vecteur viral</i>	58
3.5.2	<i>Clonage de l'IL-13 dans le vecteur adénoviral</i>	60
3.5.3	<i>Génération de transfectants transitoires</i>	61
3.5.4	<i>Production d'IL-13 par les vecteurs adénovirus construits</i>	61
4.0	DISCUSSION	63
4.1	PROLIFÉRATION DE SPLÉNOCYTES	64
4.1.1	<i>Inhibition de prolifération de splénocytes par le mélanome B16</i>	64
4.1.2	<i>Identification de la molécule immunosuppressive</i>	65
4.1.3	<i>Influence des cellules tumorales sur la prolifération de splénocytes activés</i> ..	66
4.1.4	<i>Influence des cellules tumorales sur la prolifération de divers types cellulaires</i>	66
4.2	CARACTÉRISATION IN VIVO DE L'EFFET DE L'IL-13 SUR LE RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE.	67
4.2.1	<i>Modèle de la poche d'air murine</i>	67
4.2.2	<i>Influence de l'IL-13 sur l'expression génique de MMPs et de médiateurs pro-inflammatoires</i>	69
4.2.3	<i>Analyse génomique de l'influence de l'IL-13 in vivo</i>	70
4.2.4	<i>Influence de l'IL-13 sur la métastase du lymphome T agressif</i>	74
4.3	RÉSULTATS IN VIVO	75
4.3.1	<i>Carcinome mammaire 4T1</i>	75
4.4	CONSTRUCTION D'UN VECTEUR ADÉNOVIRAL EXPRIMANT L'IL-13	75
5.0	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	78
	RÉFÉRENCES	80

Liste des figures

- FIGURE 1-** Schéma illustrant l'influence de l'inflammation dans la progression tumorale.
- FIGURE 2-** Récepteurs de l'interleukine-13 et de l'interleukine-4.
- FIGURE 3-** Procédure utilisée pour les matrices d'ADNc.
- FIGURE 4-** Prolifération de splénocytes et cellules tumorales.
- FIGURE 5-** Expression du TGF β 1 par les cellules tumorales.
- FIGURE 6-** Influence de cellules tumorales sur la prolifération de divers types cellulaires.
- FIGURE 7-** Influence de l'interleukine-13 sur le recrutement leucocytaire.
- FIGURE 8-** Influence de l'interleukine-13 sur l'expression génique par la méthode de matrices d'ADN complémentaire.
- FIGURE 9-** Influence de l'interleukine-13 sur la métastase du lymphome T agressif.
- FIGURE 10-** Production d'interleukine-13 par les transfectants stables 4T1.
- FIGURE 11-** Expression du récepteur de l'interleukine-13.
- FIGURE 12-** Influence de l'interleukine-13 sur la croissance tumorale du carcinome mammaire murin.
- FIGURE 13-** Infection de cellules de lymphome par divers virus : adénovirus, adeno-associated-virus (AAV₂), rétrovirus.
- FIGURE 14-** Schéma du vecteur adénoviral construit.
- FIGURE 15-** Production d'IL-13 par les vecteurs adénovirus.

Liste des tableaux

TABLEAU I	Classification des MMPs.
TABLEAU II	Activités biologiques des interleukine-4 et -13 humaines et murines.
TABLEAU III	Effet de l'expression de l'IL-13 sur la croissance de lymphomes T.
TABLEAU IV	Description des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification par PCR des différents gènes étudiés.
TABLEAU V	Gènes dont l'expression est régulée par l'IL-13.

Liste des abréviations

°C	:	degré Celsius
μCi	:	microcurie
μl	:	microlitre
AAV ₂	:	adéno-associated virus-2
Ad	:	adénovirus
ADCC	:	cytotoxicité dépendante d'anticorps
ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
ARN	:	acide ribonucléique
bFGF	:	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CaCl ₂	:	chlorure de calcium
CIAP	:	phosphatase alcaline (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)
CMV	:	cytomégalovirus
CO ₂	:	dioxyde de carbone
ConA	:	concanavoline A
CPA	:	cellules présentatrices d'antigènes
cpm	:	comptes par minute
DMEM	:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNTP	:	déoxynucléotide triphosphate
EDTA	:	acide éthylènediamine-tétraacétique
ELISA	:	<i>Enzyme-linked immuno-absorbent assay</i>
GFP	:	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	:	<i>granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i>
GRO	:	<i>growth-related-gene product</i>
HEPES	:	acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonique
i.d.	:	intra-dermique
i.p.	:	intra-péritonéal
i.p.a.	:	intra-poche d'air

i.t.	:	intra-thymique
i.v.	:	intraveineux
ICAM-1	:	<i>cell adhesion molecule-1</i>
IFN	:	interféron
IgG	:	immunoglobuline G
IL	:	interleukine
IL-13R α	:	chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-13
kDa		kilodalton
LB	:	<i>Luria broth</i>
LPS	:	lipopolysaccharide
LT	:	lymphokine T
MadCAM	:	<i>Mucosal adhesion cell adhesion molecule</i>
MCP-1	:	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MFI	:	<i>mean fluorescence intensity</i>
MIP-1	:	<i>macrophage inflammatory protein-1</i>
MMP	:	metalloprotéase de la matrice
MuLV	:	<i>murine leukemia virus</i>
NaN ₃	:	azide de sodium
NK	:	<i>natural killer</i>
pb	:	paire de bases
PBS	:	tampon salin phosphaté (<i>phosphate buffered saline solution</i>)
PCR	:	réaction de polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	:	potentiel d'hydrogène
rpm	:	rotation par minute
RPMI	:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	:	transcriptase inverse (<i>reverse transcriptase</i>)
s.c.	:	sous-cutané
SA-PE	:	Streptavidine-phycoérythrine
SDF-1	:	stromal derived factor
SDS	:	sulfate dodecyl de sodium
SVF	:	serum de veau foetal

TGF β	:	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMPs	:	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF α	:	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
Tris	:	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	:	ultra-violet
V	:	volt
VCAM-1	:	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	:	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Introduction

Le lymphome est un type de cancer affectant le système lymphatique et plus particulièrement les lymphocytes T et B. Il existe deux types de lymphome : Hodgkinien et non-Hodgkinien. Notre laboratoire s'intéresse aux lymphomes non-Hodgkiniens, qui représentent 85% des cas de lymphomes diagnostiqués (Simon 2001).

Les expériences à être réalisées dans le cadre de mon projet de recherche font suite aux recherches menées au sein de notre laboratoire par le Dr Olivier Robledo. En utilisant un modèle murin syngénique, nous avons démontré que l'expression constitutive de l'IL-13 dans les lymphomes inhibait leur croissance. Le mécanisme par lequel l'IL-13 exerce son effet anti-tumoral demeure toutefois inconnu. Mon projet de recherche visait donc à caractériser, à l'aide de ce modèle expérimental, le mécanisme utilisé par l'IL-13 pour protéger contre le développement tumoral. Pour ce faire, nous avons porté une attention particulière aux cellules péri-tumorales exprimant le récepteur de cette cytokine, puisque les cellules lymphomateuses T n'expriment pas de niveaux détectables du récepteurs de l'IL-13. De plus, d'autres lignées de cellules tumorales murines ont été transfectées avec l'ADNc de l'IL-13 murine afin de déterminer l'effet sur d'autres types de tumeurs et sur la dissémination des cellules métastatiques. Nous avons opté, dans ce cas, pour un modèle de carcinome mammaire murin, 4T1, soit un modèle de cancer du sein largement utilisé et documenté dans la littérature. Une partie de mon projet de recherche aura également consisté à générer un vecteur viral optimal pour le lymphome T et à développer un vecteur adénoviral qui nous permettra éventuellement de tester *in vivo* l'efficacité de tels vecteurs en ce qui a trait à l'utilisation de l'IL-13 pour induire la régression de la croissance tumorale.

Ce mémoire présente d'abord une revue de littérature traitant du lymphome, des traitements utilisés, de l'importance de l'environnement péri-tumoral, notamment des médiateurs inflammatoires, dans le développement tumoral, et de l'interleukine-13 et ses propriétés. Dans la deuxième partie, une description du modèle expérimental et des principaux éléments à la base des expériences sont présentés. Ensuite, une description des résultats obtenus et la mise en contexte de ceux-ci complètent le mémoire.

1. Revue de littérature

1.1 Lymphome

Le mot « lymphome » constitue un terme général utilisé pour regrouper tous les cancers ayant pour origine le système lymphatique, lequel est composé de nombreux ganglions lymphatiques répartis dans tout l'organisme, tels que la rate, le tractus gastro-intestinal et le thymus chez les enfants ainsi que des vaisseaux interagissant avec le système circulatoire sanguin (Simon 2001). Le lymphome représente le cinquième cancer causant le plus de mortalité dans le monde (Gouvernement du Canada 2002). On distingue deux grandes catégories de lymphome : le lymphome Hodgkinien et le lymphome non-Hodgkinien. Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement aux lymphomes non-Hodgkiniens puisqu'ils constituent un type de cancers dont l'incidence augmente de façon importante, soit environ 3 % par année depuis 1970 (Longo 2000). En 2002, 6 300 nouveaux cas de lymphomes non-Hodgkiniens ont été diagnostiqués au Canada et 54 000 nouveaux cas aux États-unis (Vose, Chiu et al. 2002). La classification des lymphomes est relativement complexe. Les lymphomes Hodgkiniens peuvent être subdivisés en quatre types et les lymphomes non-Hodgkiniens en plus d'une vingtaine. Cette subdivision des lymphomes non-Hodgkiniens repose sur plusieurs critères ou caractéristiques tels que le type et la morphologie cellulaires et la vitesse de croissance tumorale (Simon 2001). Plusieurs systèmes de classification pour les lymphomes non-Hodgkiniens ont été proposés dont le principal appelé « REAL » (*Revised European American Lymphomas classification*). Ce système veut que les lymphomes soient d'abord divisés selon les types cellulaires touchés (cellules B ou T). Par la suite, ils sont redivisés selon le stade de maturité des cellules impliquées (matures ou immatures) et finalement, selon l'apparence des cellules (caractéristiques génétiques, marqueurs spécifiques) (Simon 2001). Toutefois, qu'il s'agisse de lymphomes Hodgkiniens ou non-Hodgkiniens, les signes précurseurs sont très similaires. L'apparition d'une masse ou enflure au niveau d'une région riche en ganglions lymphatiques, bien souvent au niveau du cou, au-dessus de la clavicule, au niveau des aisselles et près de l'aîne est souvent le premier signe de la maladie. D'autres manifestations telles que des sueurs nocturnes, une perte de poids, de la fièvre, de la fatigue, ainsi qu'une perte d'appétit peuvent également

être observées. Puisque le lymphome peut atteindre la moelle osseuse, une anémie et des saignements peuvent révéler la maladie (Kujas 2000). Toutefois, les différents symptômes énumérés précédemment ne sont aucunement spécifiques au lymphome et pourraient facilement être la conséquence d'autres désordres : infection (ex : infection par le virus Epstein-Barr), prise de médicaments, autres cancers, etc. (Kujas 2000). Afin de confirmer un diagnostic de lymphome, il faut recourir à des examens médicaux plus spécifiques tels qu'une biopsie, une scanographie, un test évaluant les fonctions hépatiques et rénales ainsi que le taux de lactate déshydrogénase (LDH) sérique (Kujas 2000).

1.1.1 Les différents stades du lymphome

Malgré le fait que les lymphomes Hodgkinien et non-Hodgkinien présentent les mêmes manifestations cliniques, il importe de les distinguer lors du diagnostic puisque leurs traitements sont fort différents. Le lymphome non-Hodgkinien se distingue du lymphome Hodgkinien par le fait qu'il possède une capacité accrue à se disséminer à un site secondaire à la tumeur primaire. On appelle ce phénomène la métastase. La métastase, peu importe le type de cancer, est la principale cause de mortalité des suites d'un cancer. Cela explique pourquoi le lymphome non-Hodgkinien est beaucoup plus difficile à traiter. Les traitements visant à traiter le lymphome varient grandement selon le stade de la maladie, du type cellulaire impliqué, de la localisation du cancer, etc. (Simon 2001). Le stade le plus précoce du lymphome, soit le stade I, implique que le lymphome touche seulement une région de ganglions ou un seul organe (Kujas 2000). Le stade II, quant à lui, signifie que deux ou plusieurs régions de ganglions ou organes du même côté du diaphragme sont atteints. Au stade III, le lymphome est retrouvé dans des régions riches en ganglions ou dans des organes lymphoïdes et ce, des deux côtés du diaphragme. Le stade IV représente le stade le plus avancé de la maladie et implique que le lymphome s'est disséminé via la circulation sanguine aux organes non-lymphoïdes (cerveau, peau, ovaires, foie).

1.1.2 Problématiques associées aux traitements des lymphomes

Les traitements contre le lymphome sont grandement influencés par le stade d'évolution de la maladie. Encore aujourd'hui, les traitements de chimiothérapie utilisant des drogues tuant les cellules cancéreuses à travers l'organisme demeurent les plus souvent recommandés et les plus efficaces. Celui qui est le plus fréquemment prescrit s'appelle CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) (Kujas 2000). Des études ont démontré qu'une combinaison de chimiothérapie et de radiations était davantage efficace et bénéfique puisqu'elle permettrait de réduire la dose de drogue chimiothérapeutique à administrer et ainsi atténuer les effets secondaires associés à ce type de traitement (nausées, vomissements, diarrhée, perte de cheveux et de poids, anémie, dépression). Étant donné l'importance et le nombre d'effets secondaires, il importe de développer de nouvelles thérapies afin de traiter le lymphome. Ainsi, de plus en plus, les médecins ont recours à l'immunothérapie. Ce traitement repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ayant les mêmes propriétés que ceux naturellement produits par l'organisme. Ainsi, ces derniers auraient la capacité de se fixer à des protéines exprimées à la surface des cellules tumorales (antigènes tumoraux), rendant ainsi les cellules plus vulnérables à l'attaque par d'autres types cellulaires du système immunitaire (macrophages, cellules dendritiques, etc.). Les anticorps utilisés dans le traitement du lymphome peuvent être non-conjugués ou être couplés à un agent radioactif ou à une toxine qui va détruire la cellule tumorale lorsque fixés à celle-ci. Présentement, il existe un anticorps monoclonal non-conjugué approuvé pour le traitement des lymphomes. Il s'agit de Rituximab, celui-ci étant dirigé contre la molécule de surface CD20 exprimée sur les cellules B matures et la majorité des lymphomes B (Vose, Chiu et al. 2002). Il pourrait également être combiné à des traitements de chimiothérapie afin d'en augmenter l'efficacité. Par contre, des effets secondaires tels que de la fièvre, des nausées, des frissons, des maux de tête peuvent être occasionnés suite à son utilisation. Il existe de nombreux traitements alternatifs, basés sur l'immunothérapie, contre le lymphome, notamment ceux ayant recours à l'interféron α et la transplantation de moelle osseuse (Simon 2001).

1.1.3 L'utilisation de la thérapie génique dans le traitement du lymphome

De plus en plus, les recherches portant sur le traitement du lymphome s'orientent vers une nouvelle approche thérapeutique, soit la thérapie génique. Comme son nom l'indique, cette approche permet d'agir au niveau des gènes du patient. Elle a bien souvent recours à des vecteurs viraux afin de modifier l'expression de gènes d'intérêt et son efficacité va dépendre en grande partie du choix de ce vecteur (Adams et Emerson 1998). Les vecteurs adénoviraux sont parmi les plus prometteurs pour les thérapies anti-cancéreuses étant donné que ces vecteurs, contrairement aux vecteurs rétroviraux, ont une capacité très limitée de s'intégrer dans le génome de la cellule, ce qui présente moins de risque pour le patient (Adams et Emerson 1998). Ils permettent également l'intégration d'un insert d'une taille importante et peuvent infecter un vaste spectre de cellules, quiescentes ou en division. Cependant, une réponse immunitaire dirigée contre le vecteur peut s'établir et entraîner l'élimination de ce dernier par l'organisme (Green et Seymour 2002). Ainsi, plusieurs paramètres liés aux vecteurs viraux demandent encore à être étudiés et améliorés.

En thérapie génique, il existe quatre façons de modifier les gènes chez un patient (Adams et Emerson 1998). La première consiste à remplacer un gène défectueux ou à insérer un gène qui était complètement absent dans le génome d'une cellule via l'utilisation de vecteurs viraux. Dans le cas du lymphome, il serait pertinent d'insérer des gènes suppresseurs de tumeurs ou des gènes augmentant la sensibilité des cellules tumorales aux drogues chimiothérapeutiques. Une deuxième façon de procéder implique une interférence avec un gène voulu par l'utilisation de molécules d'oligonucléotides antisens spécifiquement créées pour interagir avec l'ADN ou l'ARNm d'un oncogène, empêchant ainsi son expression. A cet effet, une étude a été menée à partir d'antisens pour le gène codant pour Bcl-2, une molécule anti-apoptotique souvent surexprimée chez les cellules tumorales (Webb, Cunningham et al. 1997). Il est également possible d'utiliser des molécules d'ARN appelées ribozymes ayant la capacité de cliver spécifiquement des ARNm cibles. Finalement, la dernière façon de procéder, celle qui nous concerne plus particulièrement, se dit immunopotentialisation. Elle consiste en l'ajout d'un gène à l'intérieur d'une cellule tumorale afin d'en augmenter, par exemple,

son immunogénicité. A cet effet, le GM-CSF a fait l'objet de nombreux travaux et des vaccins anti-tumoraux à base de cellules transfectées avec le gène de cette cytokine sont présentement en essais cliniques (Chang, Chen et al. 2000). On peut ainsi faire exprimer par une cellule tumorale le gène codant pour une molécule accessoire impliquée dans la présentation d'antigène telle que ICAM-1, B7 ou une cytokine (Pulaski et Ostrand-Rosenberg 1998). Ce type de manipulation génétique a été réalisé avec succès dans le cas de l'IL-12 (Wadhwa, Zielske et al. 2002), une cytokine produite principalement par les CPA (macrophages, monocytes, cellules dendritiques) et dont le rôle principal est d'activer les cellules T cytotoxiques et de stimuler les cellules NK, favorisant ainsi la réponse Th1 (Gately, Wolitzky et al. 1992; Trinchieri 1994). Il a notamment été démontré que l'injection intra-tumorale d'IL-2 et d'IL-12 via un vecteur viral de la vaccine entraînait la régression de tumeurs déjà établies (Chen, Timiryasova et al. 2001). Cette thérapie anti-tumorale tire toute son importance du fait que l'environnement péri-tumoral joue un rôle déterminant dans l'évolution de la croissance tumorale.

1.2 Importance de l'interaction des cellules tumorales avec l'environnement péri-tumoral dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques

Depuis longtemps déjà, il a été postulé que l'environnement péri-tumoral jouait un rôle important dans le développement de tumeurs. À cet effet, Virchow a émis l'hypothèse, en 1863, que l'origine des cancers se situait aux sites d'inflammation chronique puisque certains irritants provoquant des blessures tissulaires entraîneraient une inflammation favorisant une prolifération cellulaire accrue (Balkwill et Mantovani 2001). Il a été établi que les cellules tumorales, tout comme c'est le cas lors d'une blessure tissulaire, produisent une variété de cytokines et chimiokines qui attirent les leucocytes : neutrophiles, macrophages, éosinophiles, mastocytes et lymphocytes (Coussens et Werb 2002). Toutes ces cellules sont des composantes du système immunitaire et sont capables de produire un grand nombre de cytokines et médiateurs cytotoxiques incluant des réactifs oxygénés, des sérine protéases, des métalloprotéases de la matrice (MMPs), du TNF α , des interleukines, des interférons, etc. La littérature

suggère que l'inflammation et les médiateurs pro-inflammatoires seraient favorables, dans certaines conditions, au développement de tumeurs (Coussens et Werb 2002). Dans le cas du mélanome, par exemple, comme pour tous les tissus néoplasiques pratiquement, les macrophages représentent une part importante des constituants pro-inflammatoires infiltrant les tumeurs. Ces macrophages, appelés TAMs (*Tumor Associated Macrophages*), produisent des facteurs pro-angiogéniques et lymphangiogéniques, des cytokines, des protéases qui favoriseraient ainsi l'évolution du cancer. Ces macrophages sécrètent également de l'IL-10, un puissant agent immunosuppresseur, entraînant une inhibition de la réponse anti-tumorale par les cellules T cytotoxiques. Par contre, ces mêmes macrophages peuvent également tuer les cellules tumorales lorsque stimulés par l'IL-2, l'IFN γ et l'IL-12. Durant le développement du mélanome, les macrophages activés vont sécréter du TGF β , du TNF α , de l'IL-1 α et des protéases. En réponse à cette production de substances, les mélanocytes vont sécréter de l'IL-8 et VEGF-A, ce qui va induire l'angiogénèse dans la tumeur. De cette façon, l'infiltration de macrophages serait fortement reliée à l'invasion du mélanome (Coussens et Werb 2002).

1.2.1 Le rôle des médiateurs inflammatoires dans l'évolution de la tumeur

Cette infiltration de cellules immunitaires au niveau des tumeurs ou à proximité de celles-ci entraîne la production et la sécrétion de médiateurs oxygénés et nitrogénés par les cellules immunitaires. Ces médiateurs réagissent et forment un agent fortement mutagène, le peroxy-nitrite, causant ainsi des mutations dans l'ADN, le plus souvent des modifications dans les bases vont résulter en des mutations ponctuelles (Shacter et Weitzman 2002). L'inflammation pourrait donc avoir pour conséquence une série de mutations dans l'ADN des cellules environnantes et favoriser ainsi l'émergence ou la progression du cancer. On croit de plus en plus qu'un état d'équilibre entre les cytokines et chimiokines pro- et anti-inflammatoires dans l'environnement péri-tumoral s'avère déterminant pour l'évolution du développement du cancer (Coussens et Werb 2002). Par exemple, dans le cas du mélanome, des expériences *in vitro* ont démontré qu'une surexpression des chimiokines GRO α , GRO β ou GRO γ augmentait considérablement sa prolifération et sa tumorigénicité alors que si on inhibe ces mêmes chimiokines, sa prolifération s'en trouve atténuée.

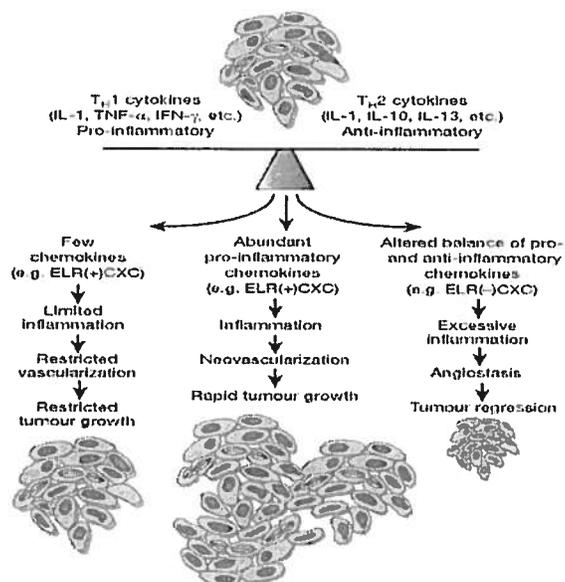


FIGURE 1- Schéma illustrant l'influence de l'environnement péri-tumoral dans l'évolution du développement tumoral. (Tiré de *Coussens et Werb, Nature 2002*)

De plus, les médiateurs pro-inflammatoires relâchés par les cellules immunitaires lors d'une réaction inflammatoire vont provoquer une augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhésion (ex : sélectines, ICAM-1) à la surface cellulaire, facilitant ainsi la migration des leucocytes vers le site d'inflammation (Coussens et Werb 2002). Les cellules tumorales, en plus de profiter des médiateurs produits par les cellules immunitaires pour croître et se disséminer, peuvent utiliser ces molécules d'adhésion pour favoriser leur migration et par le fait même, leur nidification dans un site secondaire à la tumeur (Fabbri 1999). Cette migration doit cependant être facilitée par des protéases telles que les MMPs (Basset 1997).

1.2.2 Les MMPs et la progression tumorale

Les MMPs forment une famille composée d'environ 23 membres à ce jour. Ce sont des enzymes de dégradation dépendantes du zinc et du calcium qui ont une affinité pour la gamme complète des protéines de la matrice extracellulaire (Johnson, Dyer et al. 1998). Ces protéases sont impliquées dans plusieurs processus biologiques normaux et pathologiques tels que l'angiogénèse, le développement embryonnaire, l'apoptose, la

migration cellulaire, la guérison, la reconstruction des os et dans plusieurs maladies dégénératives dont l'arthrite rhumatoïde, la dégradation de la barrière hémato-encéphalique ainsi que dans la migration de lymphocytes et de cellules tumorales (Johnson, Dyer et al. 1998).

1.2.2.1 Structure des MMPs

Tous les membres de la famille possèdent une homologie structurale et fonctionnelle. La majorité des MMPs est constituée d'un pro-domaine contenant des résidus conservés de cystéine assurant la latence des MMPs, un domaine catalytique et un domaine incluant un site actif (Kleiner et Stetler-Stevenson 1999). MMP-2 et MMP-9, ayant la capacité cliver la gélatine, possèdent un domaine additionnel possédant un site de liaison à la gélatine situé entre le domaine catalytique et le domaine actif (Kleiner et Stetler-Stevenson 1999). La majorité des MMPs sont sécrétées à l'exception des MMPs-14 à 17 et MMPs-24 et 25 qui possèdent un domaine additionnel trans-membranaire (MT-MMPs) (Kleiner et Stetler-Stevenson 1999) (Visse et Nagase 2003). Les MMPs sont classées arbitrairement et essentiellement selon leur similarité structurale (Johnson, Dyer et al. 1998). Ainsi, on retrouve des gélatinases, des collagénases, des stromélysines (Tableau I). Les MMPs-1-2-3-9 ont également la capacité de cliver l'IL-1 β et le TNF α , ce dernier étant considéré comme étant un puissant médiateur pro-inflammatoire lorsque retrouvé sous forme soluble (Ito, Mukaiyama et al. 1996; Brigati, Noonan et al. 2002).

1.2.2.2 Sécrétion et activation des MMPs

Les MMPs sont sécrétées sous forme inactive (zymogène) et doivent être activées dans le milieu extracellulaire pour exercer leurs effets. Leur activation extracellulaire se produit généralement en deux étapes. La première étape consiste en un clivage partiel de leur pro-domaine par des activateurs de protéases (plasmine, *plasminogen type urokinase activator*, sérine protéases, ou autres MMPs) et la deuxième étape constitue un clivage final par une MMP, relargant l'enzyme active (Nagase 1997). A cet effet, les MMPs-14 à 16 peuvent activer MMP-2 qui, elle, va activer à son tour MMP-9 (Kleiner et Stetler-Stevenson 1999). L'activité des MMPs est induite par une augmentation synchronisée de

la transcription, de la sécrétion et de l'activité protéolytique. Dans les tissus normaux, elles présentent une très faible activité protéolytique à l'exception de MMP-2 qui est souvent exprimée de façon constitutive (Johnson, Dyer et al. 1998). Leur transcription, fortement influencée par différentes cytokines et facteurs de croissance, varie selon le type cellulaire impliqué (Goetzl, Banda et al. 1996). Ainsi, la transcription de MMP-9 va être induite par différentes cytokines, soit TGF β 1, IL-1 β , TNF α , bFGF et LT chez les macrophages et fibroblastes alors que chez les lymphocytes T, elle va être induite par l'IL-1, le TNF α , IL-2 et l'IL-4 (Saren, Welgus et al. 1996; Kossakowska, Edwards et al. 1999). De plus, les MMPs sont sécrétées par différents types cellulaires (neutrophiles, macrophages, éosinophiles, cellules T) selon un patron d'expression spécifique à chaque type cellulaire (Goetzl, Banda et al. 1996). Par exemple, les macrophages vont sécréter les MMPs-1-2-3-9 et 12 alors que les cellules T vont produire essentiellement MMP-9. Les MMPs, en plus d'être sécrétées par les cellules immunitaires, vont être produites par les cellules stromales suite à leur stimulation par des médiateurs pro-inflammatoires (Kleiner et Stetler-Stevenson 1999; Nagase et Woessner 1999; Coussens et Werb 2002).

1.2.2.3 Actions des MMPs

Paradoxalement, les MMPs ont la capacité de promouvoir la progression tumorale ou de l'empêcher. Ainsi, les MMPs (ex : MMP-2) ont la capacité de moduler le recrutement des cellules immunitaires en clivant des composantes de la matrice extracellulaire (ex : laminine-5) libérant ainsi des molécules chimioattractantes pour les leucocytes telles que MCP, SDF-1, etc (Opdenakker et Van Damme 1992; Hooper, Karran et al. 1997). De plus, certaines MMPs (ex : MMPs-3-7-9-12) activent l'angiogénèse. A cet effet, Bergers et al. ont rapporté, dans le cas de la carcinogénèse des îlots pancréatiques, que MMP-9 favorisait le caractère angiogénique en rendant VEGF plus accessible pour son récepteur (Bergers, Brekken et al. 2000). Ces mêmes MMPs peuvent également libérer des fragments de collagène de la membrane basale et de plasminogène qui s'avèrent être des inhibiteurs d'angiogénèse (ex : angiostatine) (Kleiner et Stetler-Stevenson 1999). Dans le cas de la majorité des cancers, l'expression d'une ou de plusieurs MMPs est souvent augmentée, comme dans les cas de carcinomes pulmonaires, des cancers colorectal et du sein, et du lymphome non-Hodgkinien

(Kossakowska, Huchcroft et al. 1996). Des expériences antérieures réalisées au sein de notre laboratoire ont permis d'établir que l'expression des MMPs, plus particulièrement celle de MMP-9, était corrélée avec l'agressivité et le pouvoir métastatique du lymphome T non-Hodgkinien (Aoudjit, Masure et al. 1999). Ainsi l'augmentation du caractère métastatique d'un lymphome murin suite à des passages *in vivo* corrèle avec une augmentation de l'expression constitutive de MMP-9 (Lalancette et al. 2000). Bernhard et al rapportent également une évidence montrant le lien entre l'expression de MMP-9 et le phénotype métastatique des cellules embryonnaires de rat transformées (Bernhard, Gruber et al. 1994). Ces études illustrent clairement l'implication des MMPs pour les cellules tumorales dans le développement et la progression de celles-ci. Un moyen efficace de déterminer l'influence d'un gène donné étant de l'inactiver chez la souris, Itoh et al. ont généré des souris déficientes en MMP-9 en remplaçant les exons 1 à 6 du gène codant pour MMP-9 par une cassette néomycine à l'aide d'un vecteur. Les études à partir de ce modèle ont permis de démontrer que l'absence de MMP-9 diminuait d'environ 50% le nombre de métastases pulmonaires (Itoh, Tanioka et al. 1999). .

Toutefois, il a été établi que les cellules tumorales ne sont pas la seule source de MMP *in vivo*, et que les cellules saines entourant les cellules tumorales avaient également cette capacité. Ainsi, une diminution de la formation de métastases chez les souris déficientes en MMP-9 démontre un rôle important de cette MMP provenant de l'hôte (Coussens et al. 2000). Ces expériences ont fourni la première évidence voulant que les cellules de l'hôte sécrétant des MMPs soient grandement impliquées dans la métastase des cellules cancéreuses. Dans le même ordre d'idées, Coussens et al. (2002) avaient également observé que l'expression de MMP-9 n'était pas détectable chez les cellules de peau saines alors qu'elle était augmentée lors d'hyperplasie ou de tissus cancéreux. En utilisant un modèle de souris transgéniques de carcinogénèse de la peau induite par le papillomavirus humain de type 16, l'équipe du Dr Werb a démontré que l'ablation génétique du gène MMP-9 induisait un retard du développement de l'hyperplasie et de l'évolution vers un phénotype malin comparativement aux souris témoins (MMP-9^{+/+}). Cependant, en restaurant la moelle osseuse de ces souris MMP-9^{-/-} avec des cellules souches provenant de souris MMP-9^{+/+}, les souris MMP-9^{-/-} ont

développé une hyperplasie et une métastase comparable aux souris MMP-9^{+/+}. Par cette étude, il est possible de constater que MMP-9 fournie par les cellules de la moelle osseuse est suffisante pour promouvoir la progression tumorale (Coussens, Tinkle et al. 2000).

1.2.2.4 Inhibiteurs de MMPs

Les membres de la famille des MMPs interagissent avec des inhibiteurs de protéases appelés TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*). Jusqu'à maintenant quatre TIMPs ont été clonés, séquencés et ceux-ci inhibent généralement la forme active des MMPs, mais parfois aussi à leur forme inactive tel que c'est le cas pour TIMP-1 et pro-MMP-9 puis TIMP-2 et pro-MMP-2, en se liant de façon non-covalente avec le site actif de ces dernières (Kleiner et Stetler-Stevenson 1999). Chaque TIMP peut se lier à plusieurs MMPs, mais selon des degrés d'affinité variables. La production des TIMPs, tout comme celle des MMPs, va être influencée par différents facteurs et cytokines, notamment les médiateurs pro-inflammatoires qui vont induire leur expression (Kossakowska, Edwards et al. 1999) et cette dernière va varier en fonction du type cellulaire stimulé. Ces TIMPs remplissent également plusieurs autres fonctions. A cet effet, TIMP-1 promouvoit la croissance d'une variété de cellules, prévient l'apoptose des cellules B et induit leur différenciation (Kossakowska, Edwards et al. 1999). Ils peuvent également activer certaines MMPs. Ainsi, un déséquilibre entre les productions de MMPs et de TIMPs provoquerait plusieurs pathologies telles que la métastase, la croissance tumorale, l'arthrite, les maladies cardiovasculaires, rendant ainsi les MMPs attrayantes pour le développement de thérapies variées.

1.2.2.5 Essais cliniques à partir d'inhibiteurs synthétiques des MMPs

Plusieurs études cliniques ciblant les MMPs ont été réalisées à l'aide d'inhibiteurs peptidiques. Certains inhibiteurs se sont avérés efficaces, notamment dans le cas du traitement d'ulcères cornéens, mais bien peu se sont avérés prometteurs en ce qui a trait aux cancers (Johnson, Dyer et al. 1998). L'utilisation de ces inhibiteurs synthétiques de MMPs est quelque peu risquée puisque, malgré le fait que les MMPs soient impliquées dans plusieurs pathologies, elles occupent un rôle important dans plusieurs processus

biologiques normaux tels que l'angiogénèse, la guérison de blessures, l'embryogénèse et la migration cellulaire. L'utilisation de tels inhibiteurs de MMPs, bloquant toutes les fonctions d'une ou de plusieurs MMPs, a déjà été testée en clinique et plusieurs effets secondaires sérieux avaient été rapportés. Le risque le plus important de l'utilisation de ces inhibiteurs vient du manque de sélectivité de ces derniers, ce qui aurait pour conséquence le blocage de l'activité de plusieurs MMPs simultanément (Johnson, Dyer et al. 1998). Le développement d'inhibiteurs de MMPs spécifiques pour une maladie donnée permettrait certainement de réduire les effets secondaires associés à ce type de traitement. Par contre, puisqu'il existe plusieurs redondances dans leurs fonctions, le traitement d'une maladie quelconque nécessiterait probablement le ciblage de plusieurs MMPs, rendant la stratégie de traitement plutôt complexe.

Puisque l'inflammation semble de plus en plus favorable à la progression tumorale, il est possible de croire qu'un déséquilibre en faveur des facteurs anti-inflammatoires empêcherait le développement de tumeurs. Dans cette optique, nous nous sommes donc intéressés au potentiel de IL-13, qui par ses propriétés anti-inflammatoires, aurait la capacité de diminuer la production de médiateurs pro-inflammatoires et de MMPs responsables de la promotion de la progression tumorale. Cette cytokine pourrait ainsi certainement être envisagée dans le cadre d'un traitement contre le cancer, notamment celui du lymphome T.

TABLEAU I : Classification des MMPs

# MMP	Nom commun	Substrats
1	Collagénase interstitielle	Collagène type I-II-III-VII et X
2	Gélatinase A	Gélatine collagène types I, IV, V laminine V
3	Stromélysine 1	Collagène types III, IV, IX et X gélatine proMMP-1 laminine protéoglycans
7	Matrilysine	Gélatine Fibronectine ProMMP-1
8	Collagénase neutrophile	Collagène types I, II, III, VII et X
9	Gélatinase B	Gélatine, Collagène types I, IV, V et X
10	Stromélysine 2	Collagène types III, IV, IX et X Gélatine ProMMP-1 Laminine Protéoglycans
11	Stromélysine 3	Alpha-1-antiprotéase
12	Métalloélastase	Élastine
13	Collagénase 3	Collagène types I, II, III, VII et X
14	MT1-MMP	ProMMP-2 Gélatine Collagène
15	MT2-MMP	ProMMP-2
16	MT3-MMP	ProMMP-2
17	MT4-MMP	inconnu
18/19	RASI-1	inconnu
20	Enamélysine	Amélogénine
21	XMMP (Xenopus)	Non-caractérisé
23	CA-MMP	Non-caractérisé
24	MT5-MMP	Non-caractérisé
25	MT6-MMP	Non-caractérisé
26	Matrilysine 2	Non-caractérisé
27	CMMP (Gallus)	Non-caractérisé
28	Epilysine	Non-caractérisé

(Inspiré de *Kleiner et Stetler-Stevenson, (Cancer Chemother.Pharmacol. 1999)* et de *Visse et Nagase (Circulation Research, 2004)*)

1.3 L'interleukine –13

L'IL-13 appartient à la famille des cytokines incluant le GM-CSF, IL-3, IL-4 et IL-5 (Chomarat and Banchereau 1998). L'IL-13 est une protéine soluble de 131 acides

aminés, d'une masse moléculaire d'environ 10 kDa généralement retrouvée sous forme non-glycosylée. Le gène codant pour l'IL-13 se trouve sur le chromosome 11 chez la souris et forme un groupe avec les gènes codant pour les cytokines énumérées ci-haut. Le gène codant pour l'IL-13 est constitué de quatre exons et trois introns. L'IL-13 est sécrétée principalement par les cellules Th₂ activées, mais peut aussi être sécrétée par les basophiles, les mastocytes et les cellules B malignes (Chomarat et Banchereau 1998) et semblerait non spécifique d'espèces (Zurawski et de Vries 1994). L'IL-13 murine et l'IL-13 humaine présentent une homologie de 58% dans la séquence en acides aminés de leur région codante et exercent pratiquement les mêmes effets sur les différents types cellulaires (Zurawski et de Vries 1994) (Tableau II). L'IL-13 possède de nombreuses similarités fonctionnelles avec une autre cytokine de la même famille, soit l'IL-4. Ces nombreuses similitudes peuvent s'expliquer par le fait que ces deux cytokines partagent une sous-unité commune de leur récepteur (Chomarat et Banchereau 1998). En effet, l'IL-13 possède deux types de récepteurs dont le premier, IL-13R α 1, est constitué de la chaîne α du récepteur de l'IL-4 et d'une des chaînes α (α 1) du récepteur de l'IL-13, menant ainsi à une même signalisation suite à la liaison de l'IL-4 ou de l'IL-13 à ce récepteur (Skinnider, Kapp et al. 2001). La liaison des cytokines à ce récepteur a la capacité d'initier une signalisation via plusieurs voies de signalisation, notamment la voie JAK/STAT et PI₃-kinase (Chomarat et Banchereau 1998; Skinnider, Kapp et al. 2001). Le deuxième récepteur de l'IL-13, constitué de la chaîne IL-13R α 2, présente une plus grande affinité pour l'IL-13 que le récepteur constitué de la chaîne IL-13R α 1 et serait un récepteur leurre. Il ne conduirait à aucune signalisation puisqu'il ne possède pas de motif pour la voie JAK/STAT (Wynn 2003). De plus, contrairement au récepteur composé de la chaîne α 1, ce récepteur a été retrouvé sous forme soluble dans l'urine et le sérum de souris (Wynn 2003). De nombreuses études ont démontré que le récepteur constitué de la chaîne IL-13R α 2 était exprimé chez plusieurs types de cellules tumorales humaines (gliomes, carcinomes des ovaires, carcinomes rénaux) (Smyth, Taniguchi et al. 2000) et cellules de culture primaire telles que des fibroblastes alors que son expression n'est pas ou très peu détectable chez les cellules immunitaires, endothéliales et certains autres types de cancer (Murata, Husain et al. 1998). Il semblerait que l'ajout du gène de ce dernier à l'intérieur de cellules de cancer du sein humain et de cancer du pancréas

réduirait la tumorigénicité de ces dernières (Kawakami, Kawakami et al. 2001). Les récepteurs de l'IL-13, tout comme ceux de l'IL-4, sont exprimés sur une grande variété de cellules telles que cellules endothéliales, fibroblastes, cellules dendritiques, monocytes/macrophages, cellules B et neutrophiles. La différence majeure existant entre les récepteurs de ces deux cytokines réside dans le fait que les cellules T n'expriment pas le récepteur fonctionnel de l'IL-13 alors qu'elles expriment celui de l'IL-4 (Zurawski et de Vries 1994). Le patron d'expression du récepteur fonctionnel de l'IL-13 est donc plus restreint que celui de l'IL-4.

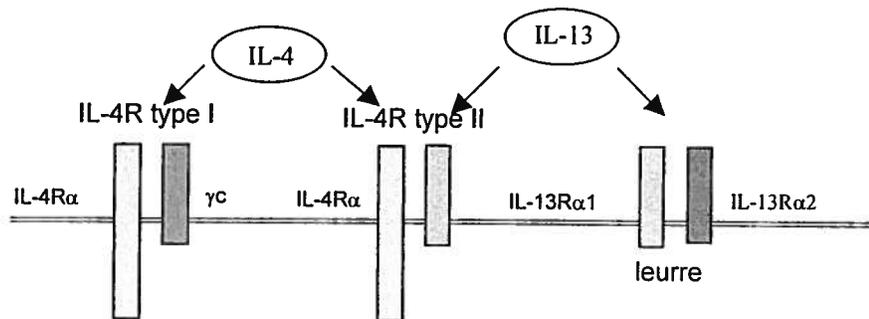


FIGURE 2- Récepteurs de l'interleukine-13 et de l'interleukine-4

(Inspiré de *Skinniker, Leukemia and Lymphoma, 2002*)

1.3.1 Les propriétés de l'IL-13

L'IL-13 est surtout connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, bien qu'elle possède certaines propriétés pro-inflammatoires (Opal et DePalo 2000). Ces effets physiologiques vont ainsi dépendre du moment du relargage de la cytokine, du milieu dans lequel elle doit agir, de la présence d'agents compétitifs ou synergiques, ainsi que de la densité des récepteurs présents à la surface cellulaire et le degré de réactivité des tissus face à la cytokine (Opal et DePalo 2000). L'IL-13 exerce son pouvoir anti-

inflammatoire principalement au niveau du macrophage, qui joue un rôle prépondérant lors du processus inflammatoire. Des études ont démontré que l'IL-13 avait la capacité d'inhiber, chez le macrophage, la voie de signalisation du TNF α /IL-1 β , deux médiateurs clés de l'inflammation et ce, en bloquant la transcription de ces gènes (Doherty, Kastelein et al. 1993). Chez le macrophage, de même que dans d'autres types cellulaires, l'IL-13 inhibe également la transcription de plusieurs autres gènes, dont ceux codant pour IL-6, IL-8, MIP-1, IL-1R α , les MMPs, et ceux responsables de la sécrétion de NO (Doherty, Kastelein et al. 1993). Les MMPs peuvent cliver la forme pro-IL-1 β (intracellulaire) et la forme pro-TNF α (membranaire), dont la forme soluble est reconnue comme étant un puissant médiateur pro-inflammatoire. De ce fait, l'IL-13 est considérée comme un régulateur négatif des voies d'activation reliées à l'IL-1 β et au TNF α .

L'IL-13 est impliquée dans plusieurs autres processus biologiques. Ainsi, elle est responsable de la régulation de l'élimination de parasites présents dans le tractus gastro-intestinal, de l'hypersensibilité des voies respiratoires, de l'inflammation allergique (éosinophilie, production d'anticorps IgE), de la susceptibilité aux parasites intracellulaires ainsi qu'à la fibrose et la reconstruction tissulaire (Wynn 2003). Quant aux propriétés pro-inflammatoires exercées par l'IL-13, elles impliquent surtout les cellules B, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales. Ainsi, des études ont démontré que l'IL-13 augmentait l'expression de plusieurs molécules d'adhésion exprimées à la surface cellulaire, dont VCAM-1 (CD106), une molécule d'adhésion exprimée sur l'endothélium vasculaire et responsable du recrutement leucocytaire lors de réactions inflammatoires (Chomarat et Banchereau 1998). L'IL-13 augmenterait aussi l'expression des molécules de CMH-II à la surface des cellules B, favorisant ainsi la présentation d'antigènes (McKenzie, Culpepper et al. 1993). Chez l'humain, elle favoriserait également la production d'anticorps par les cellules B pouvant favoriser l'ADCC sur les cellules tumorales (Lai et Mosmann 1999). L'IL-13 aurait, de plus, la capacité d'empêcher le blocage de la différenciation des cellules dendritiques généralement induite par les cellules tumorales (Menetrier-Caux, Thomachot et al. 2001), favorisant ainsi la maturation des cellules dendritiques du sang chez l'humain (Romani, Reider et al. 1996). Dans la plupart des tissus, les cellules dendritiques se trouvent à

l'état immature et sont donc inaptes à ingérer des antigènes. En présence d'un stimulus (ex : médiateurs inflammatoires), les cellules dendritiques immatures peuvent capter les antigènes puis amorcer une maturation, acquérant ainsi la capacité à migrer, notamment vers la rate et les ganglions lymphatiques où elles vont terminer leur maturation, présenter les antigènes captés et activer des lymphocytes T et B (Banchereau et Steinman 1998).

Malgré les capacités de l'IL-13 à stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale, plusieurs indications semblent favoriser l'hypothèse que cette cytokine exercerait, du moins dans certains types de cancers, un effet anti-tumoral via ses propriétés anti-inflammatoires (Coussens et Werb, 2002). Dans certains cas, cependant, l'IL-13 peut promouvoir la croissance de certaines cellules tumorales. Cet effet semble varier selon le type de cellules tumorales. Par exemple, plusieurs lignées de cellules tumorales ont vu leur croissance inhibée par l'IL-13; c'est le cas des cellules de carcinome rénal et du cancer du sein (Serve, Oelmann et al. 1996). Dans le cas du lymphome Hodgkinien, caractérisé par la présence de grosses cellules à noyaux multiples multilobés issues principalement de cellules B (cellules Reed-Sternberg), plusieurs lignées surexpriment l'IL-13 et son récepteur. De ce fait, l'IL-13 entraînerait, via un mécanisme autocrine, la prolifération de celles-ci (Skinnider, Kapp et al. 2002).

TABLEAU II: Activités biologiques des interleukines -4 et -13 humaines et murines.

Types cellulaires	IL-4 murine	IL-13 murine	IL-4 humaine	IL-13 humaine
Macrophages / monocytes				
- CMH classe II	↑	↑	↑	↑
- Fcy receptors	↓	↓	↓	↓
- CD23	↑	-	↑	↑
- Cytokines pro-inflammatoires	↓	↓	↓	↓
- Chimiokines (IL-8, MIP-1)	↓	↓	↓	↓
- IL-1Ra	↓	↓	↑	↑
- Fonction APC	-	-	↑	↑
- Activité ADCC	NT*	NT*	↓	↓
- Production de NO	↓	↓	NT*	NT*
Cellules B				
- CMH classe II, CD23, CD71, CD72	↑	-	↑	↑
- Prolifération	+	-	+	+
- Différenciation (changement Ig)	↑	-	↑	↑
Cellules T				
- Prolifération	+	-	+	-
Cellules endothéliales				
- Molécules d'adhésion (VCAM-1)	↑	↑	↑	↑
Cellules dendritiques				
- Différenciation / Maturation	+	+	+	+

*NT signifie « non-testé »

Références: *Banchereau et Chomarat, Intern.Rev.Immunol.1997; Skinnider et al., Leukemia and Lymphoma, 2002; Zurawski et de Vries, Immunology Today, 1994*

1.3.2 Utilisation d'un modèle expérimental de lymphome murin pour étudier l'effet de l'IL-13 sur la croissance tumorale

Des lignées de lymphomes T peuvent être établies à partir de lymphomes thymiques induits par irradiation aux rayons X fractionnés chez de jeunes souris C57BL/6 (Lieberman, Declève et al. 1979). Notre laboratoire a pu ainsi générer plusieurs lignées de lymphomes T exprimant différents niveaux du complexe CD3/αβTcR à leur surface

ainsi que des molécules accessoires CD4 et CD8. Ces lignées ont la capacité de générer des lymphomes thymiques suite à leur inoculation intra-thymique (Aoudjit, Esteve et al. 1997). Elles ont également la capacité, lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse chez les souris syngéniques, d'induire la formation de tumeurs lymphoïdes dans les organes secondaires (rate, foie, reins, ganglions, ovaires, testicules, etc.), mais non dans le thymus. Elles peuvent également former des tumeurs semi-solides avec formation de métastases lorsqu'injectées par voie sous-cutanée dans les souris syngéniques adultes. L'utilisation de ce modèle expérimental, par lequel des lignées de lymphomes peuvent être générées à partir de souris C57BL/6 génétiquement modifiées ou dans lesquelles des gènes peuvent être insérés ou délétés, permet ainsi de déterminer l'influence de paramètres spécifiques sur la croissance, la dissémination et le processus métastatique du lymphome dans un modèle immunocompétent ou génétiquement modifié.

Le lymphome T, modèle à l'étude dans notre laboratoire, se caractérise par son caractère métastatique. La métastase, étant souvent la cause de mortalité par suite d'un cancer, il importe de trouver des traitements afin de l'inhiber. Il a été rapporté que l'inflammation favoriserait la croissance tumorale via une production contrôlée de médiateurs pro-inflammatoires et de MMPs par les cellules du système immunitaire. Nous postulons que la présence de cytokines anti-inflammatoires telle que l'IL-13 dans l'environnement péri-tumoral pourrait entraîner une diminution de croissance de la tumeur. A cet effet, notre laboratoire a récemment initié une série d'études visant à déterminer le rôle de l'IL-13 dans le développement du lymphome T. Nos résultats ont démontré que l'expression constitutive de cette cytokine dans des transfectants stables de lymphomes T supprime la croissance de lymphomes thymiques induits expérimentalement par l'injection i.t. de cellules de lymphomes T (Tableau III, Robledo et al. *manuscrit en préparation*). De même, nous avons démontré que l'IL-13 supprime la croissance de tumeurs lymphoïdes sous-cutanées. Les mécanismes par lesquels l'IL-13 supprime cette croissance de même que la spécificité de ses effets sur la croissance tumorale demeurent toutefois inconnus. L'objectif de ce travail vise donc à caractériser les effets de l'IL-13 sur la croissance tumorale à partir de nos modèles expérimentaux. Dans un premier temps, nous avons procédé à des analyses comparatives *in vitro* et *in*

in vivo entre les cellules de lymphomes T exprimant l'IL-13 et des cellules témoins transfectées avec le vecteur parental afin de déterminer l'effet de l'IL-13 sur la réponse lymphocytaire primaire. Pour ce faire, des splénocytes de souris ayant reçu les cellules de lymphome T exprimant ou non l'IL-13 plusieurs mois auparavant ont été isolés et placés en co-culture avec des cellules tumorales afin de déterminer si l'IL-13 pouvait moduler l'index prolifératif des lymphocytes de la rate. Dans un deuxième temps, nous avons exploré la possibilité que l'IL-13 sécrétée par les cellules tumorales pouvait moduler la migration leucocytaire. Pour ce faire, nous avons procédé à des expérimentations avec un modèle de poche d'air *in vivo* nous permettant de quantifier et d'identifier, par cytométrie en flux, les différentes populations leucocytaires migrant au niveau de la poche d'air injectée de cellules tumorales. Cette approche visait spécifiquement à déterminer si l'IL-13 avait la capacité à recruter une ou plusieurs sous-populations leucocytaires pouvant expliquer son effet protecteur contre le développement tumoral. En effet, puisque les cellules de lymphome T ne possèdent pas de récepteur fonctionnel pour l'IL-13, comme nous l'avons démontré dans ce travail, les effets observés se doivent d'être indirects. Étant donné que des études ont démontré que l'IL-13 diminue la production de certains médiateurs pro inflammatoires et de MMPs, notamment en inhibant la voie de signalisation IL-1/TNF α , nous avons ensuite étudié si l'IL-13 pouvait moduler l'expression de gènes cibles connus comme étant régulés par l'IL-13 (ex : différentes MMPs, IL-1, TNF α). De même, nous avons utilisé une approche génomique afin d'analyser l'influence de l'IL-13 sur la modulation de l'expression génique *in vivo*. Finalement, nous avons procédé à des études *in vivo* ayant pour but de déterminer si l'effet de l'IL-13 pouvait outrepasser le caractère agressif de cellules hautement métastatiques, en utilisant spécifiquement un variant agressif du lymphome T (S19) et un modèle murin de cancer du sein (4T1). Pour ce faire, nous avons généré une série de transfectants stables utilisant les lignées de cellules hautement métastatiques S19 et 4T1 et tester *in vivo* la capacité de l'IL-13 à inhiber leur dissémination/croissance. Finalement, il nous semblait primordial de développer un moyen de traiter des tumeurs déjà établies, d'où la volonté de construire un vecteur viral exprimant l'IL-13.

Tableau III : Effet de l'expression de l'IL-13 sur la croissance de lymphomes T
(Robledo et al., manuscrit en préparation)

Expérience	Voie	Dose	Cellules Témoins		Clone IL-13#25		Clone IL-13#13	
			Mortalité des souris	Temps moyen de survie (jours)	Mortalité des souris	Temps moyen de survie (jours)	Mortalité	Temps moyen de survie (jours)
# 1	i.t.	10 ⁴	7/7	35.0 ± 3.1	0/7	> 92.0	N.T.	N.T.
# 2	i.t.	5x10 ³	5/10	39.2 ± 7.7	0/10	> 60.0	N.T.	N.T.
# 3	s.c.	10 ⁷	12/24	25.0 ± 8.6	0/12	> 60.0	0/12	> 60.0

2.0 Matériel et méthodes

2.1 Lignées cellulaires et réactifs

La lignée de lymphome T 267 a été établie à partir d'un lymphome thymique radio-induit chez la souris C57BL/6 (H-2^b) (Lieberman, Decleve et al. 1979). La lignée 267 est peu agressive, étant incapable de former des tumeurs suite à son injection par voie intraveineuse à des souris ICAM-1-déficientes, lesquelles sont résistantes au développement de tumeurs lymphoïdes (Aoudjit, Potworowski et al. 1998). La lignée de lymphome 164T2S19 (S19) est une lignée de cellules tumorales agressives dérivée après 19 passages *in vivo* à partir d'un lymphome primaire 164T2 généré par voie intraveineuse et dont les cellules tumorales ont été récupérées à partir de la rate. Contrairement à la lignée parentale 164T2, le caractère agressif de ce lymphome le rend capable de former des tumeurs chez les souris ICAM-1 déficientes (Lalancette, Aoudjit et al. 2000). Les cellules 4T1 constituent des cellules de carcinome mammaire provenant de souris BALB/c (H-2^d). Les cellules CH27 constituent des cellules de lymphome B murin et les cellules b-End-3, des cellules endothéliales murines. Les cellules 4T1, COS-7, B16, CH27 et b-End-3 proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Les cellules 293 sont des cellules de rein embryonnaire humain transformées qui nous ont été gracieusement fournies par le laboratoire du Dr Bernard Massie (Conseil de Recherche National du Canada, Montréal, Qc) et les cellules COS-7 sont des cellules de rein transformées provenant du singe vert d'Afrique. Des transfectants stables de cellules de lymphome 267 et S19, de cellules de mélanome B16F10 ont été générés à partir du vecteur S α sans ADN complémentaire (ADNc) ou contenant l'ADNc codant pour le gène de l'IL-13 murine (GenBank NM008355) selon la méthode de Brown et al. (Brown, Zurawski et al. 1989). Ces transfectants ont été générés par le Dr Olivier Robledo et ont été identifiés comme suit : 267-S α 24 (clone de cellules 267 utilisé comme témoin suite à une transfection avec le vecteur S α) et 267-IL-13#25 (clone exprimant le gène codant pour l'IL-13 murine), S19-S α #A et S19-IL-13#5, B16-S α #1 et S α #2 et B16-IL-13#4 et IL-13#7. Des transfectants stables de cellules de carcinome mammaire 4T1 ont également été générés à partir des mêmes

vecteurs et ces derniers ont été identifiés 4T1-Sr α #5, 4T1-IL-13#38 et 4T1-IL-13#45. Les lignées cellulaires 267, S19, B16, COS-7, CH27, b-End-3 ainsi que des splénocytes murins frais ont été cultivés en présence de milieu RPMI-1640 (Gibco-BRL, Grand Island, N.Y, E-U) contenant 2mM de glutamine (Gibco-BRL), 10 mM de tampon HEPES (Gibco-BRL), les antibiotiques pénicilline et streptomycine (Gibco-BRL), 2-mercaptoéthanol et supplémenté de 10% de SVF (Gibco-BRL) inactivé. Les cellules 4T1 ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 contenant 2 mM de glutamine, 10 mM de tampon HEPES, les antibiotiques pénicilline et streptomycine, 80 mg/ml de bicarbonate de sodium (Gibco-BRL), 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco-BRL) et supplémenté de 10 % de SVF inactivé. Les cellules 293, pour leur part, ont été maintenues dans du milieu DMEM (Gibco-BRL) contenant les mêmes quantités de glutamine, antibiotiques, HEPES, 2-mercaptoéthanol et de SVF inactivé que les milieux précédemment décrits. Les cultures ont été incubées dans une atmosphère humide à une température de 37° C et à 5% de CO₂.

2.2 Animaux

Les souris C57BL/6 (Thy1.2; CD90.2) et les souris C57BL/Kathy (Thy1.1 ; CD90.1) ont été obtenues à partir de nos élevages sous des conditions stériles. Les souris BALB/c femelles ont été obtenues de chez Charles River (St-Constant, Qc) et ont été utilisées lors des expériences de croissance tumorale avec les cellules 4T1. Des souris C57BL/6 et C57BL/Kathy âgées de 4 à 6 semaines ont servi pour les expériences nécessitant des injections intra-thymiques et des souris C57BL/Kathy âgées entre 6 à 10 semaines ont été utilisées pour les expériences de poche d'air. Les souris utilisées lors des injections intra-thymiques ont subi une anesthésie générale par l'injection intra-péritonéale d'une solution de 0,1% xylazine (Bayer Inc., Ont.) et 1,0% kétamine (Ayerst-Veterinary Laboratories, Ont.) avant l'intervention. Les expériences nécessitant les cellules de mélanome B16 ont été réalisées par voie sous-cutanée avec des souris C57BL/6 et C57BL/Kathy mâles et femelles alors que des souris C57BL/6 mâles uniquement ont servi aux expériences avec les cellules 267-Sr α #24 et 267-IL-13#25 injectées par voie intraveineuse. Lors des injections intra-thymiques, les cellules ont été injectées en

utilisant un volume de 10 µl/lobe thymique ; de 200 µl lors des injections intraveineuses et sous-cutanées ; et de 100 µl lors des injections sous-cutanées au niveau de la glande mammaire.

2.3 Test de prolifération cellulaire

2.3.1 Isolement de splénocytes murins

Des souris C57BL/6 ayant été injectées par voie sous-cutanée avec des cellules 267-Srα #24 ou 267-IL-13#25 ont été sacrifiées un à quatre mois après l'injection de cellules tumorales et leur rate prélevée dans des conditions stériles. Une suspension cellulaire mono-dispersée a été préparée et lavée par centrifugation avec du PBS (Gibco-BRL). Des culots cellulaires ont ensuite été resuspendus dans 1 ml de PBS stérile puis filtrés sur laine de nylon stérile. Les globules rouges ont été éliminés par les méthodes traditionnelles faisant appel à un tampon hypotonique (0,1 mM EDTA, 300 mM NH₄Cl et 20 mM KHCO₃).

2.3.2 Mise en co-culture de splénocytes

a) Co-culture en présence de cellules tumorales

Les splénocytes isolés ont été mis en culture à raison de 5×10^5 , 10^5 et 5×10^4 cellules par puit dans un volume de 50 µl de milieu complet dans un plateau de 96 puits (Costar). Des cellules tumorales (267 ou B16) préalablement irradiées à 6000 rads par un appareil *Gamma cell 220* (Nordion International, Ont.) ont été ajoutées aux splénocytes à raison de 10^4 cellules par puit dans un volume de 50 µl de milieu de culture complet. Un µCi de thymidine tritiée (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Qc) a été ajouté à chaque puit après une co-culture de 24h et les plateaux ont été incubés pour une autre période de 24 h afin de mesurer la prolifération cellulaire. La mesure de la prolifération s'est effectuée avec l'aide des appareils *Tomtec MACH III* (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, E-U) et *TRILUX 1450 Microbeta* (Wallac).

b) Co-culture en *Trans-well*

Des splénocytes provenant de souris C57BL/6 ont été recueillis, isolés, et mis en culture dans des plateaux de 24 puits dont les 12 puits centraux étaient des «trans-well» (Costar). Des aliquots de 10^6 splénocytes ont été placés dans 0,6 ml de milieu de culture complet et mis en contact avec 10^5 cellules tumorales (267 ou B16) préalablement irradiées à 6000 rads et resuspendues dans un volume de 0,1 ml de milieu complet. Dans les puits en «trans-well», les splénocytes ont été placés dans le compartiment du bas à raison de 10^6 cellules dans un volume de 0,6 ml de milieu de culture complet et les cellules tumorales (267 ou B16) préalablement irradiées ont été déposées dans le compartiment supérieur à raison de 10^5 cellules dans 0,1 ml de milieu. Les co-cultures ont été incubées durant une période de 48 heures et l'évaluation de la prolifération cellulaire des splénocytes a été réalisée de la même façon que les tests de prolifération décrits précédemment, à l'exception que 7 μ Ci de thymidine tritiée ont été ajoutés à chaque puit afin de mesurer la prolifération cellulaire. De plus, la prolifération des splénocytes a été mesurée chez des splénocytes non-activés et activés par l'ajout de Con A (10 μ g/ml) au milieu de culture.

c) Co-culture en présence de surnageants de cellules tumorales

Le test de prolifération de splénocytes en présence de surnageants de cellules tumorales (267 ou B16) préalablement irradiées a été réalisé tel que précédemment décrit à l'exception que 50 μ l de surnageant ont été ajoutés aux splénocytes à la place des cellules tumorales. La prolifération a été mesurée chez des splénocytes non-activés et activés par la Con A (10 μ g/ml). Les surnageants ont été préparés à partir de 10^4 cellules tumorales (B16 ou 267) irradiées à 6000 rads et placés dans 100 μ l de milieu complet par puit pendant 48 heures dans un plateau de 96 puits.

d) Co-culture en présence d'anticorps

Le test de prolifération de splénocytes en présence des anticorps α -CD3 ϵ 145 2C.11 et α -MAR18.5 (contrôle isotypique) a été réalisé tel que décrit ci-haut. Les splénocytes ont été placés dans des puits de plateaux de 96 puits (Costar) préalablement recouverts d'un anticorps témoin (MAR18.5) ou par un anticorps α -CD3 ϵ (clone 145-2C11). Les deux

anticorps ont été dilués avec du PBS stérile à une concentration de 10 µg/ml, placés dans les puits et incubés toute la nuit à 4°C.

2.4 Modèle de poche d'air

Aux jours 0 et 3, des souris C57BL/Kathy (Thy1.1) ont été injectées au niveau du dos avec 3 ml d'air stérile. Les souris ont été anesthésiées avant chaque injection par l'inhalation d'isoflurane (Abbott Laboratories, Qc). Au jour 6, ces mêmes souris ont été injectées i.p.a. avec 10^7 cellules lymphomateuses 267-Srα#24 ou 267-IL-13#25 resuspendues dans un volume d'un ml de PBS. Vingt-quatre heures post-injection, les souris ont été sacrifiées et le contenu cellulaire de la poche d'air recueilli à l'aide d'une solution de PBS-EDTA (10mM; pH 7,4). Un premier lavage était effectué avec 1 ml de la solution PBS-EDTA et deux autres en utilisant 2 ml de la même solution. Les tubes étaient centrifugés afin de recueillir les lavages cellulaires, alors que le surnageant du premier lavage était conservé à -80°C pour des analyses ultérieures. Les cellules recueillies ont été resuspendues dans 1 ml de solution PBA (PBS + 0,01% NaN₃ + 1% BSA). Un décompte cellulaire a été réalisé et les cellules utilisées pour des analyses de cytométrie en flux (voir section 2.4.1) et de RT-PCR (voir section 2.4.2).

2.4.1 Analyses de cytométrie en flux

Les cellules recueillies suite aux lavages de la poche d'air ont été resuspendues dans du PBA, centrifugées et réparties à une concentration de 6×10^5 cellules par puit dans un plateau de 96 puits. Les cellules ont d'abord été incubées pendant 15 minutes à 4°C après l'ajout de 30 µl d'IgGs humains (50 µg/ml) afin de bloquer les sites non-spécifiques. Par la suite, 20 µl d'anticorps primaire conjugué ont été ajoutés aux IgGs. Les anticorps suivants ont été utilisés : α-Mac-1 (α_Mβ₂, clone M1/70); α-NK1.1 (PK136); α-Thy1.1 et α-Thy1.2. Sauf pour l'anticorps spécifique pour Thy1.1 marqué à la biotine, tous les anticorps utilisés ont été marqués à la fluorescéine. Suite à l'ajout de ces anticorps primaires, les cellules ont été incubées 20 minutes à 4°C, puis lavées avec 150 µl de PBA. Dans le cas des échantillons contenant l'anticorps biotinylé, une

deuxième incubation en présence d'un conjugué streptavidine-phycoérythrine a été réalisée. Finalement, les cellules ont été lavées avec du PBA, centrifugées puis resuspendues dans 150 µl de PBA et placées dans 500 µl de PBS-NaN₃ déjà présents dans les tubes à cytométrie. Les tubes ont ensuite été analysés par cytométrie en flux avec un cytomètre Coulter XL (Coulter, Hialeah, FL).

2.4.2 Isolement d'ARN et RT-PCR semi-quantitatif

L'ARN cellulaire total a été isolé des cellules de lymphome, de mélanome, de carcinome mammaire, des cellules recueillies à l'intérieur de la poche d'air murine, de la peau et du thymus à partir de la méthode du TRIZOL[®] (Life Technologies Inc., Ont.) selon les recommandations du manufacturier. Le brin d'ADNc a été préparé à partir de 2 µg d'ARN cellulaire total avec la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen) pendant 1 h à 42°C, ou Omniscript (Gibco-BRL) pendant 1 h à 37°C. Des réactions de PCR ont par la suite été effectuées à partir des ADNc en utilisant des amorces spécifiques pour les gènes codant pour MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-17, TNF α , IL-13R α 1, TGF β 1, GAPDH et β -actine (Tableau IV). Les réactions de PCR ont été réalisées avec l'aide d'un appareil à PCR (MJ Research, Watertown, MA) selon les conditions suivantes : 94°C pour 3 minutes, 94° C pour 30 secondes, 60°C (MMP-9, IL-13R α 1, TNF α , β -actine) ou 56°C (TGF β 1), puis 72°C pour 2 minutes pour 35 cycles et finalement, 72°C pour 10 minutes. L'expression des gènes étudiés a été visualisée suite à une électrophorèse sur gel d'agarose (Roche Diagnosis Corporation, Indianapolis, IN) et une exposition aux rayons UV par l'appareil IS 1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, E-U). La présence de bromure d'éthidium (Invitrogen, Scotland, N-Z) dans le gel a permis la visualisation de l'expression génique.

TABLEAU IV- Description des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification PCR des gènes étudiés

Nom du gène	GENBANK	Amorce	Séquence des amorces (5' → 3')	Position sur le gène	Taille de l'amplicon (pb)	Température d'hybridation (°C)
GAPDH		Sens	CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT	58-81 ^a	307	60
		Anti-sens	AGCCTTCTTCCATGGTGAAGAC	364-341		
IL-13	NM_008355	Sens	CTGGCTCTGTAGAGGCTTCATGGGCTCTGGGTG	64-84	430	60
		Anti-sens	GGTCTCGGATCCTCCTCATTAGAAGGGCCGTGGCG	448-472		
IL-13R α 1	NM_133990	Sens	CCTGATCCTCCACATATAAACATCTTCTC	734-764	602	60
		Anti-sens	TCAAGGAGCTGCTTCTTCAGGTTTCTAT	1306-1336		
IL-13/Not-1	NM_008355	Sens	CTGGCTCTGATAAGAAATGCGGCCGCTAAACTATATG GCGCTCTGGGTG	64-84	430	60
IL-13 <i>EcoRV</i>	NM_008355	Anti-sens	GGTCTCGATATCTCCTCATTAGAAGGGCCGTGGCG	448-472		
MMP-3	NM_296167	Sens	ATTGCATGACAGTGCAAGGG	81-100	673	60
		Anti-sens	TGGAGGACTTGTAGACTGGG	735-754		
MMP-9	NM_0135991	sens	CCATGAGTCCCCIGGCAG	3-22	355	58-60
		Anti-sens	AGTATGGATGTTATGATG	363-383		
MMP-10	Y13185	Sens	AGGGACCAACTTATTCCTGG	665-684	780	60
		Anti-sens	CAGTATGTGTGCACCGTCC	1426-1445		
MMP-17	NM_8052271	Sens	CTGTCCAAAGCGATTACTGC	312-331	749	60
		Anti-sens	AGTGTAGACCGATTGTTGG	1042-1061		
TNF α	NM_013693	Sens	ATGAGCACAGAAAAGCATGATCCCG		692	60
		Anti-sens	CCAAAGTAGACCCTGCCCGGACTC			
β -actine	NM_4985	Sens	CATGGATGACGATATCGCTGCCG	80-102	602	60
		Anti-sens	GCTGTGCCACCGTCGGTCAGGATC	653-677		
TGF β 1	NM_011577	Sens	ACCCACITTTGGATCTCAGAGAGCG	623-648	750	56
		Anti-sens	TCCACATGTTGCTCCACACT	1333-1353		

2.4.3 Zymographie

La mesure de la sécrétion de MMP-2 et MMP-9 (gélatinase A et B respectivement), au niveau de la poche d'air suite à l'inoculation des cellules de lymphome exprimant le gène de l'IL-13, a été réalisée par zymographie sur gélatine, tel que publié (Aoudjit, Esteve et al. 1997). Des aliquots de 15 µl de surnageants, resuspendus à part égale avec du tampon à échantillon Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Ont.), ont été déposés sur un gel constitué de 8 % SDS-polyacrylamide et de 0.5 mg/ml de gélatine (Sigma-Aldrich) pour une migration à 45 V pendant 18h. Le gel a ensuite été lavé dans un tampon renaturant contenant 500 mM Tris pH 7.5, 50 mM de CaCl₂, 0,2% de NaN₃ et 0.4% Triton X-100, puis incubé 16 h à 37°C dans un tampon de digestion (500 mM Tris pH 7.5, 50 mM de CaCl₂, 0,2% de NaN₃ et 1% de Triton X-100). La présence de MMP-2 et MMP-9 a été visualisée par coloration/décoloration au bleu de Coomassie en utilisant une solution de méthanol-éthanol-acide acétique pendant 30 minutes avec agitation et ce, à deux reprises pour permettre la visualisation de bandes blanches sur fond bleu typiques de la présence d'activité gélatinolytique.

2.5 Matrices d'ADN complémentaires

2.5.1 Extraction de l'ARN de thymus

Des souris C57BL/6 âgées de 5-6 semaines ont été anesthésiées avec une injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine-xylazine (voir section 2.2) puis injectées par voie intra-thymique avec une solution témoin de PBS ou contenant différentes quantités d'IL-13 recombinante (R&D Systems, Minneapolis, E-U), soit 0,1 ng; 1 ng ou 10 ng/lobe et ce, dans un volume de 10 µl/lobe (2 souris/dose). Soixante-douze heures post-injection, l'ARN cellulaire total a été extrait à partir d'un homogénat du thymus entier par la méthode modifiée du TRIZOL[®]. Les thymus ont été homogénéisés dans un ml de TRIZOL puis incubés 5 minutes à température ambiante. Par la suite, 250 µl de chloroforme (Sigma) ont été ajoutés à l'homogénat afin de précipiter les protéines, puis le tout a été agité vigoureusement avant d'être incubé 10 minutes à température

ambiante. Suite à l'incubation, le tout fut centrifugé puis la phase aqueuse transférée dans un tube propre et stérile. Une quantité d'éthanol égale à 0,7 fois le volume de la phase recueilli a été ajoutée à cette dernière afin de précipiter l'ARN. Celui-ci a ensuite été dosé par spectrophotométrie à une longueur d'ondes de 260 nm. Les échantillons ont été regroupés puis traités à la DNase I à l'aide de la trousse *AtlasTM Pure total RNA Labeling System* de Clontech (Clontech-BD Biosciences, Palo Alto, CA) selon les recommandations du fabricant. Les volumes ont été ajustés pour un traitement effectué à partir de 250 µl d'ARN. L'ARN a été resuspendu dans de l'eau sans RNase avant d'être redosé, tel que décrit précédemment. L'ARN a été aliquoté en 3 parties : 45 µg/45 µl d'eau sans RNase pour les matrices d'ADNc; 0,5 µg d'ARN/type d'ARN pour le gel d'agarose-formaldéhyde, l'ARN restant ayant été conservé à -80°C pour les analyses au niveau des ARNm par RT-PCR.

2.5.2 Vérification de l'intégrité des ARNs de thymus

Avant de procéder à l'analyse des transcriptomes à l'aide de matrices d'ADNc, l'intégrité des ARNs a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose-formaldéhyde. Ce gel d'agarose 1% (p/v) a été préparé dans un tampon à pH neutre contenant 20 mM d'acide 3-N-[morpholino]propanesulfonique (MOPS), 5 mM d'acétate de sodium et 1 mM d'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA). Le mélange a été bouilli 2 minutes puis refroidi à 65-70°C. Ensuite, 0,72 ml d'une solution de formaldéhyde à 37% (v/v) et 1,8 µl d'une solution concentrée de bromure d'éthidium (10 mg/ml) ont été ajoutés au mélange sous une hotte chimique. Le mélange a été coulé dans un portoir, préalablement lavé avec RNaseZap[®], un inhibiteur de RNases (Ambion) et laissé à la température de la pièce jusqu'à sa solidification. Le gel a ensuite été déposé dans un appareil à électrophorèse contenant du tampon de migration (20 mM de MOPS, 5 mM d'acétate de sodium, 1 mM d'EDTA, 0,25 mM de formaldéhyde). 0,5 µg d'ARN a été dilué avec de l'eau sans RNase jusqu'à un volume de 4 µl et 12 µl de tampon échantillon «NorthernMaxTM formaldehyde Load Dye» (Ambion). Les échantillons ont été chauffés à 65°C pendant 15 minutes, centrifugés à 2000x g et refroidis sur glace avant d'être déposés sur le gel. Le gel a été soumis à une migration à 70 V jusqu'à ce que les

échantillons aient migré jusqu'à la moitié du gel. Les bandes d'ARN ribosomal murin ont ensuite été visualisées en utilisant l'appareil IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, Ca, E-U).

2.5.3 Hybridation aux membranes

Les ARNm ont été isolés de l'ARN total à l'aide d'oligo (dT) biotinylés et de billes magnétiques couplées à la streptavidine. Ces ARNm ont été utilisés pour la synthèse de brins d'ADNc radioactifs via l'incorporation de [α - 33 P] dATP (Amersham Pharmacia, QC) en suivant les instructions de la trousse *Atlas^{MC} 1.2 cDNA array* (BD Biosciences) (Fig. 3). Les sondes radioactives ainsi synthétisées ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne d'extraction *Nucleospin* (BD Biosciences) et dosées à l'aide d'un compteur à scintillation LS 1701 (Beckman). Les sondes ont été ajustées de façon à obtenir le même nombre de cpm pour chacune des sondes. Un aliquot de 5 μ l d'ADN Cot-1 (Invitrogen) a été ajouté à chaque sonde afin de limiter les bruits de fond et le tout fut ajouté à deux ml de solution d'hybridation *ExpressHyb* (BD Biosciences). Ce mélange sondes/solution d'hybridation a été versé dans les bouteilles d'hybridation contenant les matrices d'ADNc et la solution d'hybridation contenant 0,5 mg/ml d'ADN extrait de sperme de saumon (Sigma Aldrich) utilisée pour bloquer les sites d'hybridation non-spécifiques. Les membranes ayant servies aux analyses des transcriptomes sont faites de nylon et recouvertes d'ADNc spécifiques de 1176 gènes murins. Chacune des membranes est divisée en six quadrants (A à F); chaque quadrant regroupant des gènes ayant des propriétés similaires. Les membranes et les sondes ont été incubées durant toute la nuit à 68°C dans un four à hybridation sous une rotation constante. Le lendemain, une série de lavages successifs à l'aide des tampons de lavage recommandés par le manufacturier ont été effectués aux 30 minutes à 68°C dans un four à hybridation sous agitation constante. Finalement, les membranes ont été asséchées partiellement, placées sur un papier-filtre et emballées avec une pellicule plastique puis exposées à un écran de phosphore pendant trois semaines. La radioactivité des membranes a alors été numérisée (grandeur des pixels de 100 microns, voltage PMT 688 V, correction du bruit de fond locale) par un PhosphorImager SI (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA) et l'intensité des signaux mesurée par le logiciel ImageQuant

(version 5.0; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Le signal obtenu sur les membranes hybridées avec les sondes provenant de thymus injectés avec différentes doses d'IL-13 recombinante a été normalisé à l'aide de 9 gènes présents sur les membranes dont le niveau d'expression est connu comme étant peu variable sous diverses conditions.

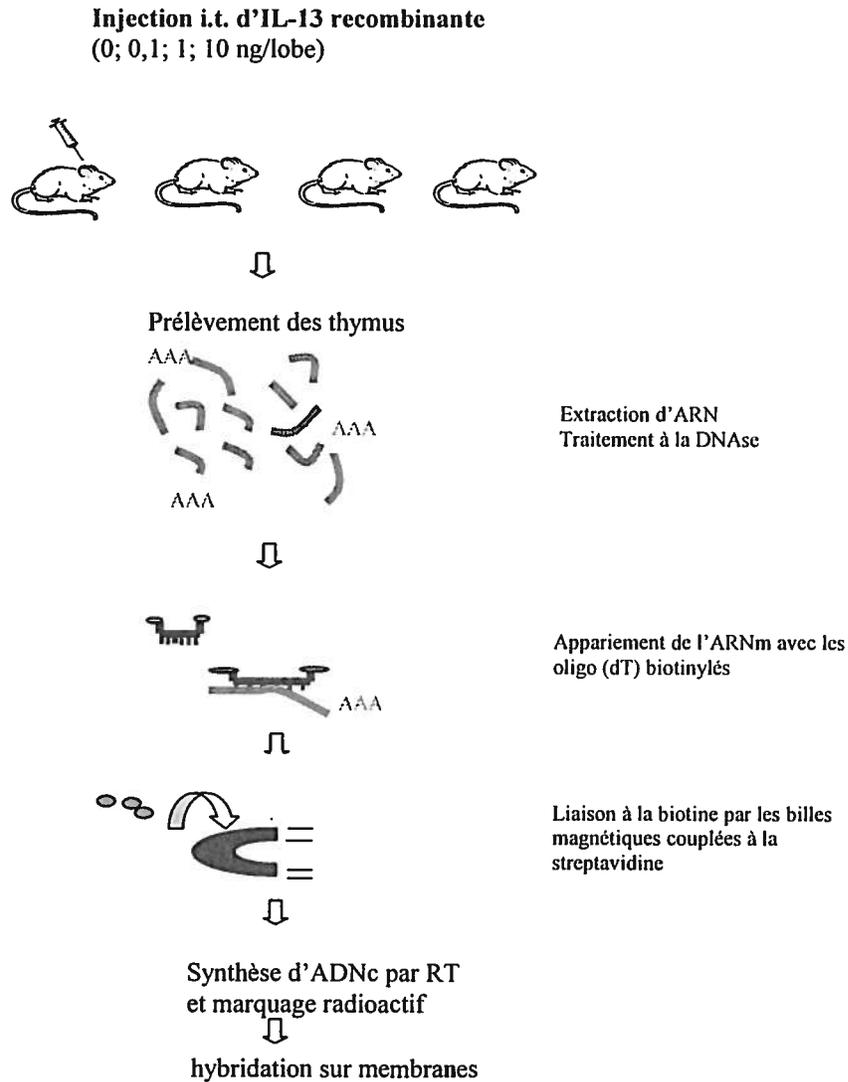


FIGURE 3- Procédure utilisée pour les matrices d'ADNc

2.6 Génération de transfectants stables de cellules 4T1

Des transfectants stables ont été générés chez des cellules de carcinome mammaire murin, 4T1, avec le vecteur S α contenant ou non l'ADNc de l'IL-13 murine. Le vecteur S α constitue un vecteur d'expression utilisé pour l'expression de gènes dans des cellules eucaryotes. Il possède un fort promoteur S α et des gènes conférant une résistance à l'ampicilline lors de sélection par transformation bactérienne et une résistance à la puromycine lors de sélection de cellules transfectées. Ce vecteur nous a gracieusement été fourni par le laboratoire du Dr François Denis (INRS-Institut Armand-Frappier). Nous avons déterminé, au préalable, la concentration optimale de puromycine nécessaire à la sélection de transfectants stables. Pour ce faire, 10⁴ cellules 4T1 ont été placées dans 100 μ l de milieu de culture et incubées avec des concentrations décroissantes de puromycine à partir de 20 μ g/ml. Les effets de la puromycine sur la viabilité des cellules 4T1 ont été observés sur une période de 48 heures. La concentration de puromycine à utiliser pour sélectionner les clones de cellules ayant intégré le vecteur S α a été ainsi fixée à 3 μ g/ml. La transfection de cellules 4T1 a ensuite été effectuée à l'aide d'un électroporateur Gene PulserTM (Bio-Rad)(250 mV, 960 μ Farads) en présence de 40 μ g de vecteur S α (20 μ g linéarisés par l'enzyme Apa 1 + 20 μ g de vecteur non-linéarisés). Les cellules ont ensuite été mises en culture pour une période de 16 h à 37°C avant d'êtreensemencées dans des plateaux de 6 et 96 puits (Costar) à raison de 10³ ou 10⁴ cellules par puit. Les cellules ont été maintenues en culture dans du milieu de culture complet supplémenté de 3 μ g/ml de puromycine afin de sélectionner les clones de cellules ayant intégré le vecteur. Le clone témoin, 4T1-SR α # 5, et les clones exprimant l'IL-13, 4T1-IL-13# 38 et 4T1-IL-13#45, ont été sélectionnés selon leur niveau d'expression d'IL-13 mesuré par ELISA.

2.7 Mesure de l'IL-13 par ELISA

Un test ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) a été utilisé pour mesurer la sécrétion d'IL-13 murine à partir de surnageants de cultures cellulaires, notamment à partir de

surnageants des cellules 4T1 transfectées avec le vecteur S α contenant ou non l'ADNc de l'IL-13. Les mesures ont été réalisées selon les recommandations du manufacturier. Les surnageants ont été produits en ensemençant $2,5 \times 10^5$ cellules dans un volume de 400 μ l de milieu complet par puit dans un plateau de 24 puits (Costar). Les cellules ont été incubées pour une période de 48 h. Le test ELISA a été réalisé à partir des surnageants dilués 1 :2 et 1 :10 en duplicata et lu à une longueur d'ondes de 405 nm à l'aide d'un lecteur Easy Reader 400T (SLT Lab Instruments, Autriche).

2.8 Croissance tumorale et métastase *in vivo*

2.8.1 Modèle d'injection sous-cutanée de cellules B16

Des souris C57BL/6 ont été injectées par voie sous-cutanée avec des cellules de mélanome murin (B16) exprimant ou non l'IL-13 et ce, à raison de 10^4 et 10^3 cellules/injection. Le modèle du mélanome B16 est pratiquement toujours étudié suite à des injections s.c. (Fidler and Kripke 1977). La croissance tumorale est généralement palpable deux semaines post-injection. Dans le cas d'injections sous-cutanées, le volume des tumeurs a été mesuré deux fois par semaine en utilisant l'équation suivante : longueur x (largeur)² x 0,4. Les souris ont été sacrifiées lorsque la tumeur atteignait un volume de 2500 mm³.

2.8.2 Modèle d'injection sous-cutanée, pour les cellules 4T1, au niveau de la glande mammaire

Ce modèle représente la croissance d'une tumeur primaire ayant la capacité de se disséminer aux poumons. Des souris BALB/c femelles ont été injectées par voie sous-cutanée au niveau de la glande mammaire avec des cellules (10^5 et 10^4) de carcinome mammaire murin (4T1) exprimant ou non l'IL-13. La croissance tumorale était détectable aux environs du 7^e jour post-injection et la dissémination aux poumons environ 1 mois post-injection (Aslakson et Miller 1992; Huang, Wong et al. 2002). Dans le cas des souris injectées par voie sous-cutanée au niveau de la glande mammaire, les tumeurs sont mesurées deux fois par semaine. La taille des tumeurs est établie de la

même façon que dans le cas du modèle d'injection sous-cutanée. Les souris sont sacrifiées, à l'aide d'une chambre à CO₂, lorsque la tumeur atteint un volume de 2500 mm³.

2.8.3 Modèle d'injection intraveineuse des cellules S19

Ce modèle est utilisé pour étudier la dissémination des lymphomes T. Pour ce modèle, des souris mâles ont été utilisées puisqu'il a été démontré que ces derniers étaient plus susceptibles à la dissémination du lymphome. Des souris C57BL/6 ont été injectées par voie intraveineuse avec des cellules (10⁶) de lymphome S19 exprimant ou non l'IL-13. Une observation hebdomadaire de l'état des souris était réalisée pour celles ayant reçu des cellules tumorales par voie intraveineuse afin de détecter l'apparition de signes cliniques de la maladie : dyspnée, pelage terne, apparence moribonde. Les souris ont été sacrifiées dès l'apparition de signes cliniques de la maladie. Généralement, les souris ayant reçu les cellules S19 développent des lymphomes au niveau des organes périphériques (rate, reins, foie, etc.) deux semaines post-injection (Aoudjit, Potworowski et al. 1998).

2.9 Clonage du gène de l'IL-13 murine dans un vecteur adénoviral

Le gène de l'IL-13 murine a été amplifié par réaction PCR grâce à des amorces contenant des sites de restriction à leur extrémité (IL-13-NotI sens : CTGGCTCTGATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATATGGCGCTCTGGGTG et IL-13-EcoR V anti-sens : GGTCTCGATATCTCCTCATTAGAAGGGGCCGTGGCG) et selon les conditions suivantes : 94°C pour 3 minutes, 94°C pour 30 secondes, 60°C pour 1 minute, 72°C pour 2 minutes, 72°C pour 10 minutes et ce, durant 35 cycles d'amplification. L'amplicon a ensuite été purifié et inséré dans le vecteur adénoviral pAdCMV5-mcs-IRES-GFP-MLP-PS, un vecteur non-répliquatif suite aux délétions des régions E1A et E1B (Massie, Couture et al. 1998). Ce promoteur est reconnu comme étant beaucoup plus actif que le promoteur CMV, entre autres chez les cellules HeLa, où il démontre une activité transcriptionnelle dix fois supérieure à celle du promoteur CMV. Il possède également un gène de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un système de répresseur au cumate

permettant d'inactiver le vecteur en cas de toxicité (Fig. 14). Ce vecteur a été obtenu du Dr Bernard Massie. Pour le clonage du gène de l'IL-13 dans ce vecteur, 45 µl d'amplicon ont subi une double digestion par les enzymes *Not1* (NEB) et *EcoR V* (Pharmacia Biotech) pendant 2 heures à 37°C. Le vecteur adénoviral digéré a été déphosphorylé par une incubation d'une heure à 37°C en présence de phosphatase (CIAP) (Gibco-BRL). Ensuite, une ligation du produit PCR digéré et du vecteur adénovirus digéré-déphosphorylé a été effectuée grâce à l'enzyme T4 Ligase (Gibco-BRL) à 16° C pendant 42 heures. Le produit de ligation a ensuite servi à faire une transformation bactérienne dans la souche *E.coli* DH5α. Une digestion de l'ADN vectoriel par l'enzyme BglII (USB) a été réalisée pour s'assurer de l'insertion du gène de l'IL-13 dans le vecteur adénoviral. Deux clones, Ad-IL-13#2 et #7, ont été ainsi sélectionnés.

2.10 Transfection transitoire avec vecteurs viraux Ad-IL-13#2 et #7

Des transfections transitoires ont été effectuées chez les cellules COS-7 à partir des vecteurs Ad-IL-13#2 et #7. La transfection a été réalisée par électroporation (250 mV, 960 µF) à partir de 20 µg de vecteur viral témoin (sans insert) ou contenant l'IL-13 murin (Ad-IL-13#2 et #7). Les cellules transfectées ont été déposées dans un plateau de 96 puits à raison de 10⁶ cellules par puit dans un volume de 1,5 ml de milieu complet et placées dans une atmosphère humide à 37°C et 5% CO₂ et ce, pour une période de 48 heures. Le surnageant des cellules exprimant le vecteur Sra parental témoin ou le vecteur Sra -IL-13 a été récolté, clarifié par centrifugation, puis dosés pour leur capacité à sécréter l'IL-13 à l'aide d'un ELISA. Les tests ELISA ont été effectués à partir de dilutions 1 :2 et 1 :4 des surnageants en duplicata et lu tel que décrit à la section 2.7.

3.0 Résultats

3.1 Caractérisation du modèle de lymphome murin 267

3.1.1 Caractérisation *in vitro*

3.1.1.1 Étude comparative de l'influence de la cellule tumorale sur la prolifération lymphocytaire entre le lymphome et le mélanome

Dans cette première partie du projet, nous avons voulu déterminer si l'IL-13 pouvait influencer l'activation de la réponse cellulaire primaire induite par la présence de lymphomes T. Pour ce faire, nous avons mesuré *in vitro* la prolifération de lymphocytes isolés de la rate provenant de souris C57BL/6 saines (témoins) et de souris C57BL/6 ayant été injectées avec les cellules 267-Sr α #24 (témoins) ou ayant reçu les cellules 267-IL-13#25 deux mois auparavant. Ces lymphocytes ont été co-incubés avec des cellules tumorales de lymphome 267 ou de mélanome B16 (servant de témoin de spécificité) irradiées. Après quarante-huit heures de co-culture, la prolifération des lymphocytes a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats obtenus ont démontré que les lymphocytes de souris ayant reçu les cellules de lymphome présentaient une réponse proliférative nettement supérieure à ceux provenant des souris C57BL/6 saines (témoins), démontrant qu'une activité proliférative a été induite par la présence de cellules tumorales (**Fig. 4A**). Par contre, aucune différence significative n'a pu être détectée lors de la mesure de l'index prolifératif des splénocytes isolés à partir de souris injectées avec les cellules de lymphome exprimant l'IL-13 ou celles transfectées avec le vecteur témoin. Ces résultats indiquent donc que la sécrétion de l'IL-13 par les cellules tumorales ne semble pas avoir modulé leur capacité à proliférer suite à la présence de lymphome T *in vivo*.

Toutefois, bien que cette expérience ne nous ait pas permis d'observer un effet de l'IL-13 sur la réponse, nous avons observé que les cellules de mélanome B16 inhibaient de façon importante la prolifération des splénocytes. Une telle inhibition de la prolifération lymphocytaire n'a pu être observée chez le lymphome T. Des expériences

additionnelles ont également démontré que le mélanome, et pas le lymphome T 267, pouvait également inhiber la réponse de lymphocytes T isolés à partir de souris C57BL/6 naïves stimulées *in vitro* avec la concanavaleine A (con A) (**Fig. 4B**) ou avec l'anticorps anti-CD3 ϵ (clone 145-2C11) préalablement immobilisé aux fonds des puits par adsorption passive (**Fig. 4C**). Cette inhibition ne semble pas nécessiter un contact direct entre la cellule tumorale et le lymphocyte puisque des conditions de co-culture réalisées *an trans-well* permettent, du moins partiellement, d'observer l'effet suppresseur des cellules du mélanome sur la réponse proliférative induite par la con A. L'hypothèse que cette activité suppressive des cellules du mélanome soit causée par un facteur suppresseur a été appuyée par l'observation que l'ajout de surnageant de cellules de mélanome B16, mais non de cellules de lymphome T, inhibe de façon importante (>90%) la prolifération lymphocytaire induite par la con A (**Fig. 4D**). Cette différence dans la capacité du lymphome et du mélanome à moduler la réponse lymphocytaire ne semble pas due à l'expression du TGF β , une molécule immunosuppressive reconnue pour sa capacité à inhiber la réponse proliférative des lymphocytes, puisque les cellules 267 et B16 expriment des niveaux équivalents de cette molécule au niveau des ARNm (**Fig. 5**). De plus, l'effet suppresseur des cellules de mélanome semble spécifique aux cellules lymphoïdes puisque cet effet suppresseur a pu être observé sur des lignées de lymphome B (CH27) et de lymphome T (267) activées ou non, mais non sur des lignées de cellules endothéliales (endothéliome b-end-3) ou de carcinome mammaire (4T1) (**Fig. 6**).

Bien que l'ensemble de ces résultats ne nous ait pas permis de démontrer un effet, de la surexpression de l'IL-13 par le lymphome 267, sur la prolifération lymphocytaire, il nous a permis de mettre en évidence que l'effet des cellules tumorales sur la réponse lymphocytaire est spécifique aux types de tumeurs et aux facteurs relargués par celles-ci.

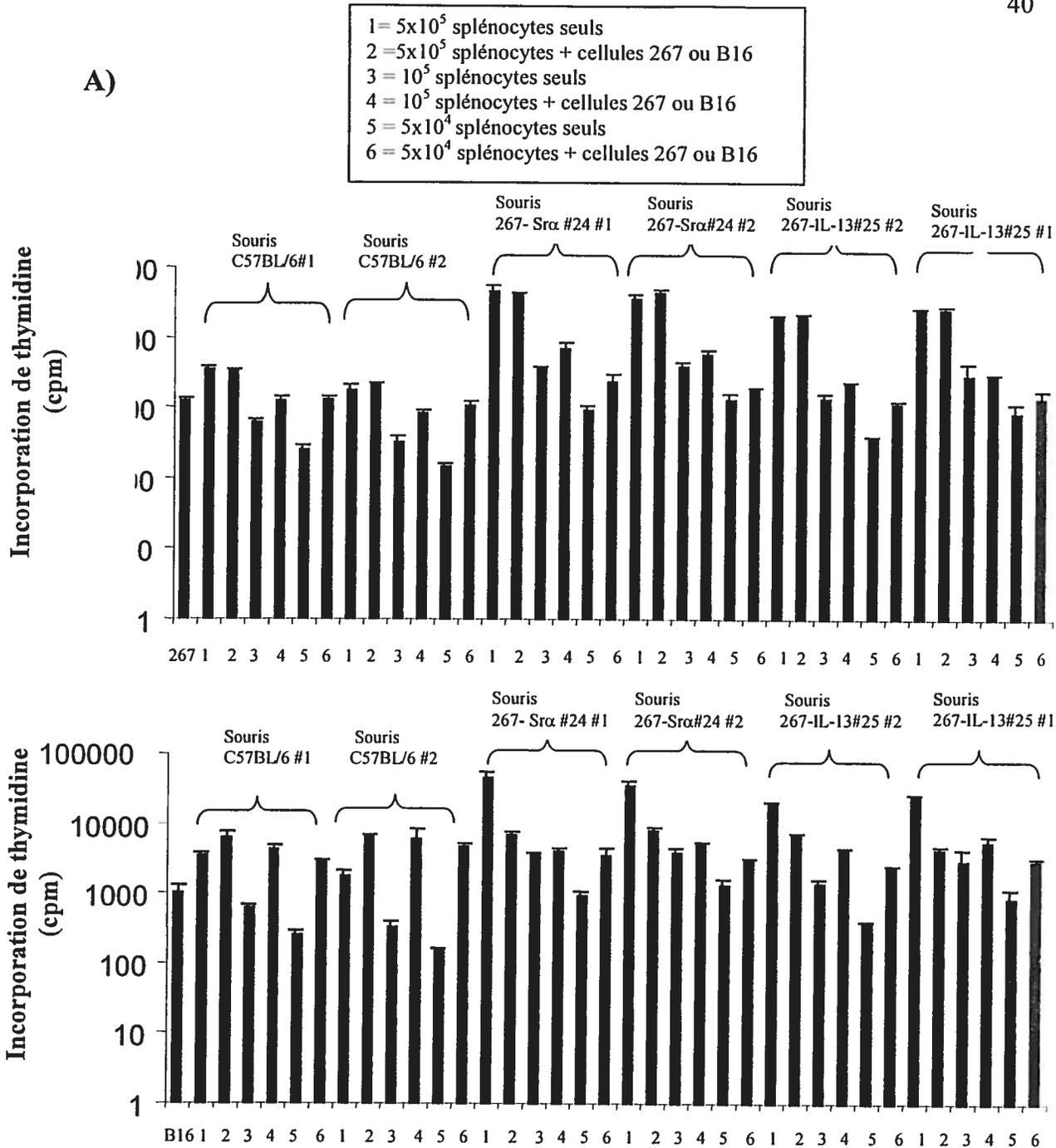
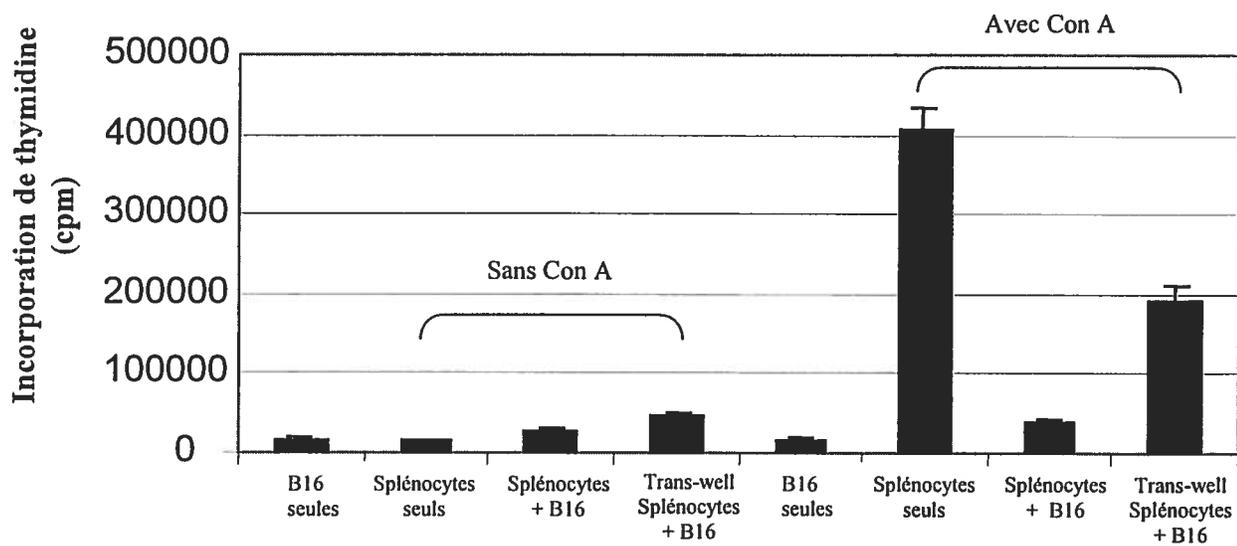
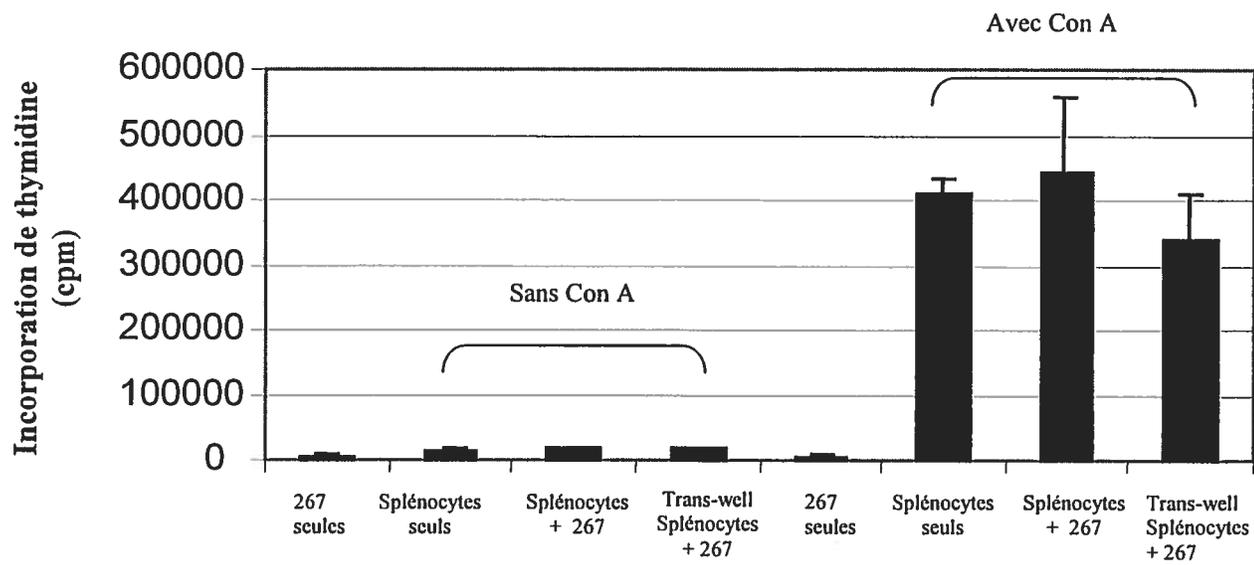


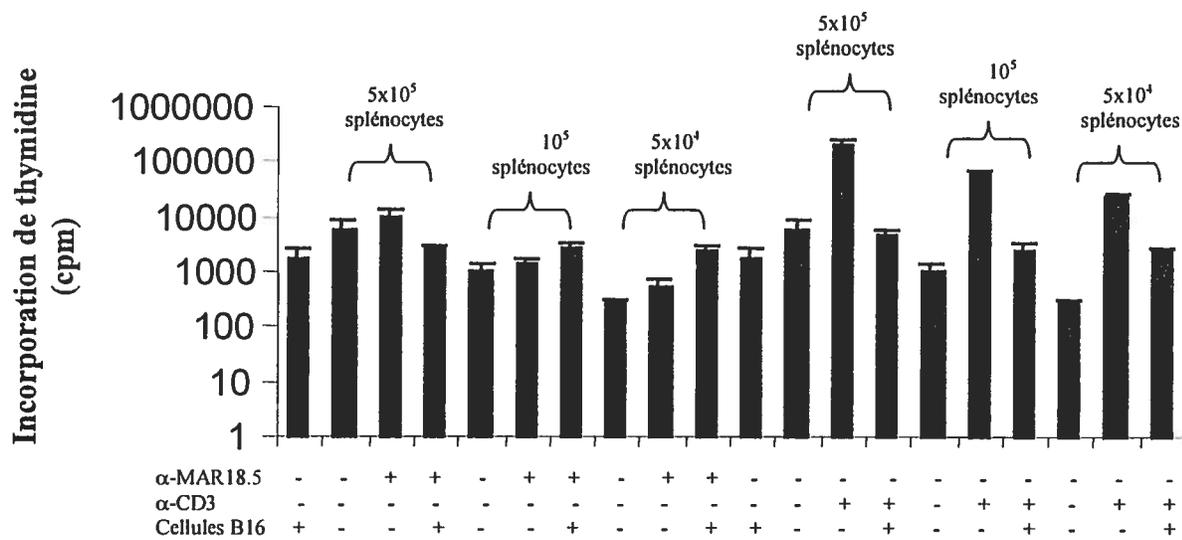
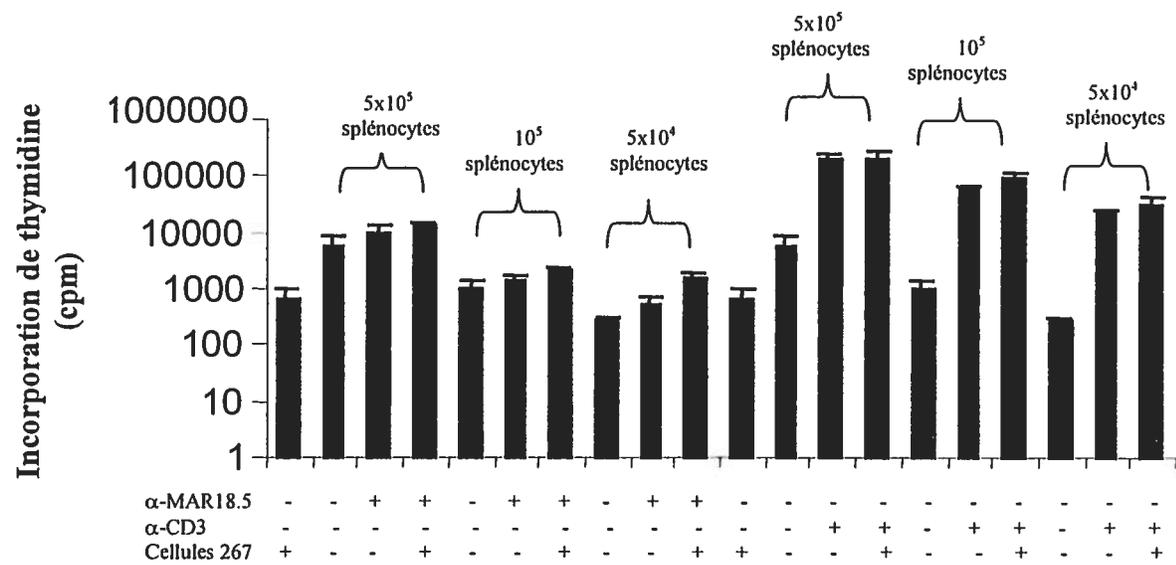
FIGURE 4- Prolifération de splénocytes et cellules tumorales

A) Des splénocytes ont été isolés de souris C57BL/6 sensibilisées *in vivo* aux antigènes tumoraux (contexte en présence d'IL-13 ou sans IL-13) et placés en culture en présence de cellules tumorales de lymphome 267 ou de mélanome B16. B) Des splénocytes ont été isolés de souris C57BL/6 non-sensibilisées et placés en culture en présence de cellules tumorales 267 et B16 en *trans-well*, ou C) en présence d'anticorps, ou D) avec surnageants de cellules tumorales en présence ou en absence de Con A. Trois concentrations de splénocytes ont servi à ces expériences de prolifération, soit 5×10^5 , 10^5 et 5×10^4 cellules. $1 \mu\text{Ci}$ de thymidine tritiée a été ajouté à chaque puits et la prolifération mesurée après 48 heures de co-culture.

B)



C)



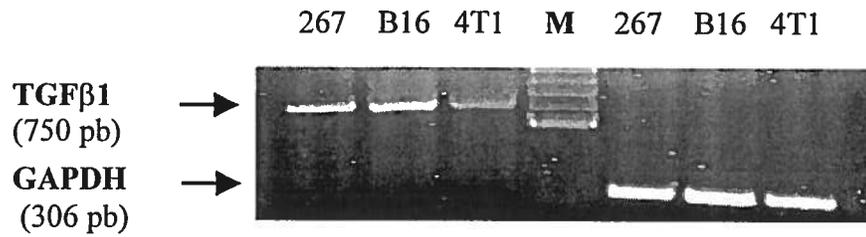


FIGURE 5. Expression de TGFβ1 par les cellules tumorales

A partir des cellules tumorales 267, B16 et 4T1, nous avons procédé à l'extraction d'ARN puis effectué des analyses par RT-PCR afin de détecter l'expression de TGFβ1 par ces cellules. (M; marqueur moléculaire, échelle de 100 pb).

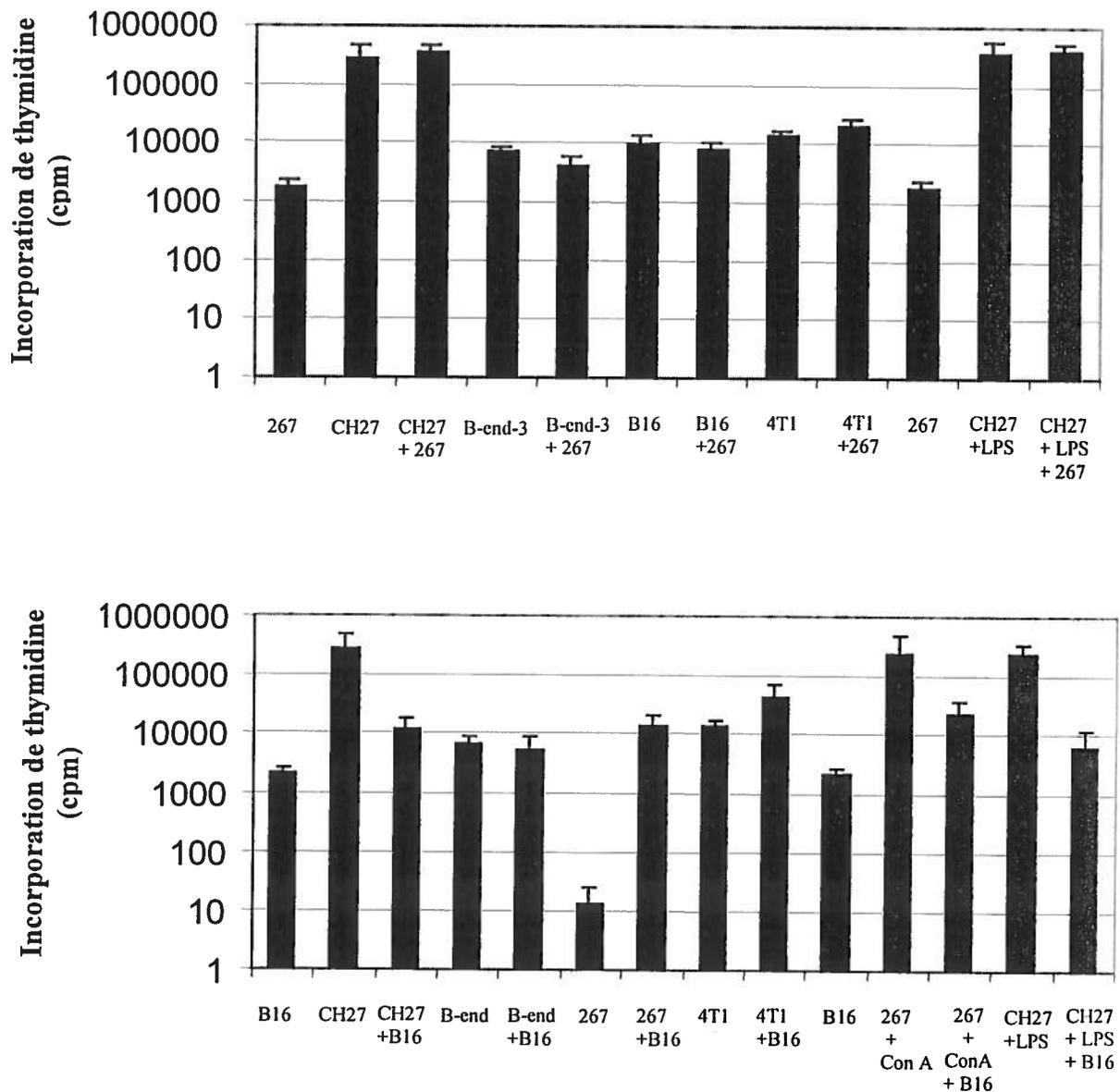


FIGURE 6- Influence de cellules tumorales sur la prolifération de divers types cellulaires

Des cellules de lymphome 267 ou de mélanome B16, irradiées ont été placées en co-culture avec divers types cellulaires murins afin de déterminer leur influence sur la prolifération de celles-ci. La prolifération de lignées de lymphome B (CH27), de cellules endothéliales (b-end-3), de carcinome mammaire (4T1) et de lymphome T (267) a été ainsi étudiée suite à une co-culture de 48 heures et ce, par l'ajout de thymidine tritiée.

3.1.2 Caractérisation *in vivo*

3.1.2.1 Modèle de la poche d'air murine

Dans la suite de notre projet, nous avons concentré nos efforts sur la capacité de l'IL-13 à moduler la migration des leucocytes vers la lésion tumorale. En effet, il a été démontré que l'IL-13 était un activateur important des molécules d'adhésion vasculaires présentes à la surface des cellules endothéliales. De plus, l'expression de l'IL-13 inhibe de façon significative la croissance des cellules tumorales injectées par voie sous-cutanée (Tableau III, Robledo, Mercier et al. manuscrit en préparation). Dans le but de caractériser l'influence de l'IL-13 sur le recrutement leucocytaire, nous avons donc adopté une approche *in vivo* utilisant le modèle de poches d'air (Pelletier, Roberge et al. 2001). Cette approche nous permettait de récupérer, à des temps fixes, et d'analyser de façon qualitative et semi-quantitative non seulement les cellules recrutées aux lésions, mais également le contenu protéique de ces lésions. L'induction de poches d'air a été réalisée par une injection sous-cutanée d'air stérile (filtrée) sur le dos de souris congénétiques C57BL/Kathy (exprimant l'allèle 1.1 de CD90) aux jours 0 et 3. Ensuite, nous avons injecté les transfectants stables de lymphome 267 (Thy1.2) surexprimant ou non l'IL-13 (267-Src#24 et 267-IL-13#25) dans cette poche d'air à raison de 10^7 cellules. Vingt-quatre heures post-injection, nous avons recueilli le contenu de la poche d'air et procédé à l'analyse des contenus cellulaire et protéique. Les populations cellulaires ont été analysées, par cytométrie en flux, à l'aide de marqueurs membranaires spécifiques. Les anticorps spécifiques pour Mac-1 (permettant d'identifier les populations monocytes/macrophages, neutrophiles); NK1.1 (cellules NK); Thy-1.2 et Thy-1.1 (cellules de lymphome et cellules T de l'hôte) ont été utilisés.

Les résultats de ces expériences nous ont permis de constater que la surexpression de l'IL-13 ne module pas de façon significative le recrutement lymphocytaire induit par le lymphome, du moins lors des différents intervalles de temps (24-72 h) post-injection analysés. En effet, nous n'avons pu observer des différences significatives au niveau du pourcentage des populations visées retrouvées au niveau de la poche d'air suite à

l'injection des cellules de lymphome exprimant l'IL-13 ou des cellules de lymphome témoins (**Fig. 7A**). Nous avons observé une forte proportion de cellules exprimant le marqueur Mac-1 (25-30%), de même que le marqueur NK-1.1 (environ 20%). L'analyse en zymographie du surnageant ne nous a pas permis, non plus, de mettre en évidence un effet de l'IL-13 sur la sécrétion de MMP-9 *in situ* (**Fig. 7B**) et sur l'expression du gène codant pour MMP-9 par les cellules recrutées au niveau de la poche d'air (**Fig. 7C**).

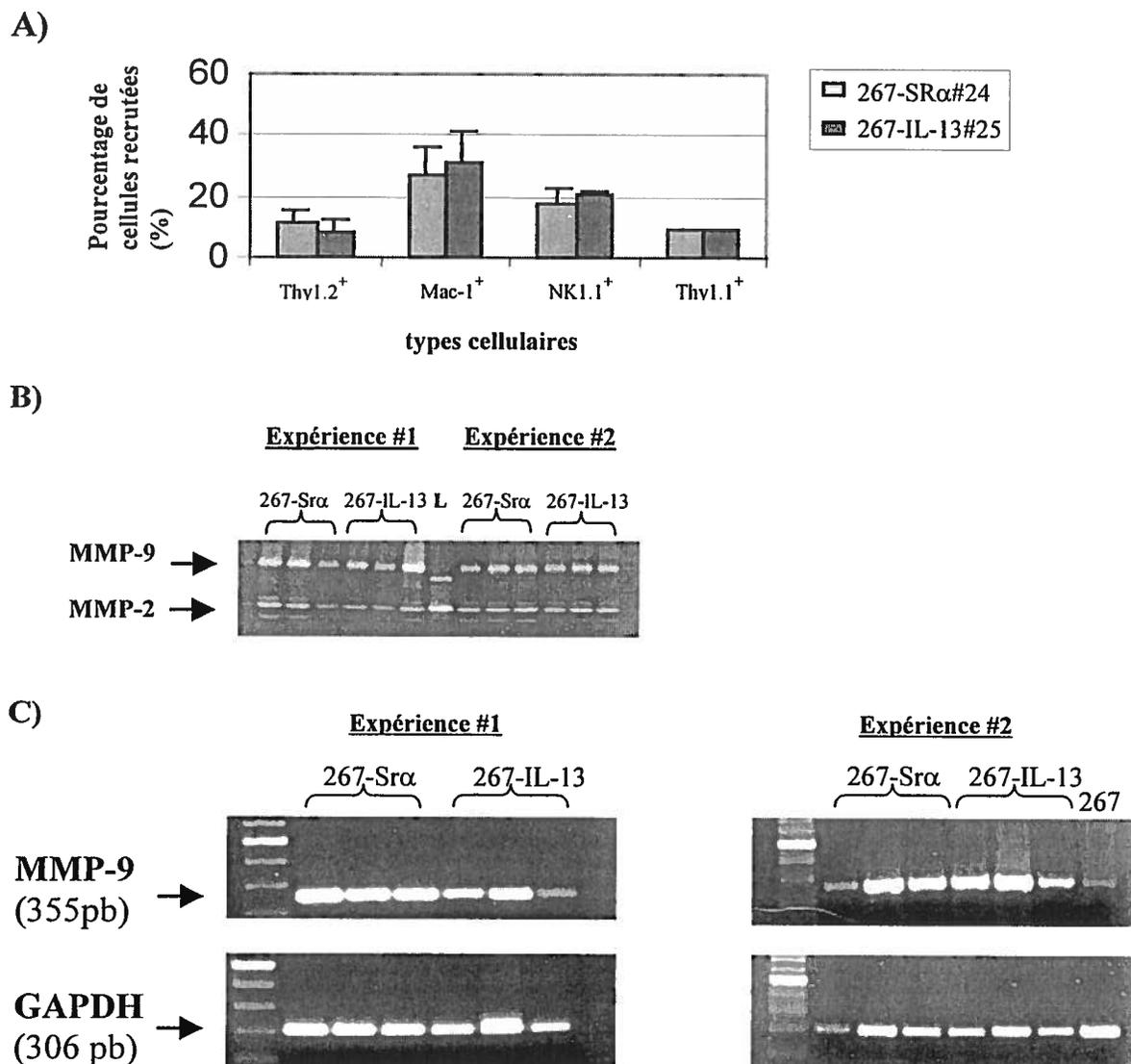


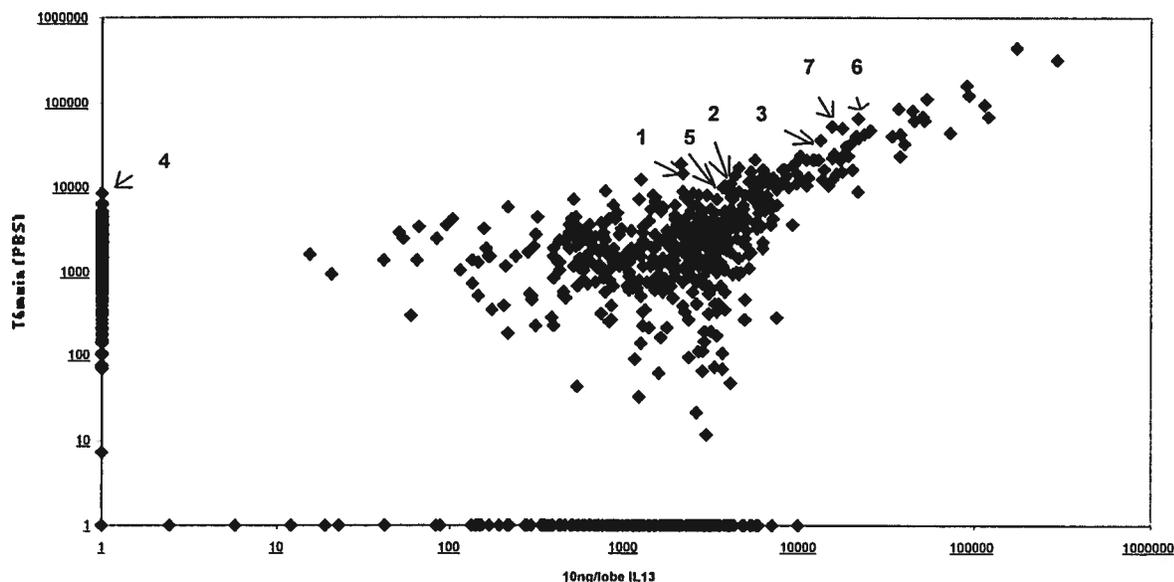
FIGURE 7- Influence de l'IL-13 sur le recrutement leucocytaire

Des souris C57BL/Kathy (Thy1.1) ont été injectées, sur le dos, avec 3 ml d'air stérile aux jours 0 et 3 afin de créer la poche d'air. Des cellules de lymphome (Thy1.2) 267-Srα#24 ou 267-IL-13#25 ont été injectées dans la poche d'air au jour 6. Vingt-quatre heures post-injection, le contenu de la poche d'air a été recueilli par plusieurs lavages successifs. Les cellules et les surnageants ont été séparés par centrifugation. A) Phénotype des cellules marquées à l'aide d'anticorps α -Mac-1, α -Thy1.2, α -Thy1.1 et α -NK1.1 par cytométrie en flux. B) Analyse des surnageants par zymographie sur gélatines, et C) Expression de MMP-9 analysée par RT-PCR à partir d'ARNm isolés des cellules.

3.1.2.3 Analyse génomique de l'influence de l'IL-13 *in vivo*

Suite à ces résultats, nous avons adopté une approche plus globale afin d'étudier l'effet de l'IL-13 sur l'environnement péri-tumoral. Cette méthode nous permettrait d'identifier et caractériser les mécanismes responsables de son effet suppresseur sur la croissance de lymphomes thymiques. Pour ce faire, nous avons choisi une approche génomique visant à analyser, via l'utilisation de matrices d'ADN complémentaires (cDNA array), la modulation des gènes exprimés *in vivo* suite à l'injection de l'IL-13 dans le thymus. Cette approche consiste essentiellement à synthétiser des sondes d'ADN complémentaires aux ARNm isolés à partir de thymus témoins ou injectés soixante-douze heures auparavant avec différentes doses d'IL-13 murine recombinante (0,1; 1; et 10 ng d'IL-13/lobe). Cette approche s'est basée sur nos résultats précédents démontrant que l'expression de l'IL-13 par les lymphomes inhibe de façon significative la croissance de lymphomes thymiques. Puisque les cellules de lymphomes T n'expriment pas le récepteur de l'IL-13, nous avons donc posé l'hypothèse que cette cytokine agirait sur les cellules péri-tumorales exprimant le récepteur de l'IL-13 présentes dans le microenvironnement thymique (e.g. macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales, etc.). Ces sondes, construites à partir des tissus, sont rendues radioactives par l'incorporation de ^{33}P . Lorsqu'hybridées sur des membranes recouvertes de sondes spécifiques pour 1176 gènes, une analyse semi-quantitative est rendue possible grâce à l'utilisation d'un appareil PhosphorImager et de logiciels appropriés (Moisan et al. 2003). De cette façon, nous avons pu identifier plusieurs gènes dont l'expression était modulée à la baisse par l'injection intra-thymique d'IL-13 recombinante, et ce, de façon dose-dépendante. Les résultats ont démontré que l'injection de l'IL-13 n'a pas induit, de façon significative, la modulation à la hausse de gènes dans le thymus. Par contre, plusieurs gènes ont été modulés à la baisse de façon significative, notamment celui codant pour le récepteur de chimiokine CXCR4. Les gènes dont l'expression était la plus fortement modulée, et ce de façon dose-dépendante par l'IL-13, et dont la modulation de l'expression était visible à l'œil nu sur les membranes, ont été retenus (Tableau V) (**Fig. 8**). Les résultats obtenus devront être confirmés par une méthode indépendante au niveau de l'ARNm par RT-PCR, par exemple, et au niveau protéique, par Western blot ou autres méthodes équivalentes.

A)



B)

TABLEAU V- Gènes dont l'expression est régulée par l'IL-13

Gènes sélectionnés	Coordonnées GenBank	Différence max. expression
1-BCL2-associated X protein membrane isoform alpha (BAX-alpha)	L22472	10,7 X
2-BCL2-binding athanogene 1 (BAG1)	U17162	4,0 X
3-Cathepsin D (CTSD)	X53337	4,3 X
4-C-X-C receptor 4 (CXCR4; CMKAR4)	D87747	8485,0 X
5-Integrin beta 7 (ITGB7)	M95633	14,3 X
6-P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL1; SELPLG; SELP1)	X91144	4,3 X
7-TCRA enhancer-binding factor-interacting protein 1 (TEBFP1); ALY	U89876	5,1 X

FIGURE 8- Influence de l'IL-13 sur l'expression génique par la méthode de matrices d'ADNc

Des souris C57BL/Katy ont été injectées par voie intra-thymique avec différentes doses d'IL-13 murine recombinante, soit 0; 0,1; 1; 10 ng d'IL-13 / lobe de thymus. Soixante-douze heures post-injection, les thymus ont été prélevés et l'ARN a été extrait. L'ARN a servi à la synthèse de brins d'ADNc, par transcription inverse, radioactifs par l'incorporation de ^{33}P . Ces ADNc radioactifs ont été hybridés à des membranes de nylon recouvertes de l'ARN de 1176 gènes et ce, durant une période de 3 semaines. La quantification de l'hybridation a été réalisée par un appareil PhosphorImager.

3.1.3 Influence de l'IL-13 sur la métastase d'un lymphome T agressif

Nous avons établi, dans notre laboratoire, un lymphome T agressif, soit le lymphome S19. Il s'agissait à l'origine d'un lymphome radio-induit faiblement métastatique et l'agressivité du lymphome a été acquise au fil de plusieurs passages *in vivo* successifs chez la souris C57BL/6 (Lalancette et al. 2000). Afin d'évaluer le potentiel de l'IL-13 à surpasser le pouvoir hautement métastatique du lymphome agressif, nous avons utilisé un modèle *in vivo* d'injection intraveineuse afin de reproduire le plus fidèlement possible la dissémination des cellules tumorales via la circulation sanguine. Un million de cellules témoins (S19S α #A) ou exprimant l'IL-13 (S19-IL-13#5) ont donc été injectées à des souris C57BL/6 via la veine de la queue et l'évolution du lymphome a été observée de façon hebdomadaire jusqu'à l'apparition de signes cliniques de la maladie : dyspnée, démarche caractéristique, poil terne. La sécrétion d'IL-13 par les cellules S19-IL-13#5, a été confirmée par ELISA (Robledo et al., résultats non-publiés). La figure 9 représente les courbes de survie des souris ayant reçu les cellules témoins et celles ayant reçu les cellules exprimant l'IL-13. Les résultats indiquent qu'au 18^e jour post-injection, aucune souris ayant reçu les cellules exprimant l'IL-13 n'avaient survécu alors qu'une souris ayant reçu les cellules témoins vivait toujours. Il semblerait donc que l'IL-13 soit incapable de surpasser le pouvoir hautement métastatique du lymphome agressif S19. Ces résultats suggèrent que le transcriptome de S19 qui lui confère un phénotype agressif contrebalance l'effet anti-tumoral de l'IL-13.

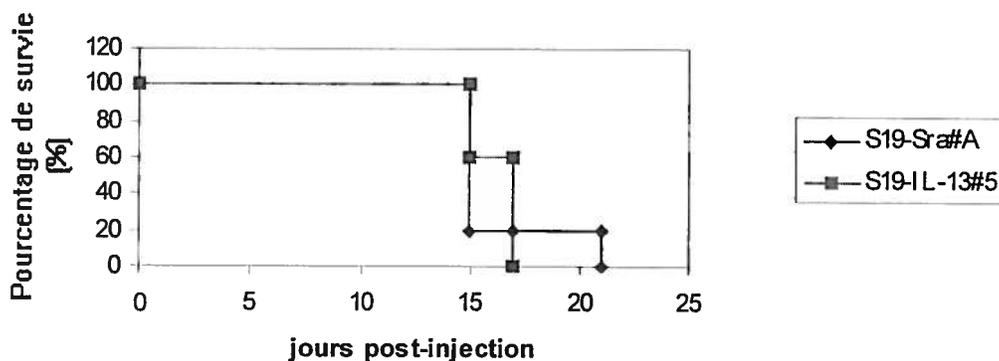


FIGURE 9- Influence de l'IL-13 sur la métastase du lymphome T

Des souris C57BL/6 ont été injectées par voie intraveineuse avec des cellules de lymphome agressif exprimant ou non l'IL-13, soit S19-Sr α #A et S19-IL-13#5. Une observation hebdomadaire des souris a été effectuée afin de détecter des signes cliniques de la maladie : dyspnée, démarche caractéristique, pelage terne. Dès l'apparition de signes cliniques, les souris étaient sacrifiées.

3.2 Étude de la capacité de l'IL-13 à inhiber la tumorigénicité des cellules du carcinome mammaire

3.2.1 Modèle du carcinome mammaire 4T1

Les cellules 4T1 sont des cellules de carcinome mammaire provenant de la souris BALB/c (H-2^d). Ces cellules sont hautement tumorigènes et capables de se disséminer. Elles ont la capacité de se disséminer spontanément de la tumeur primaire située au niveau de la glande mammaire jusqu'à des sites distants tels que les ganglions lymphatiques, le foie, les poumons, le cerveau, et les os (Coligan 2000). Le modèle 4T1, souvent utilisé par voie sous-cutanée au niveau de la glande mammaire, représente un excellent modèle pour étudier le cancer du sein chez la femme puisque son patron de métastase est analogue à ce dernier et parce que les cellules 4T1, tout comme la plupart des tumeurs humaines, sont peu immunogènes, ce qui signifie qu'aucune protection contre ces tumeurs ne peut être induite et ce, même suite à l'injection de cellules tumorales irradiées. Les cellules 4T1, par leur résistance à la 6-thioguanine, offrent également la possibilité de détecter et dénombrer les métastases, même microscopiques, situées à des sites distants de la tumeur primaire (Coligan 2000).

3.3. Caractérisation des transfectants

Des transfectants stables de cellules de carcinome mammaire (4T1) ont été générés à l'aide du vecteur d'expression S α contenant ou non l'ADNc de l'IL-13 murine. Le vecteur utilisé pour la transfection, S α , contient un gène de résistance à la puromycine, ce qui a permis la sélection des clones cellulaires ayant intégré le vecteur. Ainsi, une expérience dose-réponse avait été effectuée préalablement à la transfection sur les cellules tumorales parentales (267, S19, B16 et 4T1) afin de déterminer la dose de puromycine pouvant tuer les cellules parentales. Cette concentration a par la suite servi à sélectionner et à maintenir les clones en culture.

3.3.1 Production d'IL-13 par les transfectants stables 4T1

Chacun des clones sélectionnés a été testé pour sa capacité à produire de l'IL-13 et ce, via un test ELISA. Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai réalisé les expériences de caractérisation des clones de cellules 4T1 alors que la caractérisation des clones de cellules 267 et S19 a été effectuée par le Dr Olivier Robledo. Plusieurs clones stables de cellules 4T1 ont ainsi été obtenus par transfection du gène de l'IL-13. Deux clones (#38 et #45) ont été caractérisés, par un test ELISA, pour leur capacité à sécréter de façon constitutive l'IL-13 murine. Ces clones ont été utilisés pour nos expériences *in vivo* de même que le clone Sr α #5 exprimant des niveaux non-détectables d'IL-13 par ELISA (Fig. 10).

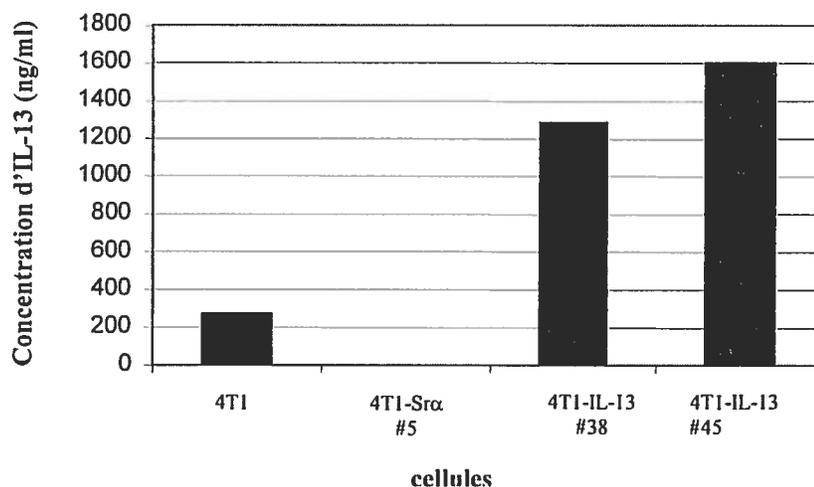


FIGURE 10- Production d'IL-13 par les transfectants 4T1

Des transfectants stables de cellules de carcinome mammaire 4T1 exprimant ou non l'IL-13 ont été générés. Ces transfectants ont été placés en culture pendant 48 heures et le milieu de culture a été récolté pour réaliser un test ELISA afin de mesurer la production d'IL-13 par les transfectants. Deux clones exprimant l'IL-13 ont été sélectionnés, soit les clones 4T1-IL-13 #45 et 4T1-IL-13 #38. Un seul clone de cellules 4T1 contenant le vecteur Sr α vide a été retenu soit le clone 4T1-Sr α #5.

3.3.2 Expression de l'ARNm du récepteur fonctionnel de l'IL-13 par les transfectants 4T1

Dans le but de caractériser les clones, l'expression du récepteur $\alpha 1$ de l'IL-13 a été étudiée par RT-PCR à partir de l'ARN de chacun des clones. Nos résultats ont démontré que les cellules de lymphome T 267 et S19 n'expriment pas le récepteur $\alpha 1$ de l'IL-13 alors que les cellules de mélanome B16 et du carcinome mammaire 4T1 expriment le gène codant pour cette sous-unité du récepteur (**Fig. 11**). L'analyse de l'expression des chaînes alpha du récepteur de l'IL-4 et du deuxième récepteur de l'IL-13 pourra être menée ultérieurement.

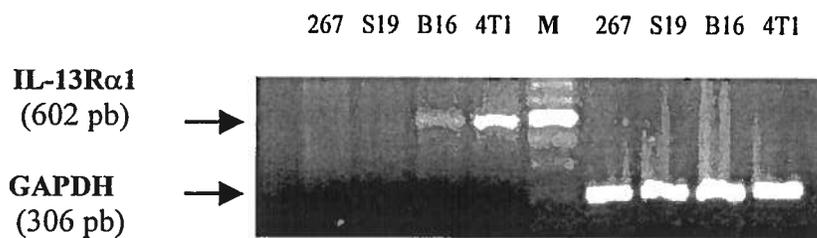


FIGURE 11- Expression du récepteur de l'IL-13

Afin de détecter l'expression du récepteur $\alpha 1$ de l'IL-13, l'ARN total des cellules tumorales 267, S19, B16 et 4T1 ont été isolées. Des analyses de RT-PCR ont ensuite été réalisées à partir de l'ARN de ces cellules grâce à des amorces spécifiques pour IL-13R $\alpha 1$.

3.4 Résultats *in vivo*

3.4.1 Carcinome mammaire 4T1

Des transfectants stables de cellules 4T1 exprimant ou non l'IL-13 ont été injectés à des souris BALB/c femelles afin d'étudier l'effet de l'IL-13 sur la croissance tumorale du carcinome mammaire. Une première expérience préliminaire, réalisée à partir des transfectants stables 4T1-Src#5 et 4T1-IL-13#45, utilisant une dose de 10^5 cellules à injecter par voie sous-cutanée avait démontré que l'IL-13 induisait un ralentissement du développement tumoral du carcinome mammaire. Dans une deuxième série d'expérience, nous avons donc injectés, par voie sous-cutanée au niveau de la glande mammaire, 10^4 cellules de transfectants stables témoins (4T1-Src#5) ou exprimant l'IL-13 (4T1-IL-13 #38 et 4T1-IL-13 #45) et la taille des tumeurs a été mesurée 2 fois par semaine. Nous avons testé deux clones exprimant l'IL-13 et injecté 5 souris/groupe afin de prévenir les effets clonaux. Nos résultats démontrent que l'expression de l'IL-13 ralentit de façon significative ($p < 0.005$) la croissance *in vivo* des tumeurs du carcinome mammaire et ce, pour les deux clones exprimant l'IL-13. D'autre part, la fréquence de passages cellulaires *in vitro* sur une longue période semble indiquer que la sécrétion d'IL-13 n'affecte pas la prolifération cellulaire. Toutefois, des expériences plus quantitatives grâce à la mesure de l'index prolifératif seraient plus adéquates pour s'assurer de l'effet de l'IL-13 sur la prolifération des cellules 4T1. De même, il serait à propos de mesurer l'effet de l'IL-13 recombinante sur la prolifération de cellules 4T1 *in vitro*.

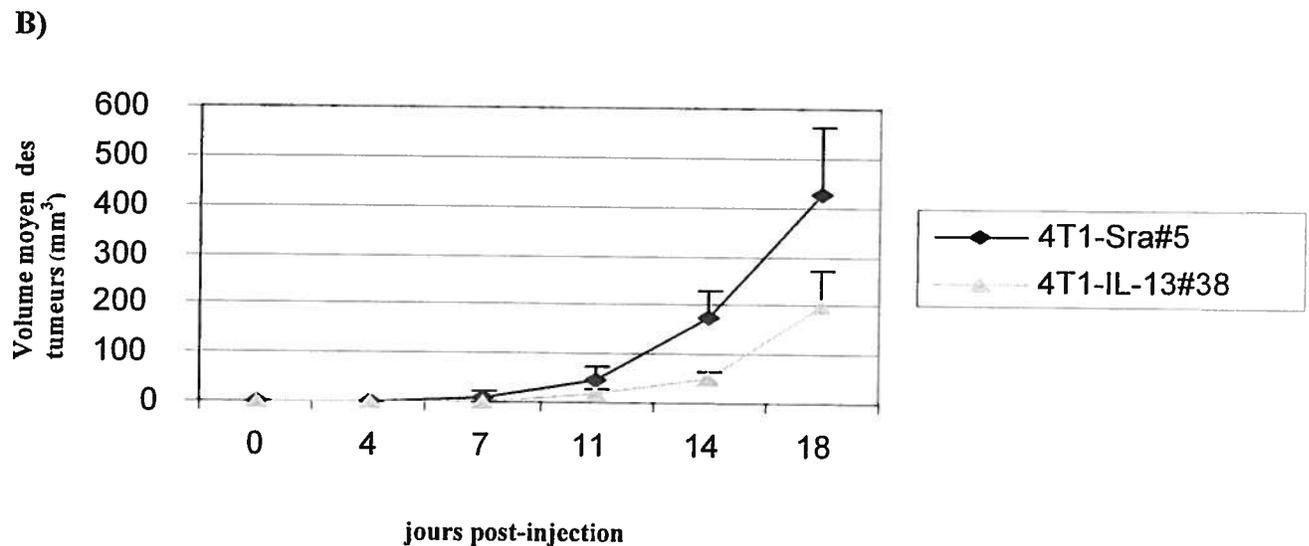
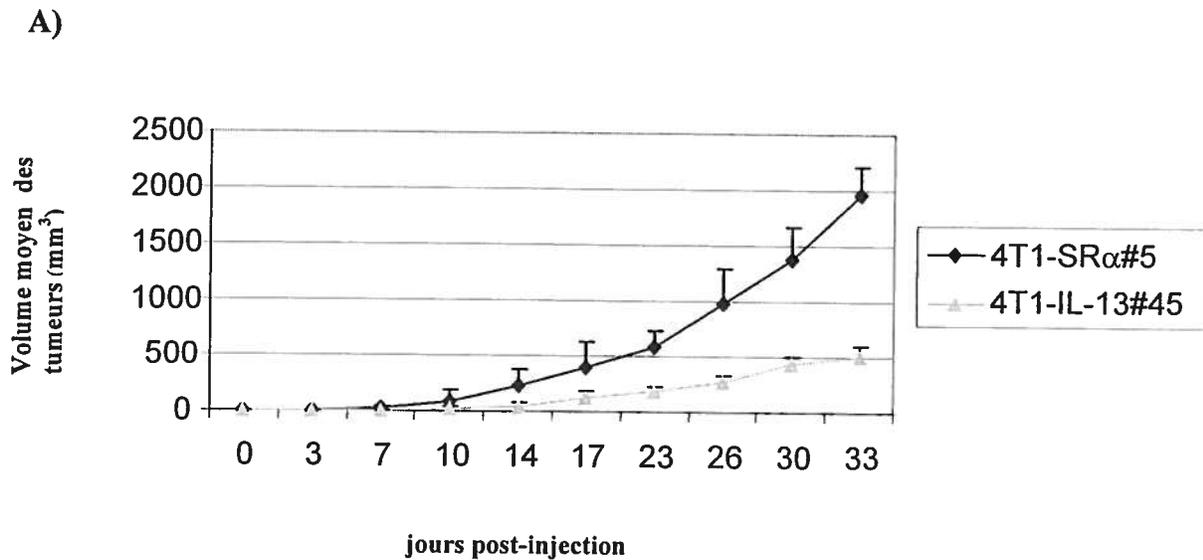


FIGURE 12- Influence de l'IL-13 sur la croissance tumorale du carcinome mammaire murin

Des cellules de carcinome mammaire murin, soit les cellules 4T1, ont été transfectées avec le vecteur Sra vide ou contenant l'ADNc de l'IL-13. 10^4 de ces cellules ont par la suite été injectées à des souris BALB/c femelles par voie s.c. au niveau de la glande mammaire. La croissance tumorale a ensuite été évaluée par la mesure des tumeurs et ce, à raison de deux fois par semaine. Les résultats représentent les courbes de moyenne en ce qui concerne la taille des tumeurs pour chacune des souris d'un même groupe : soit le groupe de souris ayant reçu les cellules 4T1-Sra#5 ou celui ayant reçu les cellules 4T1-IL-13#45 ou #38

3.5 Construction d'un vecteur adénoviral exprimant l'IL-13

3.5.1 Choix du vecteur viral

La littérature ne fait mention d'aucun virus pouvant infecter les cellules lymphomateuses murines. Il est connu par contre que l'adénovirus a la capacité d'infecter des cellules de lymphome humain. L'objectif de l'expérience étant de développer un vecteur fonctionnel menant à la production d'une protéine antigéniquement intacte, telle que confirmé par le test ELISA, nous avons infecté nos cellules murines de lymphome T 267 afin d'identifier un vecteur viral capable d'infecter nos cellules de lymphome 267. Ce vecteur nous permettra ultérieurement de produire des quantités de vecteurs et de procéder à des expériences *in vivo*. Pour ce faire, nous avons procédé à des expériences d'infection de cellules par différents vecteurs viraux : adénovirus, AAV₂ (Adeno-Associated virus) et rétrovirus (MuLV). Des cellules de lymphome 267 ont été infectées par divers surnageants de culture cellulaire contenant l'un des virus mentionnés ci-haut. L'infection a duré vingt-quatre heures et ensuite, les cellules ont été recueillies puis fixées afin de procéder à diverses analyses. Une infection virale a également été réalisée sur les cellules 293A en guise de témoin positif pour les infections virales. Les vecteurs viraux utilisés exprimaient tous la GFP, ce qui a permis de juger de l'efficacité d'infection de chacun des vecteurs. L'expression de la GFP a été observée par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence. Les résultats présentés à la figure 13 correspondent aux résultats de cytométrie en flux et indiquent que les vecteurs adénovirus et AAV₂ ont la capacité d'infecter les cellules de lymphome T. Nous avons choisi de poursuivre nos expériences avec le vecteur adénovirus.

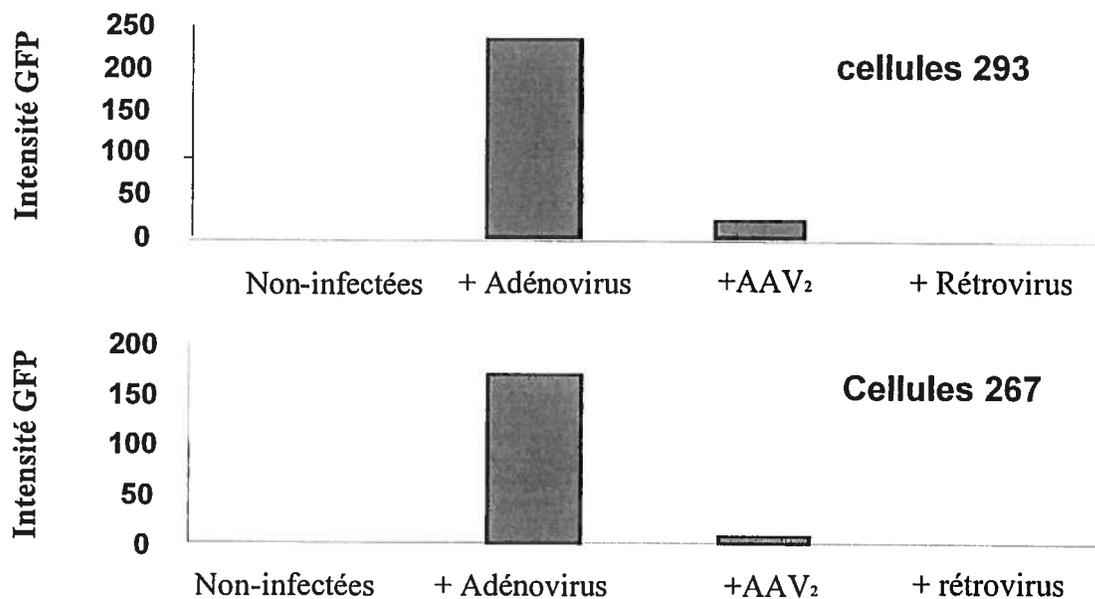


FIGURE 13- Infection de cellules de lymphome par divers virus : adénovirus, adéno- associated virus (AAV₂), rétrovirus

Des cellules de lymphome 267 ont été infectées par divers virus recombinants. Des surnageants de cellules contenant chacun des virus énumérés précédemment ont servi à infecter les cellules. Des cellules 293A ont également été infectées de la même façon que les cellules 267 et ce, en guise de témoin positif pour les infections virales. Les vecteurs viraux exprimant la GFP ont été évalués pour leur capacité d'infection par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence et ce, vingt-quatre heures post-infection. Les résultats représentent l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) obtenue lors des analyses de cytométrie en flux.

3.5.2 Clonage de l'IL-13 dans le vecteur adénoviral

Le vecteur adénoviral, pAdCMV5-mcs-IRES-GFP-MLP-PS, utilisé dans le cadre de nos études nous a été fourni par le Dr Bernard Massie. Ce vecteur possède le gène de la GFP ainsi qu'un gène conférant la résistance à l'ampicilline, destiné à la sélection en bactérie, aux cellules l'intégrant. Il possède également un système répresseur au cumate qui permettrait l'inactivation du vecteur advenant le cas où notre gène d'intérêt entraînerait une toxicité. A partir de l'amplification de l'IL-13 murine et le clivage enzymatique par les enzymes de restriction *Not1* et *EcoR V*, nous avons intégré l'ADNc de l'IL-13 dans le vecteur adénoviral. Nous supposons que l'insertion de l'ADNc s'est effectuée avec la bonne orientation étant donné que les enzymes de restriction clivent en des bouts cohésifs pour l'une (*Not1*) et en des bouts francs pour l'autre (*EcoR V*). Une dizaine de colonies bactériennes ont été choisies de façon aléatoire, suite à une transformation bactérienne, puis étudiées pour s'assurer de la présence de l'IL-13 dans le vecteur adénoviral. A cet effet, l'ADN des vecteurs a été digéré par l'enzyme *Bgl* II dont deux séquences cibles étaient retrouvées, l'une dans le vecteur viral et l'autre dans la séquence de l'IL-13. Les deux clones sélectionnés porteront les noms Ad-IL-13#2 et Ad-IL-13#7.

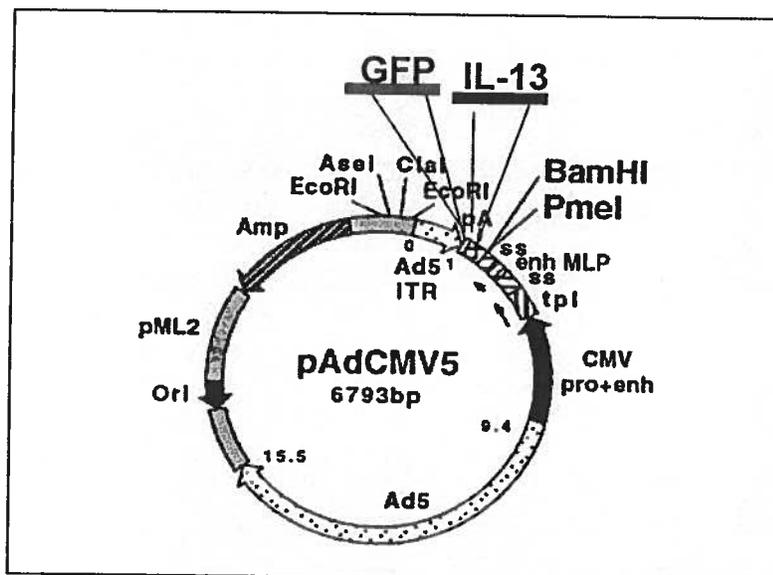


FIGURE 14- Schéma du vecteur adénoviral construit

3.5.3 Génération de transfectants transitoires

Afin de vérifier si les vecteurs viraux sélectionnés permettaient la production d'IL-13, nous avons généré des transfectants transitoires chez les cellules COS-7. Ces cellules sont des dérivées de la lignée CV1 exprimant le grand antigène SV40. La lignée CV1 provient de rein de singe vert et a été utilisée pour sa susceptibilité à la transfection. Ces transfectants ont été générés par électroporation à partir des vecteurs adénovirus témoins ou contenant l'ADNc de l'IL-13 (Ad-IL-13 #2 et Ad-IL-13#7). Des cellules transfectées ont été placées en culture pendant 48 heures et les surnageants ont ensuite été récupérés et utilisés pour le test ELISA en vue de quantifier la production d'IL-13 par les transfectants.

3.5.4 Production d'IL-13 par les vecteurs adénovirus construits

A partir des surnageants des transfectants récoltés, un test ELISA a été réalisé afin de détecter et quantifier la production de l'IL-13 par ces derniers. Les surnageants de cellules ont été dilués 1 :2 et 1 :4. Les résultats démontrent que les clones permettent la production d'une quantité importante d'IL-13, soit une concentration de 3800 pg/ml pour le clone Ad-IL-13#2 et de 4500 pg/ml pour le clone 4T1-IL-13#7 (Fig. 15). Des études devront être réalisées afin d'évaluer l'activité biologique de l'IL-13 produite par nos constructions de vecteurs.

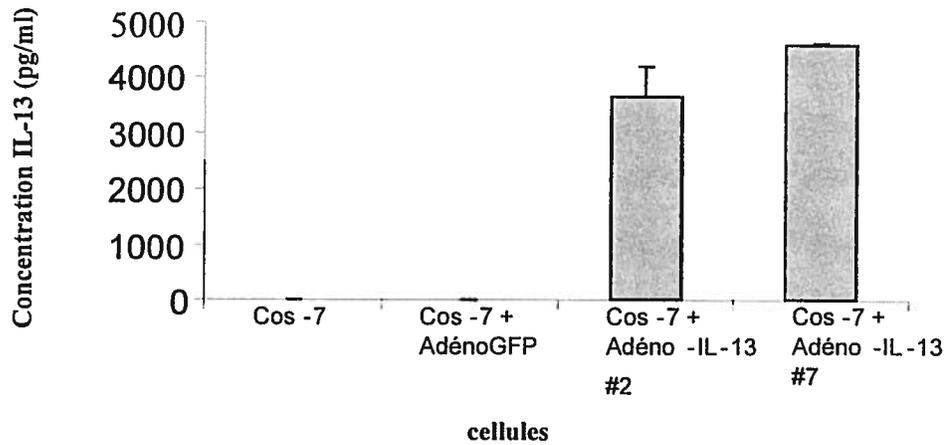


FIGURE 15- Production d'IL-13 par les vecteurs adénovirus

Les cellules COS-7 ont été utilisées pour générer des transfectants transitoires à partir des vecteurs adénovirus exprimant ou non l'IL-13. Deux clones exprimant l'IL-13 préalablement sélectionnés ont été utilisés pour les transfections, soit le clone Ad-IL-13#2 et le clone Ad-IL-13#7. Quarante-huit heures post-transfection, les surnageants cellulaires ont été recueillis afin de procéder à un test ELISA.

4.0 Discussion

La littérature rapporte que l'environnement péri-tumoral jouerait un rôle prépondérant dans l'évolution de la progression tumorale. Il est suggéré que les différentes cellules immunitaires recrutées à proximité ou à l'intérieur des tumeurs seraient bénéfiques à la croissance tumorale par la production et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, de métalloprotéases de la matrices et de réactifs nitrogénés et oxygénés (Coussens et Werb 2002). Tous ces médiateurs favoriseraient notamment la migration des cellules tumorales via la dégradation de la matrice extracellulaire et la surexpression de molécules d'adhésion. Ainsi, il est stipulé qu'un état d'équilibre entre les médiateurs pro et anti-inflammatoire dans l'environnement de la tumeur serait idéal pour contenir le développement des tumeurs. Si l'inflammation semble bénéfique à la progression tumorale, les mécanismes inhibant celle-ci seraient donc des avenues de choix dans le traitement du cancer. Pour cette raison, nous sommes intéressés à une cytokine reconnue pour ses actions anti-inflammatoires, soit l'IL-13, et avons étudié son influence sur le développement du lymphome T non-Hodgkinien de même que sur la dissémination des cellules tumorales 4T1, un modèle représentatif du cancer du sein.

Afin d'étudier l'effet *in vivo* de l'IL-13 sur la croissance tumorale, nous avons d'abord utilisé un modèle expérimental de lymphome T murin, soit le lymphome 267. Il s'agit d'un modèle de lymphomes radio-induits établi chez les souris C57BL/6. Des transfectants stables de cellules de lymphome 267 ont été générés à partir du vecteur d'expression $Sr\alpha$ contenant ou non l'ADNc de l'IL-13 murine. Ces cellules ont par la suite été injectées à des souris par différentes voies d'injection visant à étudier l'influence de l'IL-13 sur la croissance tumorale, la métastase du lymphome. Ces expériences ont permis de constater que l'IL-13 inhibait la croissance tumorale du lymphome et offrait donc une protection anti-tumorale aux souris. L'applicabilité de l'effet de l'IL-13 à d'autres cancers a également été investiguée (modèle 4T1). De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de mieux caractériser le modèle expérimental utilisé et déterminer le mécanisme utilisé par l'IL-13 pour induire une telle protection contre le développement de tumeurs. En second lieu, des efforts ont

été apportés dans le but de développer un système de livraison intra-tumorale de l'IL-13. Nous avons opté pour l'utilisation d'un vecteur adénoviral exprimant ou non l'ADNc de l'IL-13 que nous injecterons à des souris présentant une tumeur établie. Cette expérience permettra de déterminer si l'IL-13 a le potentiel pour entraîner la régression de tumeurs établies.

4.1 Prolifération de splénocytes

4.1.1 Inhibition de prolifération de splénocytes par le mélanome B16

Tout d'abord, nous avons effectué des études *in vitro* ciblant spécifiquement la prolifération lymphocytaire afin de déterminer, dans le cadre du modèle de lymphome, si l'IL-13 pouvait exercer un effet inhibiteur sur la fonction lymphocytaire. Une telle inhibition dans la prolifération des cellules immunitaires T et B aurait une conséquence majeure dans le cas de cancer, conférant la capacité des cellules tumorales à échapper à la surveillance immune et favorisant ainsi leur croissance, tel que rapporté par Kacani et al. et Young et al. (Young, Wright et al. 1996) (Young, Wright et al. 1996; Kacani, Wurm et al. 2003). Pour ce faire, nous avons réalisé plusieurs expériences indépendantes de prolifération lymphocytaire en présence de cellules tumorales 267 ou B16 irradiées; certaines utilisant des lymphocytes isolés de souris ayant reçu les cellules de lymphome témoin ou exprimant l'IL-13 plusieurs mois auparavant (souris sensibilisées) et d'autres utilisant des lymphocytes, stimulés ou non, provenant de souris naïves. L'irradiation a servi à empêcher la division des cellules tumorales et ainsi nous permettre de ne mesurer que la prolifération des lymphocytes suite à la co-culture. La stimulation des lymphocytes, citée ci-haut, provenant de souris naïves a été engendrée par l'ajout de Con A au milieu de culture. La Con A est un agent mitogène pour les cellules T, ce qui signifie que l'augmentation de prolifération observée pour les lymphocytes activés reflète spécifiquement une prolifération des cellules T. Pour ces expériences, nous avons choisi d'étudier l'impact de deux lignées de cellules tumorales, ne produisant pas d'IL-13, sur la prolifération de splénocytes. L'utilisation de ces cellules de lymphome (267) et de mélanome (B16) nous permettait ainsi de comparer les résultats obtenus pour notre

modèle d'intérêt qu'est le lymphome avec d'autres types de cancer et ce, dans le but de déterminer si les effets observés pour le lymphome pouvaient s'appliquer à d'autres cancers, notamment dans le cas de cellules tumorales exprimant des récepteurs de cette cytokine. Les résultats ont démontré que les cellules de lymphome 267 n'inhibaient pas la prolifération des lymphocytes alors que celles du mélanome B16 inhibaient la prolifération de ces derniers. Ces résultats suggèrent que l'effet anti-tumoral de l'IL-13 n'est probablement pas dû à sa capacité à inhiber la réponse des lymphocytes T. Des expériences utilisant des souris déficientes en lymphocytes T (par exemple les souris *nu/nu* ou Rag-déficientes) vont être utilisées pour confirmer cette hypothèse. Ces expériences sont présentement en cours dans notre laboratoire.

4.1.2 Identification de la molécule immunosuppressive

Bien que les expériences de prolifération ne nous aient pas renseignés sur un effet de l'IL-13 sur les cellules T, les résultats obtenus avec les cellules B16 illustrent de façon nette la capacité des cellules tumorales à interagir avec les cellules péri-tumorales, notamment au niveau des fonctions lymphocytaires. Nous avons investigué le phénomène davantage malgré le fait que le sujet s'éloignait de notre problématique. Ainsi, nous avons voulu identifier la molécule immunosuppressive produite par les cellules de mélanome B16. Pour ce faire, nous avons extrait l'ARN de cellules tumorales 267, B16 et 4T1, 4T1 étant un troisième modèle utilisé dans notre laboratoire pour étudier l'influence de l'IL-13 *in vivo*. A partir de ces ARN, nous avons amplifié le gène d'une molécule immunosuppressive bien connue et la plus susceptible, selon nous, d'exercer les effets observés, soit le TGF β 1. Il existe trois isoformes de TGF β (TGF β 1 à 3). Nous avons testé l'expression du TGF β 1 puisque ce dernier supprime la prolifération et la différenciation des cellules T et B (Opal et DePalo 2000) et que Conrad et al. (1999) ont démontré que les tumeurs primaires de mélanome exprimaient le TGF β 1 dans des proportions variables dépendamment de l'état progressif ou régressif de ces dernières. Les résultats obtenus démontrent que les trois types de cellules tumorales étudiées (267, B16 et 4T1) expriment le TGF β 1; les cellules 267 et B16 exprimant un niveau comparable de TGF β 1 et 4T1, un niveau légèrement plus faible. Le fait que les cellules 267 expriment autant de TGF β 1 que les cellules de mélanome B16 laisse

supposer que le TGF β 1 n'est pas responsable de l'immunosuppression induite par les cellules de mélanome. Par contre, Conrad et al. ont également rapporté une expression différentielle d'IL-10, une autre cytokine anti-inflammatoire et immunosuppressive, à proximité des tumeurs primaires, progressives ou régressives, de mélanome. Ainsi, il serait important de tester l'expression de l'IL-10 par nos cellules de mélanome en comparaison avec les cellules de lymphome 267 et de carcinome mammaire 4T1. Nous pourrions, de plus, avoir recours à des approches basées sur la protéomique ou faisant appel à des banques d'ADNc générées à partir des cellules B16 et ce, en utilisant l'effet inhibiteur de lymphocytes T *in vitro* comme méthode de criblage.

4.1.3 Influence des cellules tumorales sur la prolifération de splénocytes activés

Les expériences antérieures ont été réalisées à partir de lymphocytes non-activés ou activés par la Con A, ce qui entraîne la prolifération accrue des cellules T de la rate. Les résultats ont démontré que l'inhibition de la prolifération par les cellules de mélanome survenait seulement lorsque les cellules T étaient activées. Nous avons donc testé la stimulation des cellules T par une autre voie de stimulation, soit celle du TCR et ce, via l'utilisation d'anticorps α -CD3 ϵ . Les lymphocytes ont également été placés en présence de l'anticorps MAR18.5 (IgG de souris anti-rat) en guise de témoin. Les résultats ont permis de constater que les cellules de mélanome inhibaient également la prolifération des cellules T activées via la voie de signalisation du TCR, signifiant que la molécule immunosuppressive pourrait inhiber l'activation des lymphocytes T suite à la présentation d'antigène tumoraux.

4.1.4 Influence des cellules tumorales sur la prolifération de divers types cellulaires

Nous avons voulu nous assurer de la capacité des cellules de mélanome B16 à inhiber à la prolifération de types cellulaires autres que les lymphocytes T. Pour ce faire, nous avons placé en co-culture des cellules tumorales B16 ou 267 et différents types cellulaires, activés ou non, tels que des cellules endothéliales, des cellules de lymphome B murin et de carcinome mammaire. Les résultats ont démontré que les cellules de mélanome diminuaient la prolifération des cellules de lymphome B et de lymphome T. Ces résultats nous laisse présager que ces dernières exerceraient le même effet sur les

contreparties saines de ces cellules, soit des cellules B et des cellules T. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus lors des expériences de prolifération des lymphocytes en co-culture avec les cellules de mélanome B16. Les cellules de lymphome 267, tout comme les résultats obtenus précédemment avec ces cellules, n'ont entraîné aucune inhibition de prolifération chez les types cellulaires étudiés.

4.2 Caractérisation *in vivo* de l'effet de l'IL-13 sur le recrutement leucocytaire.

4.2.1 Modèle de la poche d'air murine

Le modèle de la poche d'air murine a été utilisé dans le but de déterminer l'influence de l'IL-13 sur le recrutement de différentes populations leucocytaires. Ce modèle est un modèle *in vivo* bien utilisé pour ce genre d'expérience, principalement dans le cadre d'expériences de recrutement de neutrophiles suite à une injection de LPS à l'intérieur de la poche d'air. Le recrutement des populations de cellules NK, de cellules T de l'hôte et de macrophages/monocytes a été étudié suite à l'injection de cellules de lymphome témoin (267-S α #24) ou de cellules de lymphome exprimant l'IL-13 (267-IL-13#25). Les proportions de cellules immunitaires contenues dans la poche d'air des souris ayant reçu les cellules exprimant l'IL-13 ont été comparées avec celles obtenues pour les souris ayant reçu les cellules témoins. De cette comparaison, il est possible de constater que l'IL-13 n'avait exercé aucun effet sur le recrutement des diverses populations étudiées. L'expérience nous a tout de même permis d'observer ce que la littérature rapporte, voulant que la présence de cellules tumorales attire une grande quantité de cellules immunitaires (Coussens et Werb 2002). Dans notre cas, le recrutement leucocytaire est certainement dû à l'inflammation causée par la présence de cellules tumorales, puisque des études réalisées par le groupe du professeur Denis Girard ont démontré que le recrutement de leucocytes était négligeable suite à l'injection de PBS (Pelletier, Roberge et al. 2001). Des résultats similaires ont été obtenus dans des expériences préliminaires par notre groupe. Les conséquences de ce recrutement pourraient être bénéfiques à la progression tumorale par le relargage de médiateurs pro-

inflammatoires, comme il l'a été décrit précédemment, ou avoir un effet destructeur sur la croissance tumorale étant donné la présence de cellules cytotoxiques, NK, macrophages à proximité de la tumeur; ces cellules ayant la capacité de repérer, de phagocyter et d'éliminer les cellules transformées. Les résultats obtenus avec les cellules exprimant l'IL-13 démontrent que cette dernière ne présente pas de propriétés chimioattractrices qui pourrait expliquer son effet protecteur contre le lymphome, par une sous-population cellulaire précise.

Les réactions de RT-PCR réalisées sur ces mêmes cellules de la poche d'air n'ont démontré aucune influence de l'IL-13 sur l'expression du gène de MMP-9. Malgré le fait que la littérature stipule le contraire, les résultats illustrés à la figure 7C démontrent que l'expression de MMP-9 a été induite dans la poche d'air et ce, si on compare avec l'expression basale de MMP-9 produite par les cellules 267 parentales. La littérature rapporte que l'IL-13 diminuerait la production de MMP-9 en inhibant la voie de signalisation de l'IL-1/TNF α . Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que, dans notre modèle, l'IL-13 n'inhiberait pas cette voie. De plus, les résultats ne nous permettent pas de savoir si cette induction de MMP-9 provient des cellules tumorales elles-mêmes suite à une stimulation quelconque ou plutôt des nombreuses cellules immunitaires recrutées à l'intérieur de la poche d'air. Finalement, les résultats de zymographie visant à détecter la sécrétion de MMP-9 et MMP-2 à l'intérieur de la poche d'air ont démontré que l'IL-13 n'était pas apte à inhiber la sécrétion de ces deux MMPs. Ces résultats confirment ceux obtenus au niveau transcriptionnel pour l'expression de MMP-9. Cependant, au meilleur de nos connaissances, l'ensemble de ce travail nous a permis de développer un nouveau modèle unique pour l'étude de recrutement leucocytaire par les cellules tumorales, le modèle de poche d'air murine étant généralement utilisé pour étudier l'inflammation causée par différents composés chimiques, environnementaux ou biologiques. Ce modèle pourrait permettre de mesurer l'effet d'inhibiteurs potentiels spécifiques aux mécanismes de migration aux sites tumoraux.

4.2.2 Influence de l'IL-13 sur l'expression génique de MMPs et de médiateurs pro-inflammatoires

Nous avons étudié l'influence de l'IL-13 sur l'expression de gènes connus pour être régulés par celle-ci. Les gènes codant pour les MMPs et les médiateurs pro-inflammatoires seraient susceptibles à une régulation par l'IL-13. Ainsi, cette dernière aurait la capacité d'inhiber la transcription de ces gènes. De ce fait, nous nous serions attendus à observer une diminution de l'expression des MMPs et des médiateurs pro-inflammatoires suite à une injection d'IL-13. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons injecté des souris par la voie i.d. avec des cellules de lymphome exprimant ou non l'IL-13. Les résultats obtenus suite à cette expérience n'ont pu démontrer une diminution de l'expression du gène des MMPs (MMPs-3-9-10-17) ni du gène codant pour le TNF α (résultats non-présentés). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'IL-13 n'aurait pas la capacité d'inhiber ces gènes. L'influence potentielle de l'IL-13 sur l'expression des MMPs s'avérait intéressante dans notre cas étant donné leur implication de plus en plus reconnue en ce qui concerne la métastase des cancers (plus particulièrement celle de MMP-9). En effet, des expériences réalisées au sein de notre laboratoire et d'autres laboratoires ont permis d'établir l'implication des MMPs dans la métastase des cellules tumorales puisque 1) les MMPs dégradent les composantes de la matrice extracellulaire et éliminent donc les barrières physiques des cellules 2) les MMPs modulent l'adhésion 3) les MMPs peuvent agir sur des composantes de la matrice extracellulaire ou d'autres protéines et ainsi découvrir des fonctions biologiques dissimulées (Kleiner et Stetler-Stevenson 1999).

Ces propriétés des MMPs assurent à ces dernières une implication majeure dans la théorie de la métastase tumorale en trois étapes voulant que cette dernière soit rendue possible par 1) une adhésion cellulaire 2) une dégradation de la matrice (protéolyse) et 3) une migration (Liotta, 1992). Une diminution de l'expression de MMP-9 aurait pu laisser présager que l'effet protecteur de l'IL-13 était dû à une diminution de la capacité des cellules à se disséminer, permettant ainsi leur élimination sur place par les cellules immunitaires recrutées par les cellules tumorales. La littérature a rapporté que le modèle d'injection i.d. provoquait une réponse immunitaire au site d'injection (Bonnotte, Gough

et al. 2003), ce qui expliquerait la forte expression de MMP-9 observée suite à l'injection de cellules témoins, de cellules exprimant l'IL-13 et de PBS en guise de témoin négatif. Puisqu'une forte expression de MMP-9, similaire à celle observée suite à l'injection de cellules tumorales, a pu être observée suite à l'injection de PBS, il est fort possible que le simple fait d'injecter suffise à créer une réponse inflammatoire, recrutant des cellules immunitaires pouvant produire et sécréter MMP-9.

Suite à cela, nous avons eu recours à un autre modèle d'injection *in vivo*, toujours dans le but de déterminer l'influence de l'IL-13 sur l'expression des MMPs et des médiateurs pro-inflammatoires. Ce modèle utilisé consistait en l'injection i.t. de cellules de lymphome témoin ou exprimant l'IL-13. Le thymus est un organe composé de plusieurs types cellulaires dont 99% représentent des thymocytes et le 1% restant des cellules épithéliales, fibroblastes, cellules dendritiques, etc. Ce modèle d'injection i.t. présente l'avantage que, le thymus étant un organe clos où peu de cellules ont accès, le risque de contamination dans l'expression des gènes étudiés par différents types cellulaires s'en trouve réduit. De plus, des expériences antérieures menées dans notre laboratoire et réalisées à partir d'injections i.t. avec ces cellules de lymphome ont montré un effet protecteur de l'IL-13 chez les souris ayant reçu les cellules l'exprimant. Ce modèle présente toutefois certains désavantages, notamment au niveau de la difficulté de l'opération nécessaire aux injections intra-thymiques. Des résultats similaires à ceux obtenus lors du modèle d'injection i.d. pour l'expression de MMP-9 ont été obtenus par ce modèle. L'expression des gènes des MMPs-3-9-10-17 et du TNF α a également été étudiée dans ce modèle et aucune influence de l'IL-13 n'a pu être observée (résultats non-présentés). Il semblerait que l'IL-13 ne puisse inhiber la voie du TNF α , du moins dans le type de cellules que nous avons étudié.

4.2.3 Analyse génomique de l'influence de l'IL-13 *in vivo*

Suite à ces expériences utilisant la stratégie d'étude de gènes cibles pouvant être régulés par l'IL-13, nous avons choisi de développer une méthode d'analyse génomique nous permettant d'étudier plus de 1000 gènes simultanément. Ainsi, nous avons injecté différentes doses d'IL-13 recombinante murine allant de 0 ng d'IL-13 soit du PBS,

0,1 ng, 1 ng, 10 ng d'IL-13 par lobe et ce, via la voie i.t. Nous avons eu recours au modèle i.t. pour les mêmes raisons que précédemment énumérées. Dans ce cas-ci, bien que les matrices d'ADNc ne contiennent pas tous les gènes potentiels, leur utilisation sert néanmoins à orienter nos recherches vers des voies d'activation susceptibles d'être régulés par l'IL-13 et pouvant être impliquées dans le développement tumoral. Ces matrices contiennent chacune les ADNc spécifiques de 1176 gènes connus chez la souris, représentant environ 3,3 % de tous les gènes codant pour des protéines connus du génome de la souris (Wadhwa, Zielske et al. 2002). De plus, nous sommes conscients du fait que les effets observés sur l'expression génique des thymocytes sont indirects puisque ces derniers n'expriment pas les récepteurs fonctionnels de l'IL-13. Les effets de l'IL-13 injectée se doivent d'être exercés sur les cellules épithéliales, fibroblastes, cellules dendritiques présentes dans le thymus et qui, elles, possèdent le récepteur fonctionnel. Ainsi, 2 souris ont été injectées avec chaque dose d'IL-13 dans le but de minimiser les variations reliées aux individus. Les résultats obtenus à partir des thymus injectés avec les doses d'IL-13 croissantes ont été comparés à ceux obtenus avec les autres doses d'IL-13 afin d'établir une corrélation entre la dose d'IL-13 et la réponse induite. De tous les changements observés dans l'expression génique des cellules thymiques, seulement un faible nombre d'entre eux a été retenu. Pour ce faire, nous sommes fixés certains critères de sélection. Tout d'abord, nous avons sélectionné les gènes dont la modulation de l'expression était visible à l'œil nu sur les membranes. Ensuite, nous avons ajouté un critère voulant que seuls les gènes dont la modulation était parfaitement ou presque dose-dépendante soient retenus et finalement, ceux dont l'expression était la plus fortement modulée. Des gènes dont l'expression était modulée à la hausse ont été observés, mais aucun ne répondait totalement aux critères de sélection. Seuls des gènes étant régulés à la baisse par l'IL-13 ont donc été retenus. Le tableau V regroupe les différents gènes retenus et plus précisément ceux pouvant être associés au développement tumoral, tels que ALY, BAX alpha, BAG 1, cathepsine D, ligand de P-sélectine, intégrine $\beta 7$, CXCR4.

Les gènes sélectionnés possèdent plusieurs propriétés ou caractéristiques pouvant leur conférer une implication au niveau du cancer. Les cathepsines forment une famille

de protéases capables de dégrader les composantes de la matrice extracellulaire, d'où leur implication potentielle dans la dissémination des cellules tumorales. Il existe plusieurs cathepsines dont certaines ont déjà été associées à l'agressivité tumorale. C'est le cas entre autres pour la cathepsine B qui a vu son activité augmenter de 2 à 7 fois chez les cellules de mélanome hautement métastatique B16-F10 comparativement aux cellules de mélanome parentales B16-F1 (Price, Bonovich et al. 1997). Dans le cas de la cathepsine L, une corrélation a été établie entre le potentiel métastatique et la quantité d'ARN de celle-ci détectée chez les cellules transformées par c-Ha-ras (Price, Bonovich et al. 1997). Finalement, la cathepsine D est associée avec la métastase des cellules de cancer du sein (Price, 1997). Ainsi, une diminution de l'expression de la cathepsine D, telle qu'observée sur les matrices d'ADNc, pourrait réduire la protéolyse induite par les cellules tumorales ou péri-tumorales et nuirait à la dissémination des cellules tumorales.

Les intégrines, quant à elles, font partie d'une famille de molécules d'adhésion principalement retrouvées à la surface des leucocytes. Elles promouvoient la migration de ces dernières à des sites d'inflammation. Les intégrines sont constituées de deux sous-unités, soit une sous-unité α et une sous-unité β (Kreis 1999). Dans le cas de l'intégrine $\beta 7$, elle existe sous la forme $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha E\beta 7$. $\alpha 4\beta 7$ est présente sur la plupart des lymphocytes présents dans les ganglions lymphatiques et sur certaines cellules T mémoire (Kreis 1999). Elle permet l'adhésion cellulaire à MadCAM-1, lequel est exprimé sur l'endothélium des veinules des plaques de Peyer et sur l'endothélium des veinules post-capillaires. $\alpha E\beta 7$ est retrouvé, quant à elle, sur plus de 90% des lymphocytes présents dans les épithéliums et sur 45-50% des lymphocytes de la lamina propria. Elle permet l'adhésion cellulaire via la liaison à la E-cadhérine, exprimée à la surface des cellules épithéliales (Kreis 1999). Il est donc possible d'envisager qu'une diminution de l'expression des intégrines $\beta 7$ entraînerait une diminution de l'adhésion cellulaire à l'endothélium vasculaire, réduisant ainsi la dissémination des cellules tumorales.

Les chimiokines sont des molécules contrôlant principalement la migration cellulaire, la surveillance immunitaire, la circulation des lymphocytes. Elles sont

regroupées en 4 sous-familles, selon l'arrangement de leurs résidus cystéine (C) : CC, CXC, C et CX₃C. La majorité d'entre elles appartient aux CXC et aux CC chimiokines (Laing et Secombes 2004). Par leurs diverses fonctions, les chimiokines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques normaux et pathologiques tel que le cancer. En effet, elles peuvent exercer des effets directs en agissant comme facteur de croissance autocrine pour les cellules tumorales, ou des effets indirects en favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, sur la croissance tumorale, l'angiogénèse et la migration des cellules métastatiques (Vicari et Caux 2002). Plusieurs études visent à approfondir l'implication des chimiokines dans différents types de cancer. Des études, réalisées par Muller et al. portant sur l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs chez les patientes atteintes d'un cancer du sein ont permis de constater que le récepteur CXCR4, récepteur de la chimiokine SDF-1 ou CXCL12, était très fortement exprimé chez les tumeurs malignes alors qu'il ne l'était pas dans les tissus mammaires normaux. Le traitement par injection d'anticorps monoclonaux anti-CXCR4 à des souris immunodéficientes ayant reçu des cellules de carcinome mammaire a démontré une inhibition de la métastase au niveau des poumons et des ganglions lymphatiques (Muller, Homey et al. 2001). Ainsi, une diminution de l'expression de CXCR4 semblerait inhiber la métastase des cellules cancéreuses.

BAX alpha et BAG 1 constituent des molécules s'associant à Bcl-2, une molécule anti-apoptotique. BAX se veut une molécule pro-apoptotique alors que BAG 1 est plutôt une molécule anti-apoptotique (Takayama, Sato et al. 1995) (Oltvai, Milliman et al. 1993). Tout dépendant de la proportion et de la quantité de chaque molécule retrouvées au site de la tumeur, cette dernière sera affectée ou non par le processus de l'apoptose.

Les sélectines sont des molécules d'adhésion permettant le contact entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire, favorisant ainsi l'adhésion à l'endothélium par le roulement des leucocytes. Il existe trois membres de la famille des sélectines, chacun ayant un degré d'expression variable chez les leucocytes pour les L-sélectines, chez les plaquettes et cellules endothéliales pour les P-sélectines et chez les cellules endothéliales pour les E-sélectines (Price, Bonovich et al. 1997). Les ligands des sélectines sont

principalement des glycoprotéines sialylées (Pierres 1999). Ainsi, la diminution de l'expression du ligand de P-sélectine aurait comme conséquence, une diminution de l'adhésion cellulaire à l'endothélium vasculaire et par le fait même, une diminution de l'extravasation et de la métastase, tel que ce serait également le cas pour les intégrines. Finalement, ALY est un co-activateur requis pour les fonctions du TCR alpha. Une diminution de l'expression génique du TCRA pourrait donc entraîner une diminution de l'activation des cellules T (Bruhn, Munnerlyn et al. 1997).

4.2.4 Influence de l'IL-13 sur la métastase du lymphome T agressif

L'effet de l'IL-13 ayant été étudié pour la croissance tumorale du lymphome T 267, nous avons voulu vérifier l'effet de l'IL-13 sur la métastase d'un variant agressif du lymphome, soit le lymphome S19. Pour ce faire, nous avons injecté des souris mâles, puisqu'il a été démontré que ces derniers étaient plus susceptibles à la dissémination du lymphome (Society Of Leukemia & Lymphoma 2001), via la veine de la queue et avons suivi l'évolution de la maladie par des observations hebdomadaires. Lorsque des signes cliniques de la maladie étaient détectés, les souris étaient sacrifiées. Les résultats n'ont pas permis de démontrer un effet protecteur de l'IL-13, malgré le fait que la production d'IL-13 par les transfectants de lymphomes agressifs et non-agressifs est comparable, en ce qui concerne la métastase des cellules de lymphome agressif. Ces cellules agressives expriment et produisent une très forte expression de MMP-9 (Lalancette, Aoudjit et al. 2000) et tel que la littérature le rapporte, la simple présence de cellules tumorales entraîne le recrutement de cellules immunitaires produisant elles aussi des MMPs, conférant aux cellules de lymphome S19 une capacité grandement accrue à se disséminer. L'IL-13 étant incapable de diminuer la production de MMPs, dans notre modèle, il est possible qu'une si forte expression de ces dernières (ex : MMP-9) puisse surpasser l'effet protecteur induit par l'IL-13 et laisser libre cours à la migration et la croissance des cellules tumorales. L'utilisation de doses plus importantes d'IL-13 pourrait peut-être nuire davantage à la métastase.

4.3 Résultats *in vivo*

4.3.1 Carcinome mammaire 4T1

Le modèle 4T1 est utilisé puisqu'il est représentatif du cancer du sein. Nous avons, une fois de plus, utilisé un modèle d'injection *in vivo* afin de déterminer l'influence de l'IL-13 sur la croissance du carcinome mammaire murin. Nous avons injecté des cellules exprimant ou non l'IL-13 à des souris femelles par la voie s.c. au niveau de la glande mammaire puisque le modèle est ainsi documenté. Deux clones exprimant l'IL-13 ont été testés et il semblerait que l'IL-13 ralentisse le développement tumoral des cellules de carcinome mammaire.

Le ralentissement du développement tumoral des cellules de carcinome mammaire en comparaison avec l'inhibition de la croissance tumorale des cellules de lymphome T pourrait s'expliquer par la présence du récepteur fonctionnel de l'IL-13 chez les cellules 4T1, tel qu'illustré à la figure 11, alors que les cellules de lymphome ne le possède pas. Ainsi, l'IL-13 pourrait exercer des effets autocrines sur les cellules de carcinome mammaire suite à la liaison de son récepteur expliquant l'effet protecteur partiel observé alors que l'IL-13 posséderait une action indirecte sur les cellules de lymphome T, vu leur récepteur de l'IL-13 non-fonctionnel, en activant des cellules environnantes qui, elles, posséderaient le récepteur de l'IL-13. Ainsi, malgré le fait que l'IL-13 ne semble pas apte à inhiber complètement le développement tumoral dans le cas du carcinome mammaire, cette dernière pourrait être utilisée en combinaison avec d'autres traitements anti-tumoraux, permettant ainsi de stabiliser la taille des tumeurs et permettre une meilleure destruction de celles-ci.

4.4 Construction d'un vecteur adénoviral exprimant l'IL-13

Les résultats présentés précédemment démontrent une capacité de l'IL-13 à prévenir le développement tumoral ou du moins à le ralentir. Par contre, il s'avère important, dans l'optique de développer de nouvelles approches thérapeutiques, de pouvoir reproduire les situations cliniques, au cours desquelles un patient se présenterait

chez son médecin alors que la tumeur est déjà présente. Nous devions donc penser à développer un système de livraison de l'IL-13 intra-tumorale afin d'évaluer le potentiel de l'IL-13 à entraîner la régression de tumeurs. Plusieurs options s'offraient à nous, mais nous avons choisi de développer un vecteur qui nous permettrait éventuellement de développer un système de livraison intra-tumorale. Étant donné la capacité des vecteurs viraux à infecter un vaste spectre de cellules, l'expression du gène d'intérêt par ces vecteurs serait donc massive. De plus, la production de ces vecteurs est simple et relativement peu coûteuse comparativement à la production de cytokines recombinantes. Par contre, la production de vecteurs pourrait s'avérer plutôt onéreuse aux normes de l'industrie pharmaceutique. L'infection de cellules tumorales ou péri-tumorales par le vecteur viral exprimant le gène d'intérêt permettrait également une expression plus continue de notre gène. Nous aurions pu procéder par l'injection intra-tumorale de l'IL-3 recombinante. Par contre, cette alternative semble peu intéressante étant donné le coût élevé de production. De plus, des études ont démontré que l'effet de la cytokine recombinante injectée était grandement influencé par plusieurs facteurs. A cet effet, des études réalisées à partir d'injection d'IL-12 ont démontré que l'effet de cette dernière dépendait du moment de l'injection, de l'environnement de la tumeur, etc. Lors de ces études, l'injection d'IL-12 par voie intra-péritonéale permettait d'inhiber la croissance tumorale, mais seulement lorsque l'IL-12 était injectée très tôt après l'inoculation des cellules tumorales (Kobayashi, Shiiba et al. 2002). L'efficacité du traitement dépendrait également du type de cellules cancéreuses concernées et dépendrait de la dose de la cytokine injectée, notamment dans le cas du mélanome B16-F10 (Colombo et Trinchieri, 2002). La voie d'injection influencerait également l'efficacité de la thérapie. Il semblerait que l'IL-12 injectée par voie intraveineuse n'exerce aucun effet sur la croissance s.c. du carcinome du colon C26, mais inhiberait la métastase hépatique lorsque les cellules sont injectées par voie intra-splénique (Colombo et Trinchieri, 2002). De plus, lors d'essais cliniques avec l'IL-12 recombinante, une cytotoxicité importante a été rapportée suite aux injections de cette dernière par voie intraveineuse (Colombo et Trinchieri 2002). Dans notre cas, une injection d'IL-13 recombinante par voie systémique aurait des répercussions importantes sur la santé des patients étant donné qu'il a été rapporté qu'une surexpression généralisée de l'IL-13 par des agents

pharmacologiques entraînait une hypersensibilité des voies respiratoires, de l'asthme, une production de mucus (Pope, Brandt et al. 2001) (Li, Xia et al. 1999) et pourrait certainement causer une immunosuppression généralisée. Pour toutes ces raisons, nous avons jugé que l'utilisation d'un vecteur viral pour livrer l'IL-13 était plus appropriée.

Afin d'identifier le vecteur viral adéquat pour nos études, des expériences d'infection de cellules de lymphome 267 ont été réalisées à partir de trois virus, soit adénovirus, AAV₂ et rétrovirus. Malgré le fait que les résultats aient démontré que l'AAV₂ et l'adénovirus pouvaient, tous deux, infecter les cellules de lymphome, nous avons choisi de poursuivre notre étude avec le vecteur adénovirus parce que contrairement aux vecteurs AAV₂, aucun cas d'intégration dans le génome des cellules n'a été répertorié (Lai, Lai et al. 2002) et parce qu'il s'est déjà avéré efficace dans le cadre d'études portant sur le cancer. De nombreuses études ont déjà été réalisées à partir d'injections intra-tumorale de vecteurs adénovirus exprimant un gène donné et celles-ci ont démontré une diminution de la taille de la tumeur suite à leur injection. De telles expériences ont entre autres été réalisées à partir de vecteur adénovirus contenant l'ADNc de l'IL-12 ou de NK4, une molécule anti-angiogénique (Kikuchi, Maemondo et al. 2002) (Zhang et DeGroot 2003).

Jusqu'à présent, le gène de l'IL-13 murine a été intégré dans le vecteur adénoviral, gracieusement fourni par le Dr Bernard Massie, et la capacité de ces vecteurs à produire efficacement et suffisamment l'IL-13 a été évaluée par un test ELISA. Les résultats ont démontré une grande production d'IL-13 par les vecteurs adénovirus construits. Nous sommes toutefois conscients que de nombreux paramètres devront être établis ou modifiés avant de pouvoir procéder aux expériences *in vivo*, notamment les vecteurs adénovirus recombinants devront être générés et produits en quantité suffisante. Une fois les vecteurs produits, nous pourrons procéder à des essais *in vivo* visant à injecter ces vecteurs, exprimant ou non l'IL-13, directement dans des tumeurs déjà établies.

5.0 Conclusions et Perspectives

Nous avons démontré via l'utilisation d'un modèle expérimental de lymphome T murin que l'introduction de l'ADNc de l'IL-13 murine dans ces cellules tumorales inhibait la croissance tumorale du lymphome T. Nous devions donc tenter de déterminer le mécanisme utilisé par l'IL-13 pour induire une telle protection contre le cancer. Ainsi, plusieurs expériences *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées. L'ensemble de nos expériences nous a permis d'établir que 1) les cellules de lymphome T 267 n'exerçaient aucun effet sur la prolifération de lymphocytes T fraîchement isolés de souris C57BL/6 alors que les cellules de mélanome inhibaient leur prolifération, 2) les cellules de mélanome B16 inhibaient la prolifération de splénocytes via une molécule soluble, 3) la molécule produite par les cellules de mélanome et inhibant la prolifération des splénocytes n'était pas le TGF β 1, 4) les cellules de mélanome pouvaient inhiber la prolifération d'autres types cellulaires murins tels que les cellules de lymphome B et de lymphome T alors que les cellules de lymphome ne présentaient aucun effet sur la prolifération d'aucun des types cellulaires étudiés, 5) la stimulation des cellules T par la Con A et via la voie de signalisation du TCR n'empêchait pas l'inhibition de prolifération des lymphocytes T. Quant aux expériences *in vivo*, elles nous ont permis de déterminer que : 1) l'IL-13 n'exerçait aucun effet sur le recrutement leucocytaire, 2) l'IL-13 ne possédait pas la capacité à inhiber la transcription des gènes codant pour les MMPs et des médiateurs pro-inflammatoires (TNF α), 3) l'IL-13 ne possédait aucune influence sur la sécrétion de MMP-2 et MMP-9, 4) l'expression génique de plusieurs gènes déjà associés au cancer pouvait être régulée à la baisse par l'IL-13, 5) l'IL-13 ne pouvait surpasser le pouvoir hautement métastatique du lymphome agressif S19, 6) l'IL-13 ralentissait la croissance du carcinome mammaire alors que l'effet sur la croissance tumorale du mélanome B16 était plutôt incertain. Finalement, en ce qui a trait au développement d'un système de livraison intra-tumoral de l'IL-13, les expériences menées nous ont permis de démontrer que : 1) le vecteur viral le plus adéquat était le vecteur adénoviral, 2) le clonage de l'IL-13 dans les vecteurs adénovirus permettait la production de l'IL-13.

Ultérieurement, des expériences pourraient être entreprises afin de finaliser la caractérisation du mécanisme utilisé par l'IL-13 afin d'induire une protection contre le

développement tumoral. Notamment, l'expression des différents gènes semblant être modulée par l'IL-13 lors de l'expérience avec les matrices d'ADNc pourra être confirmée au niveau transcriptionnel par des réactions de RT-PCR et au niveau protéique par la technique d'immunobuvardage de type Western. De plus, les études portant sur les vecteurs adénovirus exprimant ou non l'IL-13 devront être poursuivies par la production et la purification des vecteurs viraux pour finalement pouvoir les injecter par voie intratumorale chez la souris.

Références

Adams, S. W. and S. G. Emerson (1998). "Gene therapy for leukemia and lymphoma." Hematol Oncol Clin North Am **12**(3): 631-48.

Aoudjit, F., P. O. Esteve, et al. (1997). "Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma." Int J Cancer **71**(1): 71-8.

Aoudjit, F., S. Masure, et al. (1999). "Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma." Int J Cancer **82**(5): 743-7.

Aoudjit, F., E. F. Potworowski, et al. (1998). "Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event." J Immunol **161**(5): 2333-8.

Aoudjit, F., E. F. Potworowski, et al. (1998). "The metastatic characteristics of murine lymphoma cell lines in vivo are manifested after target organ invasion." Blood **91**(2): 623-9.

Aslakson, C. J. and F. R. Miller (1992). "Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor." Cancer Res **52**(6): 1399-405.

Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" Lancet **357**(9255): 539-45.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.

Bergers, G., R. Brekken, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis." Nat Cell Biol **2**(10): 737-44.

Bernhard, E. J., S. B. Gruber, et al. (1994). "Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4293-7.

Bonnotte, B., M. Gough, et al. (2003). "Intradermal injection, as opposed to subcutaneous injection, enhances immunogenicity and suppresses tumorigenicity of tumor cells." Cancer Res **63**(9): 2145-9.

Brigati, C., D. M. Noonan, et al. (2002). "Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes?" Clin Exp Metastasis **19**(3): 247-58.

Brown, K. D., S. M. Zurawski, et al. (1989). "A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes." J Immunol **142**(2): 679-87.

Bruhn, L., A. Munnerlyn, et al. (1997). "ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function." Genes Dev **11**(5): 640-53.

Canada (gouvernement), N. C. I. o. (2002). "Canadian Cancer Statistics 2002."

Chang, E. Y., C. H. Chen, et al. (2000). "Antigen-specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogeneic tumor cell-based vaccine." Int J Cancer **86**(5): 725-30.

Chen, B., T. M. Timiryasova, et al. (2001). "Low-dose vaccinia virus-mediated cytokine gene therapy of glioma." J Immunother **24**(1): 46-57.

Chomarat, P. and J. Banchereau (1998). "Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies." Int Rev Immunol **17**(1-4): 1-52.

Coligan, J., Kruisbeek, AM, Margulies, DH, Shevach, EM, Strober, W (2000). Current Protocols in Immunology. New York, John Wiley & Sons, Inc.

Colombo, M. P. and G. Trinchieri (2002). "Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy." Cytokine Growth Factor Rev **13**(2): 155-68.

Coussens, L. M., C. L. Tinkle, et al. (2000). "MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis." Cell **103**(3): 481-90.

Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-7.

Doherty, T. M., R. Kastelein, et al. (1993). "Modulation of murine macrophage function by IL-13." J Immunol **151**(12): 7151-60.

Fidler, I. J. and M. L. Kripke (1977). "Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor." Science **197**(4306): 893-5.

Gately, M. K., A. G. Wolitzky, et al. (1992). "Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12." Cell Immunol **143**(1): 127-42.

Goetzl, E. J., M. J. Banda, et al. (1996). "Matrix metalloproteinases in immunity." J Immunol **156**(1): 1-4.

Green, N. K. and L. W. Seymour (2002). "Adenoviral vectors: systemic delivery and tumor targeting." Cancer Gene Ther **9**(12): 1036-42.

Hooper, N. M., E. H. Karran, et al. (1997). "Membrane protein secretases." Biochem J **321 (Pt 2)**: 265-79.

Huang, X., M. K. Wong, et al. (2002). "Combined therapy of local and metastatic 4T1 breast tumor in mice using SU6668, an inhibitor of angiogenic receptor tyrosine kinases, and the immunostimulator B7.2-IgG fusion protein." Cancer Res **62(20)**: 5727-35.

Ito, A., A. Mukaiyama, et al. (1996). "Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases." J Biol Chem **271(25)**: 14657-60.

Itoh, T., M. Tanioka, et al. (1999). "Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice." Clin Exp Metastasis **17(2)**: 177-81.

Johnson, L. L., R. Dyer, et al. (1998). "Matrix metalloproteinases." Curr Opin Chem Biol **2(4)**: 466-71.

Kacani, L., M. Wurm, et al. (2003). "Immunosuppressive effects of soluble factors secreted by head and neck squamous cell carcinoma on dendritic cells and T lymphocytes." Oral Oncol **39(7)**: 672-9.

Kawakami, K., M. Kawakami, et al. (2001). "In vivo overexpression of IL-13 receptor alpha2 chain inhibits tumorigenicity of human breast and pancreatic tumors in immunodeficient mice." J Exp Med **194(12)**: 1743-54.

Kikuchi, T., M. Maemondo, et al. (2002). "Tumor suppression induced by intratumor administration of adenovirus vector expressing NK4, a 4-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, and naive dendritic cells." Blood **100(12)**: 3950-9.

Kleiner, D. E. and W. G. Stetler-Stevenson (1999). "Matrix metalloproteinases and metastasis." Cancer Chemother Pharmacol **43 Suppl**: S42-51.

Kobayashi, T., K. Shiiba, et al. (2002). "Interleukin-12 administration is more effective for preventing metastasis than for inhibiting primary established tumors in a murine model of spontaneous hepatic metastasis." Surg Today **32(3)**: 236-42.

Kossakowska, A. E., D. R. Edwards, et al. (1999). "Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas." Blood **94(6)**: 2080-9.

Kossakowska, A. E., S. A. Huchcroft, et al. (1996). "Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans." Br J Cancer **73(11)**: 1401-8.

Kreis, T., Vale, R (1999). Signaling via integrins. Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins.

- Kujas, G. e. a. (2000). "Current approaches to the lymphomas." Patient Care Canada **11(6)**: 67-76.
- Lai, C. M., Y. K. Lai, et al. (2002). "Adenovirus and adeno-associated virus vectors." DNA Cell Biol **21(12)**: 895-913.
- Lai, Y. H. and T. R. Mosmann (1999). "Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production." J Immunol **162(1)**: 78-87.
- Laing, K. J. and C. J. Secombes (2004). "Chemokines." Dev Comp Immunol **28(5)**: 443-60.
- Lalancette, M., F. Aoudjit, et al. (2000). "Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells." Blood **95(1)**: 314-9.
- Li, L., Y. Xia, et al. (1999). "Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells." J Immunol **162(5)**: 2477-87.
- Lieberman, M., A. Decleve, et al. (1979). "Establishment, characterization and virus expression of cell lines derived from radiation- and virus-induced lymphomas of C57BL/Ka mice." Int J Cancer **24(2)**: 168-77.
- Liotta, L. A. (1992). "Cancer cell invasion and metastasis." Sci Am **266(2)**: 54-9, 62-3.
- Longo, D. L. (2000). "Lymphomas: complexity, not chaos." Curr Opin Oncol **12(5)**: 379-82.
- Massie, B., F. Couture, et al. (1998). "Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette." J Virol **72(3)**: 2289-96.
- McKenzie, A. N., J. A. Culpepper, et al. (1993). "Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function." Proc Natl Acad Sci U S A **90(8)**: 3735-9.
- Menetrier-Caux, C., M. C. Thomachot, et al. (2001). "IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells." Cancer Res **61(7)**: 3096-104.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410(6824)**: 50-6.
- Murata, T., S. R. Husain, et al. (1998). "Two different IL-13 receptor chains are expressed in normal human skin fibroblasts, and IL-4 and IL-13 mediate signal transduction through a common pathway." Int Immunol **10(8)**: 1103-10.

- Nagase, H. (1997). "Activation mechanisms of matrix metalloproteinases." Biol Chem 378(3-4): 151-60.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem 274(31): 21491-4.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell 74(4): 609-19.
- Opal, S. M. and V. A. DePalo (2000). "Anti-inflammatory cytokines." Chest 117(4): 1162-72.
- Opdenakker, G. and J. Van Damme (1992). "Cytokines and proteases in invasive processes: molecular similarities between inflammation and cancer." Cytokine 4(4): 251-8.
- Pelletier, M., C. J. Roberge, et al. (2001). "Activation of human neutrophils in vitro and dieltrin-induced neutrophilic inflammation in vivo." J Leukoc Biol 70(3): 367-73.
- Pierres, A. e. a. (1999). "Les molécules d'adhésion en cancérologie." Rev Méd Interne 20: 1099-113.
- Pope, S. M., E. B. Brandt, et al. (2001). "IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism." J Allergy Clin Immunol 108(4): 594-601.
- Price, J. T., M. T. Bonovich, et al. (1997). "The biochemistry of cancer dissemination." Crit Rev Biochem Mol Biol 32(3): 175-253.
- Pulaski, B. A. and S. Ostrand-Rosenberg (1998). "Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines." Cancer Res 58(7): 1486-93.
- Romani, N., D. Reider, et al. (1996). "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability." J Immunol Methods 196(2): 137-51.
- Saren, P., H. G. Welgus, et al. (1996). "TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages." J Immunol 157(9): 4159-65.
- Serve, H., E. Oelmann, et al. (1996). "Inhibition of proliferation and clonal growth of human breast cancer cells by interleukin 13." Cancer Res 56(15): 3583-8.
- Shacter, E. and S. A. Weitzman (2002). "Chronic inflammation and cancer." Oncology (Huntingt) 16(2): 217-26, 229; discussion 230-2.

Simon, H. e. a. (2001). *Lymphomas (Non-Hodgkin's)*. New York, Nidus Information Services: 1-13.

Skinnider, B. F., U. Kapp, et al. (2001). "Interleukin 13: a growth factor in hodgkin lymphoma." *Int Arch Allergy Immunol* **126**(4): 267-76.

Skinnider, B. F., U. Kapp, et al. (2002). "The role of interleukin 13 in classical Hodgkin lymphoma." *Leuk Lymphoma* **43**(6): 1203-10.

Smyth, M. J., M. Taniguchi, et al. (2000). "The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent." *J Immunol* **165**(5): 2665-70.

Society Leukemia & Lymphoma. (2001). *Lymphoma*.

Takayama, S., T. Sato, et al. (1995). "Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity." *Cell* **80**(2): 279-84.

Trinchieri, G. (1994). "Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes." *Blood* **84**(12): 4008-27.

Vicari, A. P. and C. Caux (2002). "Chemokines in cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2): 143-54.

Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." *Circ Res* **92**(8): 827-39.

Vose, J. M., B. C. Chiu, et al. (2002). "Update on epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's lymphoma." *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 241-62.

Wadhwa, P. D., S. P. Zielske, et al. (2002). "Cancer gene therapy: scientific basis." *Annu Rev Med* **53**: 437-52.

Webb, A., D. Cunningham, et al. (1997). "BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma." *Lancet* **349**(9059): 1137-41.

Wynn, T. A. (2003). "IL-13 effector functions." *Annu Rev Immunol* **21**: 425-56.

Young, M. R., M. A. Wright, et al. (1996). "Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer." *Int J Cancer* **67**(3): 333-8.

Zhang, R. and L. J. DeGroot (2003). "Gene therapy of a rat follicular thyroid carcinoma model with adenoviral vectors transducing murine interleukin-12." *Endocrinology* **144**(4): 1393-8.

Zurawski, G. and J. E. de Vries (1994). "Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells." Immunol Today 15(1): 19-26.