



**HAL**  
open science

# Progression tumorale et résistance à la chimiothérapie induites par la stimulation de TLR7 dans le cancer du poumon non à petites cellules

Lucile Crozet

► **To cite this version:**

Lucile Crozet. Progression tumorale et résistance à la chimiothérapie induites par la stimulation de TLR7 dans le cancer du poumon non à petites cellules. Biochimie, Biologie Moléculaire. 2013. dumas-01304238

**HAL Id: dumas-01304238**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01304238>**

Submitted on 19 Apr 2016

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

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

# Conservatoire national des arts et métiers

Mémoire

présenté en vue de l'obtention du

DIPLOME D'INGENIEUR CNAM

Spécialité : Sciences et techniques du vivant

Option : génie biologique

**Progression tumorale et résistance à la chimiothérapie induites  
par la stimulation de TLR7 dans le cancer du poumon non à  
petites cellules.**

par Lucile Crozet

Soutenu le 25 février 2013

Devant le jury composé de :

PRESIDENT : Dr Antonia Suau-Pernet

MEMBRES : Pr Isabelle Cremer, maître de stage équipe 13 de l'UMRS872

Dr Olivier Hennebert, tuteur CNAM

Pr Catherine Sautès-Fridman

Dr Hélène Haegel

Dr Bertrand Blondeau



## **Laboratoire d'accueil :**

Centre de recherche des Cordeliers – UMRS872

Equipe 13, « microenvironnement immunitaire et tumeurs » - Pr Catherine  
Sautès Fridman

15 rue de l'école de médecine

75006 Paris



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Antonia Suau-Pernet, le Dr Olivier Hennebert, le Dr H el ene Haegel et le Dr Bertrand Blondeau d'avoir pris le temps de s'intéresser à mon projet, d'avoir lu ce mémoire et d'avoir été là le jour de la soutenance.

Au terme de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet et à mes projets précédents au sein du centre de recherche des Cordeliers. Ce mémoire représente aussi la fin de 6 années de cours au CNAM et je tiens à remercier tous les professeurs qui m'ont permis d'arriver là, particulièrement Fabien Magne et Olivier Hennebert qui ont été mes tuteurs de stages pour le CNAM.

Je tiens à remercier le Pr Hervé Fridman tout d'abord de m'avoir accueillie au sein du centre de recherche des Cordeliers, pour vos remarques constructives sur le projet TLR7, et votre aide pour mes candidatures pour une thèse future.

Je tiens aussi à remercier le Pr Catherine Fridman. Depuis que je suis arrivée dans l'équipe 13, j'ai toujours pu discuter avec vous de l'avancée de mon travail au laboratoire. Je vous remercie également d'avoir accepté de faire partie de mon jury ainsi que pour votre soutien dans mes projets futurs. Vous avez toujours été attentive à mes choix et avez pris le temps de donner des conseils ou m'aider à rédiger mes lettres de motivation pour mon avenir scientifique.

Isabelle, je te remercie énormément, tu m'as fait confiance, tu as accepté de m'encadrer pour me permettre de devenir ingénieur et lors de ce stage, tu m'as laissé exposer mes idées et prendre en main ce sujet. Gr ce   cela, j'ai vraiment l'impression d'avoir progressé. Je te remercie également pour le soutien que tu m'as apporté lorsque je t'ai dit que je voulais faire une thèse, pour mes candidatures afin d'en trouver une et pour tes conseils sur mes différents choix.

Je remercie aussi le Dr Jean-Luc Teillaud pour ses conseils et ses anecdotes sur la vie d'un laboratoire. Votre parcours est un exemple pour moi qui n'ai pas voulu poursuivre mes études de la façon la plus simple et la plus direct.

Je remercie également les autres personnes ayant travaillé avec moi dans le groupe d'Isabelle, Fanny, Mélanie, Mikael, Charles, Estelle, et plus particulièrement Saradiya pour son aide sur le projet TLR7 et tout le travail qu'elle a réalisé sur les cohortes de patients. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse et bonne continuation pour le futur. Et pour Charles, Mikael et Kris, bon courage pour votre thèse, et la suite de votre carrière.

Même si j'ai passé plus de temps dans l'équipe 13, du centre, c'est dans l'équipe 8 que je suis arrivée, dans le groupe des B.B., Bernadette Br ant et Bertrand Blondeau. Merci Bertrand d'avoir accepté de passer quelques heures à lire mon mémoire, de faire partie de mon jury, et de m'avoir fait découvrir, avec Bérengère, Bernadette et Dalil, la pâtisserie de Gérard Mulot et autres adresses incontournables du quartier.

Je remercie également mes deux prédécesseurs, les deux derniers étudiants d'Isabelle, Julien et Sophia. Julien d'avoir initié ce projet avec Isabelle, ta motivation, ton enthousiasme, et ta bonne humeur, et Sophia, de me montrer qu'une reconversion est toujours possible, qu'il faut suivre son instinct et avoir confiance en soi.

Je remercie aussi les autres étudiants du laboratoire, et surtout les thésards qui doivent soutenir bientôt, Jérémy, Jérémie (je suis contente de t'avoir retrouvé après quelques années), Romain, Rym, merci à



tous pour votre aide à tous les niveaux et bonne continuation! Claire aussi mais la soutenance est moins proche!!

Ensuite, parce que les relations de voisinage ça s'entretient (aussi parce que je les aime bien), mes trois collègues de bureau, merci Sam, Mélanie (merci pour tes corrections) et Hanane pour les points mode, les fous rires et l'aide!!! Sans moi, le bureau sera surement beaucoup mieux rangé et moins de boulettes seront faites.

Hanane, merci pour ces quatre ans et cinq mois passés à travailler ensemble, merci encore pour ton amitié, et tous les moments que nous avons passés à travailler ensemble. Sans toi et Claire je n'aurais pas réussi à devenir "une vraie fille", et les visites de capitales européennes et américaines n'auraient pas été aussi agréables.

Après ces six ans de cours du soir, d'examens, et de galères parfois, je tiens à remercier toutes les personnes de mon entourage, famille et amis, d'avoir été là, de m'avoir poussée à poursuivre mes études.



# Liste des abréviations

## A

ABC transporter : ATP Binding Cassette transporter

ADN : Acide Désoxy riboNucléique

Akt ou PKB : Protein Kinase B

AnnV : Annexin V

APC : allophycoerythrin

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ARN ou ADNsb : ARN ou ADN simple brin

ARN ou ADNdb : ARN ou ADN double brin

ARNsi /miARN: ARN small interférent/micro ARN interférent, petit ARN interférant

ATP : Adénine TriPhosphate

## B

Bcl : B cell lymphoma

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

BRCA1 : breast cancer 1

## C

CCLx : C-C motif ligand x

CCRx : Récepteur x des ligands à motif C-C

CPNPC : Cancer Pulmonaire Non à Petites Cellules

CD : Cluster of Differentiation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CpG : Cytosin phosphodiester Guanin



CRE-loxP : Causes Recombination-locus of recombination (x) over P1

CTLA-4 : Antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques

CXCL : chimiokine x a motif C-X-C

CXCR : Récepteur de chimiokines à ligands C-X-C

Cy : Cyanine

D

DAMP : Damaged Associated Molecular Pattern

DC : Cellule Dendritique

DMEM : milieu minimum essentiel de Eagle modifié par Dubelco et Vogt

E

EGF : Epithelial Growth Factor

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor

EMA : antigène membranaire des cellules épithéliales

ERCC1 : Excision Repair Cross Complementing 1

F

FITC : isothiocyanate de fluoresceine

G

GM-CSF : facteur de formation des colonies pour les granulocytes et les macrophages

GST $\pi$  : Glutathion S Transferase  $\pi$

Gr1 : granzyme B

H

HMGB : High Mobility Group Box

HRP : Horse Raddish Peroxydase

I

IAP : Inhibitor of Apoptosis



IARC : International Agency for Research on Cancer

IFN : Interferon

IKB : Inhibitor of NF- $\kappa$ B

IKK : Inhibitor of NF- $\kappa$ B

IL : Interleukin

IRF : facteur de régulation des interférons

IRS : séquence immunorégulatrice

J

JNK : c-Jun N-terminal kinases

K

K-ras

KO : Knock Out

L

LD50 : lethal dose 50, dose causant la mort de 50% des cellules

LDA : low Density array

LL/2 ou LLC : Lewis Lung Carcinoma

LRR : Leucin Rich Region

LPS : Lipo polysaccharide

LT- $\beta$  : Lymphotoxin  $\beta$

LT $\gamma\delta$  : Lymphocytes T  $\gamma\delta$

M

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MDR : MultiDrug Resistance

MFI : Mean Fluorescence Intensity



MYD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88

N

NF- $\kappa$ B : nuclear factor  $\kappa$ B

NK : Natural Killer

NKT : Lymphocytes T Natural Killer

NOD/SCID : Non Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficient

P

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PBS : Phosphate Buffer Salin

PCR : Polymerase Chain Reaction

PD-1 : Programmed cell death 1

PE : PhycoErythrin

PerCP : Perridrin Chlorophyl protein

PET-scan : Tomographie par Emission de Positrons couplé au scanner

PI : Propidium Iodure

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinases

PRR : pattern recognition receptor

R

RRM1 : Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit

S

SVF : serum de veau foetal

T

TEM : transition épithelio mésenchymateuse

TGF : Tumor Growth Factor



Th : lymphocytes T helper

Ti-BALT : Tumor induced broncho alveolar lymphoid tissue

TIR : Toll-IL1 Receptor

TIRAP : toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein

TLR : Toll Like Receptor

TME : transition mésoenchymateuse épithéliale

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNM : Tumor lymph Node Metastasis

TP53 : Tumor protein 53

TRAM : translocating chain-associating membrane protein

TRIF : toll-interleukin 1 receptor (TIR) -domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor



# Table des matières

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>1</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>19</b>
<b>Liste des figures :.....</b>	<b>23</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>25</b>
<b>Préambule .....</b>	<b>27</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>31</b>
<i>I- Le cancer du poumon.....</i>	<i>31</i>
1- Le cancer du poumon : épidémiologie et étiologie.....	31
2- Classification des cancers du poumon.....	31
3- Traitement des CPNPC.....	33
4- Chimiothérapies et mécanismes de résistance.....	33
<i>II- Le microenvironnement tumoral .....</i>	<i>45</i>
1- La cellule tumorale .....	45
2- Microenvironnement immunitaire de la tumeur.....	51
3- Inflammation et cancer.....	55
5- Le rôle de NF- $\kappa$ B dans l'inflammation protumorale.....	59
6- TLRs, inflammation et cancer .....	59
7- TLRs et tumeurs .....	65
<i>III- Modèles murins en immunologie des tumeurs.....</i>	<i>71</i>
<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>75</b>
1- Marquage de TLR7 en cytométrie en flux et immunohistochimie.....	75
2- Expériences de résistance à la chimiothérapie in vitro.....	75
3- Agonistes et immunorégulateurs de TLR7 utilisés.....	77
4- Animaux utilisés. ....	79
5- Expériences in vivo .....	79
6- Marquage par cytométrie en flux des populations immunitaires.....	81
7- Cohortes de patients atteints de CPNPC.....	83
8- Tests statistiques utilisés.....	85
<b>Résultats.....</b>	<b>87</b>
1- Expression de TLR7 par les cellules tumorales.....	87
2- Progression tumorale et résistance à la chimiothérapie induite par la stimulation de TLR7 in vitro.....	87
3- La stimulation de TLR7 in vivo induit une résistance à la chimiothérapie.....	89
4- La stimulation de TLR7 sur des souris immunocompétentes conduit à un effet pro- anti-tumoral.	93
5- Implication du système immunitaire après stimulation de TLR7 .....	99
<b>Discussion.....</b>	<b>105</b>
1- Expression deTLR7 par les cellules tumorales.....	105
2- Progression tumorale et résistance à la chimiothérapie induites par la stimulation de TLR7 in vitro.....	109
3- Le double rôle de la stimulation de TLR7 in vivo .....	111
4- Activation du système immunitaire par la stimulation de TLR7. ....	115
5- Valeur pronostic de l'expression de TLR7 sur des cohortes de patients .....	117
<b>Perspectives.....</b>	<b>123</b>



1- Mécanismes de résistances aux chimiothérapies .....	123
2- Autres modèles murins d'étude du rôle de TLR7 dans le développement et la progression de CPNPC .....	127
3- Les ligands endogènes de TLR7 .....	129
4- Expression de TLR7 et transition épithélio mésenchymateuse .....	133
5- Utilisation des TLRs comme biomarqueurs .....	135
<b>Bibliographie.....</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>149</b>
<i>ANNEXE 1 : Evaluation du cout financier.....</i>	<i>149</i>
<i>ANNEXE 2 : Marquage en Immunohistochimie de TLR7: .....</i>	<i>157</i>
<i>ANNEXE 3 : Marquage pour la cytométrie en flux des populations immunitaires dans les ganglions drainants et les tumeurs.....</i>	<i>159</i>
<i>ANNEXE 4 : Anticorps et enzymes utilisées .....</i>	<i>161</i>
<i>ANNEXE 5 : Milieux de culture utilisés et culture des lignées cellulaires .....</i>	<i>163</i>



## Liste des figures :

Figure 1 : Propriétés des cellules tumorales, page 24

Figure 2 : Les trois E de l'immunoediting, page 26

Figure 3 : Rôles pro ou anti tumoral des cellules immunitaires page 29

Figure 4 : Effet de l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules tumorales, immunitaires et épithéliales, page 30

Figure 5 : Ligands et voies de signalisation des TLRs, page 32

Figure 6 : Les différents types de modèles murins d'étude de l'immunologie des tumeurs, page 37

Figure 7 : Modèle des expériences de traitements des souris par les agonistes de TLR7 et par les chimiothérapies, page 44

Figure 8 : Expression de TLR7 par les lignées de cellules tumorales utilisées, page 50

Figure 9 : Résistance à la chimiothérapie in vitro des cellules tumorales A549 et LL/2, page 52

Figure 10 : Résistance à la chimiothérapie in vivo, page 54

Figure 11 : Inhibition de la stimulation de TLR7 chez les souris immunodéficientes, page 55

Figure 12 : Effets de la stimulation de TLR7 par différents ligands sur les souris immunocompétentes, page 56

Figure 13 : Effets de la stimulation de TLR7 dans un modèle de souris immunocompétentes, page 58

Figure 14 : Variations des populations immunitaires dans la tumeur et les ganglions drainants après injections des agonistes de TLR7, page 63

Figure 15 : Expression de TLR7 dans les cellules tumorales des patients des cohortes de CBNPC, page 65

Figure 16 : Effet de la présence de TLR7 sur les cellules tumorales sur la survie des patients atteints de CBNPC, page 66

Figure 17 : Les différents effets de la présence de TLR7 dans le CBNPC, page 74

Figure 18 : Principaux mécanismes de résistance aux chimiothérapies, page 79

Figure 19 : Rôle de la transition épithéliaux mésenchymateuse dans la formation de métastases à distance, page 86



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification TNM du stade des tumeurs pulmonaires. (7<sup>ème</sup> édition, basée sur les recommandations de l'association internationale d'étude des cancers du poumon), page 14

Tableau 2 : Ligands endogènes possibles des TLRs, page 34

Tableau 3 : Forces et limites des modèles utilisés dans l'étude de l'immunologie des tumeurs, page 40

Tableau 4 : Agonistes de TLR7 utilisés, page 42

Tableau 5 : Mix d'anticorps utilisés pour la détermination des populations immunitaires impliquées dans la réponse à la stimulation par TLR7, page 45

Tableau 6 : Résumé de la cohorte de 352 patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules de stades I à III sans chimiothérapie néoadjuvante, page 47

Tableau 7 : Résumé de la cohorte de 109 patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules de stade III traitées avec une chimiothérapie néoadjuvante, page 49

Tableau 8: Définition des biomarqueurs, page 86



## Préambule

Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) représente 85% des cancers du poumon. Cette pathologie a un pronostic très sombre puisque la survie à cinq ans n'est que de 15%. Ce cancer était responsable en 2008 d'un million de décès dans le monde. Des mutations comme celle de K-ras, p53 ou du récepteur à l'EGF, en association avec des facteurs de risque, comme l'exposition régulière à la fumée de cigarette, à l'amiante, aux hydrocarbures, ou au nickel, augmentent le risque de développement du cancer du poumon. Le traitement principal est la chirurgie avec ou sans chimiothérapie néoadjuvante selon le stade de la maladie. Cependant de nombreux phénomènes de résistance aux chimiothérapies sont observés.

Les contacts chroniques avec des motifs moléculaires liés aux pathogènes (« Pathogen-Associated Molecular Pattern », PAMP) ou aux dommages moléculaires (« Damaged-Associated Molecular Pattern », DAMP) va créer un environnement inflammatoire. Cette inflammation a deux rôles potentiels. Lorsqu'elle est temporaire, ou aigüe, elle va conduire à une activation du système immunitaire contre la tumeur. Au contraire, lorsque cette inflammation est chronique, elle peut favoriser les phénomènes protumoraux en activant dans la tumeur, en induisant la prolifération cellulaire, la résistance aux chimiothérapies, la néoangiogenèse, ou en inhibant l'apoptose. Les DAMP et les PAMP sont reconnus par la famille des récepteurs TLR. Ces 11 récepteurs sont exprimés par les cellules du système immunitaire et certains sont aussi exprimés par les cellules épithéliales. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au TLR7. Il reconnaît des ARN simple brin et est exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), les lymphocytes B, les monocytes et macrophages. Les cellules de l'épithélium broncho alvéolaire expriment également TLR7.

Il a été montré au laboratoire que TLR7 et TLR8 sont exprimés par des lignées de cellules tumorales de cancer du poumon et par les cellules tumorales chez 70% des patients. La stimulation de ces lignées cellulaires par des agonistes de TLR7 conduit à une activation des voies de transduction impliquant les MAPKinases et NF- $\kappa$ B. Une augmentation de la prolifération des cellules tumorales ainsi qu'une résistance à la chimiothérapie a également été observée in vitro (Cherfils-Vicini et al. 2010).

L'étude réalisée ici a permis de confirmer in vivo ces résultats et d'explorer le rôle des agonistes de TLR7 dans des modèles murins immunocompétents.

Les objectifs de ce travail ont été :

- La confirmation in vivo du rôle protumoral et l'induction de résistance à la chimiothérapie après stimulation de TLR7 sur la lignée humaine A549, dans un modèle de souris immunodéficiente.



- L'étude des effets de la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales murines LL/2. Nous avons greffé à des souris immunodéficientes ou immunocompétentes ces cellules. Sur les souris immunodéficientes, des résultats similaires à ceux obtenus avec la lignée de cellules A549 ont été observés. En réalisant des expériences avec le même mode de traitement mais chez les souris immunocompétentes, nous avons observé que de faibles doses de l'agoniste de TLR7 avait un effet anti tumoral, alors que de fortes doses de l'agoniste induisent un effet protumoral et une résistance à la chimiothérapie.
- L'étude de l'expression de TLR7 sur une cohorte de patients et l'impact de cette expression sur la survie des patients. Nous avons démontré qu'une forte expression de TLR7 sur les cellules tumorales est de mauvais pronostic pour la survie des patients.

L'ensemble des observations faites sur les différents modèles murins et sur la cohorte de patients nous amènent à penser que le statut des cellules tumorales pour TLR7 doit être pris en compte lors de la décision du traitement à prescrire pour les patients et que les nouvelles immunothérapies utilisant des agonistes de TLR7 doivent aussi prendre cela en compte. De plus, les ligands naturels de TLR7 étant des ARN simple brin possiblement issus de virus, le lien entre infections virales pulmonaires et cancer du poumon non à petites cellules doit être étudié.

**Tableau 1 :** Classification TNM du stade des tumeurs pulmonaires (Scoazec and Sabourin, 2010). La classification est faite en fonction de la taille de la tumeur primaire, du nombre de ganglions envahis et de la présence de métastases à distance.

Stade	Tumeur (T)	Ganglion (N)	Métastase (M)	Description
<b>IA</b>	T1a	N0	M0	Tumeur dont le diamètre est $\leq 2$ cm ( <b>T1a</b> ) ou $> 2$ cm mais $\leq 3$ cm ( <b>T1b</b> ), entourée par le poumon ou la plèvre. Pas de tumeur plus proximale que le lobe bronchique (c'est-à-dire pas dans la bronche principale)
	T1b	N0	M0	
<b>IB</b>	T2a	N0	M0	Tumeur dont le diamètre est $> 3$ cm mais $\leq 5$ cm ou tumeur caractérisée par : un envahissement de la bronche principale à plus de 2cm de la carène, et/ou un envahissement de la plèvre viscérale, et/ou une atélectasie ou une pneumonie étendue jusqu'à la région hilare mais n'intéressant pas le poumon dans sa totalité ( <b>T2a</b> )
<b>IIA</b>	T1a, b	N1	M0	Tumeur dont le diamètre est $> 5$ cm mais $\leq 7$ cm ou tumeur caractérisée par : un envahissement de la bronche principale à plus de 2cm de la carène, et/ou un envahissement de la plèvre viscérale, et/ou une atélectasie ou une pneumonie étendue jusqu'à la région hilare mais n'intéressant pas le poumon dans sa totalité ( <b>T2b</b> )
	T2a	N1	M0	
	T2b	N0	M0	Métastases dans les ganglions lymphatiques péribronchiques, hilaires et/ou intrapulmonaires du côté du poumon atteint, y compris par envahissement direct ( <b>N1</b> )
<b>IIB</b>	T2b	N1	M0	Tumeur de plus de 7 cm ou envahissant directement une des structures suivantes : paroi thoracique, diaphragme, nerf phrénique, plèvre médiastinale, péricarde ; ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir ; ou associée à une atélectasie ou une pneumopathie obstructive du poumon entier ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe ( <b>T3</b> )
	T3	N0	M0	
<b>IIIA</b>	T1, T2	N2	M0	Tumeur de toute taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, cœur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, carène, corps vertébral ; nodule tumoral distinct dans un autre lobe ipsilatéral ( <b>T4</b> )
	T3	N1, N2	M0	
	T4	N0, N1	M0	
<b>IIIB</b>	T4	N2	M0	Métastases dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ou hilaires controlatéraux, scalènes ou sus-claviculaires ipsilatéraux ou controlatéraux ( <b>N3</b> )
	Tout T	N3	M0	
<b>IV</b>	Tout T	Tout N	M1a, b	Nodule(s) tumoral distinct dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural malin (ou péricarde) ( <b>M1a</b> )  Métastases extrathoraciques ( <b>M1b</b> )

# Introduction

## I- Le cancer du poumon

### 1- Le cancer du poumon : épidémiologie et étiologie

Avec 1,6 millions de nouveaux cas et 1,3 millions de décès en 2008, le cancer du poumon est le cancer causant le plus de décès au monde. Il représente 12,7% des cancers mais 18,2% des décès par cancer (IARC, 2010).

L'étiologie principale des cancers du poumon est le tabac. Près de 90% des cancers bronchiques sont dus au tabac. Le risque de développer un cancer du poumon est du à la durée d'exposition mais aussi à la quantité de cigarettes fumées. Le tabagisme passif est lui aussi une cause possible de cancer du poumon. Il pourrait expliquer 1,6% des cancers du poumon et lorsque des enfants subissent le tabagisme de leurs parents, ils ont trois fois plus de chance de développer un cancer du poumon à l'âge adulte.

La pollution de l'air respiré est aussi une des causes de cancer du poumon. L'exposition répétée aux hydrocarbures ou aux particules des pots d'échappement a été mise en évidence comme étant un facteur de risque. En Europe, le taux de cancer du poumon du à la pollution est estimé à 11%. Ce taux augmente chez les personnes fréquemment exposées à l'amiante ou au nickel dans leur travail.

Des études ont aussi montré une augmentation du risque de développer un cancer pulmonaire lorsque certaines mutations sont présentes chez un individu. Ainsi la mutation T790M de l'EGFR est un facteur de risque pour le développement de cancer du poumon non à petites cellules, ainsi que la présence du gène TP53 (Molina et al., 2008) ou la mutation G12D induisant une perte de fonction de la protéine Kras (Rodenhuis et al., 1988).

### 2- Classification des cancers du poumon

La classification des cancers se fait sur différents critères. Il existe deux types majoritaires, le Cancer du Poumon à Petites Cellules (CPPC) ou Non à Petites Cellules (CPNPC). Les CPPC qui représentent 15% de tous les cancers du poumon, sont dérivés de cellules neurodégénératives bronchiques. Les CPNPC sont eux-mêmes répartis en différents types histologiques. Les principaux sont les carcinomes épidermoïdes, adénocarcinomes et carcinomes à grandes cellules. Après cette classification histologique, les CPNPC sont classés



selon le stade d'avancement de la maladie. Pour cela, la taille de la tumeur primaire, le nombre de ganglions envahis et de métastases à distance sont pris en compte. Cette classification permet d'adapter la prise en charge thérapeutique des patients.

### 3- Traitement des CPNPC

Même si le diagnostic complet du type de cancer et du stade ne se fait qu'après l'opération les techniques d'imagerie comme le PET-scan permettent de visualiser l'envahissement des ganglions et de détecter d'éventuelles métastases. Cela permet d'adapter le traitement à la sévérité de la pathologie.

Les patients se trouvant à des stades précoces (IA, IB, IIA) subiront une résection chirurgicale seule alors que pour les patients à des stades plus avancés (IIB, IIIA) il sera proposé une chimiothérapie néoadjuvante, avant la résection et les stades très avancés (IIIB, IV) n'auront qu'une chimiothérapie avec ou sans radiothérapie.

Les chimiothérapies sont des traitements visant à détruire les tumeurs ou diminuer leur masse ainsi que les cellules tumorales circulantes. Les traitements utilisés ont pour but de cibler les cellules en division dans l'organisme. Cette stratégie va donc viser les mécanismes associés à la division cellulaire. On retrouve donc dans les chimiothérapies de première intention des molécules ciblant des processus liés à la mitose tel que la réplication de l'ADN ou la polymérisation des microtubules qui vont intervenir lors de la séparation des chromosomes et de la division de la cellule mère en deux cellules filles.

Certaines nouvelles thérapies vont cibler les mécanismes en amont de la division cellulaire. Parmi ces traitements, on retrouve :

- des inhibiteurs de l'EGFR, comme l'ergotinib ou le gefitinib
- des inhibiteurs de la néoangiogenèse, comme l'anticorps monoclonal bevacizumab.

### 4- Chimiothérapies et mécanismes de résistance

La chimiothérapie est un élément essentiel du traitement du CPNPC. Le protocole utilisé actuellement est une association entre des sels de platine (cisplatine ou carboplatine), et une chimiothérapie dite de troisième génération, taxotère, navelbine ou gemcitabine (Molina et al., 2008). De nombreuses rechutes sont cependant observées et sont majoritairement attribuées à des phénomènes de résistance aux chimiothérapies.



### *Agents alkylants de l'ADN*

Les agents alkylants de l'ADN utilisés comme chimiothérapie sont les sels de platine. Ils vont entraîner la formation de liaisons covalentes entre guanines et adénines inter ou intra brin. Ces liaisons conduisent à une plus forte affinité entre les deux brins d'ADN, empêchant sa réplication. Les cellules sont alors incapables de se diviser et vont entrer en apoptose (Heron, 2011c).

Les sels de platines sont les chimiothérapies les plus utilisées dans les cas de CPNPC mais ils peuvent entraîner de mécanismes de résistance, passant par les mécanismes d'influx et d'efflux, de détoxification, l'inhibition de l'apoptose ou la réparation de l'ADN.

Des études ont montré que le traitement aux sels de platine pouvait induire une augmentation des gènes codant pour la metallothionéine, enzyme de détoxification et notamment de détoxification des métaux lourds. Cette enzyme permet une élimination plus rapide des sels de platine et donc diminue l'efficacité du traitement.

La transcription de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN a aussi été retrouvée modifiée chez certains patients atteints de CPNPC. C'est le cas de l'enzyme ERCC1, pour laquelle une valeur pronostique a été démontrée après résection chirurgicale et traitement par des sels de platine. La survie des patients présentant cette protéine dans leurs cellules tumorales est plus faible que la survie des patients chez qui elle est absente. Cette protéine est même utilisée depuis quelques mois, comme un marqueur prédictif de la réponse au traitement par les sels de platine. Le gène BRCA1, découvert pour son rôle dans le cancer du sein a lui aussi un rôle prédictif dans la réponse au traitement par les sels de platine mais son rôle est encore inconnu (R Rosell et al. 2002; Wang, Reed, et Li 2004; Chang 2011; Sève et Dumontet 2005; R Rosell et Felip 2001).

### *Molécules se liant aux tubulines*

Les microtubules sont des protéines nécessaires pour le maintien de la forme des cellules et pour leur fonctionnement. Dans une cellule normale, ils sont dans un état d'équilibre dynamique entre polymérisation et dépolymérisation des différentes sous unités de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Leur désorganisation va conduire à un arrêt des mitoses et des phénomènes de mort cellulaire.

Deux familles de composés anticancéreux sont connues pour leur capacité de liaison aux tubulines et pour leur capacité à désorganiser la cellule, notamment lors de la mitose. Il s'agit



des taxanes, dérivés de l'If avec comme chef de file le taxotère et les vinca-alcaloïdes avec la vinorelbine ou navelbine.

### Les taxanes

Ce sont des poisons du fuseau mitotique. Ils inhibent la dépolymérisation de celui-ci lors de la mitose et empêchent le regroupement des chromosomes de chaque côté de la cellule en division et la formation des deux cellules filles. La cellule bloquée en interphase de la mitose va alors entrer en apoptose (Heron, 2011a).

Dans les cas de résistance au taxotère on retrouve les mécanismes généraux, passant par des mécanismes d'influx et d'efflux, notamment les mécanismes d'efflux n'appartenant pas à la famille de la p-glycoprotéine. Les mutations sur la tubuline sont les mécanismes spécifiques les plus souvent observés dans cas de résistance au taxotère. Ainsi, l'isoforme  $\beta$ III de la tubuline est un marqueur important de la résistance au taxotère. Sa présence est associée avec un plus grand risque de résistance aux inhibiteurs de la polymérisation du fuseau mitotique. Une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a aussi été observée dans certains cas de résistance au taxotère mais le mécanisme précis conduisant à cette résistance est encore inconnu (Rosell and Felip, 2001; Sève and Dumontet, 2005; Chang, 2011; Maráz et al., 2011).

### La navelbine

Au contraire du taxotère, la navelbine ou vinorelbine est un inhibiteur de la polymérisation des microtubules. Lorsque les cellules sont traitées avec la navelbine, une désorganisation des chromosomes et un arrêt de la division cellulaire sont observés à l'interphase, conduisant à l'apoptose des cellules (Heron).

Les phénomènes de résistance à la navelbine observés sont les mêmes que ceux observés pour le taxotère du fait de la ressemblance de mode d'action entre les deux molécules (Sève and Dumontet, 2005; Chang, 2011).

### *Les antimétabolites*

Lorsque les traitements par les molécules dites classiques (sels de platine + navelbine ou taxotère) échouent, des thérapies à base d'agents bloquant la réplication de l'ADN sans être des agents alkylants sont utilisées. Les deux chimiothérapies les plus couramment utilisées sont la gemcitabine et l'alimta. Après avoir été pendant longtemps des chimiothérapies de seconde ligne, administrées lorsque les patients développent des résistances à d'autres traitements, des essais cliniques ont montré les avantages de traitements avec ces deux



molécules en première ligne.

### La gemcitabine

C'est un analogue de la di-oxy-cytidine (dC), la di-fluoro-di-oxy-cytidine (dFdC) qui agit comme un antimétabolite de la phase de synthèse de l'ADN. La dFdC est métabolisée en dFdCDP puis en dFdCTP. Sa présence dans les cellules va conduire à une inhibition compétitive de la ribonucléase réductase. Le dFdCTP est aussi incorporé à l'ADN mais va empêcher l'élongation des brins car l'ADN polymérase  $\epsilon$  ne détecte pas la différence entre les deux molécules. Cette inhibition de la réplication de la cellule inhibe sa division et peut conduire à l'apoptose de celle-ci (Heron, 2011b).

Le seul phénomène de résistance à la gemcitabine connu à l'heure actuelle passe par une augmentation de la transcription de la sous unité M1 de la ribonucléase réductase (RRM1), sous unité spécifique de la transformation des nucléotides en désoxynucléotides, et donc spécifique de la formation des bases de l'ADN (Sève and Dumontet, 2005; Chang, 2011).

### L'alimta

L'alimta est un analogue de l'acide folique, inhibiteur de la thymidylate synthetase et d'autres enzymes de la synthèse des bases notamment la dihydrofolate reductase, et la glycinamide ribonucleotide formyltransferase. Sa présence dans les cellules va donc conduire à des problèmes de réplication de l'ADN. La cellule ne pouvant répliquer son ADN, ne peut pas entrer en division. Les mécanismes de résistance à l'Alimta connus pour le moment n'ont été décrit qu'in vitro et passent soit par une surexpression de la thymidilate synthase soit par un mécanisme d'efflux dû à la surexpression de ABCC11 (Sève and Dumontet, 2005; Chang, 2011).

### *Nouvelles thérapies dans les CPNPC*

De nouvelles thérapies (petites molécules inhibitrices ou anticoprs monoclonaux) ciblent de façon très spécifique un processus altéré dans les cellules cancéreuses.

### Les inhibiteurs de l'EGFR

Il s'agit principalement de l'erlotinib et du gefitinib. Ces petites molécules vont se fixer sur le site réservé à l'ATP sur le domaine tyrosine kinase du récepteur de l'EGF, ils agissent comme des inhibiteurs compétitifs de ce domaine. L'erlotinib et le gefitinib, en inhibant le domaine tyrosine kinase de l'EGFR, empêche la transduction de ce signal et diminue la prolifération



cellulaire (Godin-Heymann et al., 2007). Les mutations gains de fonction de l'EGFR ou une surexpression de cette protéine étant régulièrement observées dans les cas de CPNPC, cette stratégie se révèle efficace et après avoir été réservé aux cancers de stades avancés, ce traitement commence à être utilisé en première ligne dans les cas où des mutations de l'EGFR ont été observées. La liaison du ligand (principalement l'EGF ou le TGF $\alpha$ ) au récepteur va entraîner une cascade de phosphorylation des voies de signalisation Akt, JNK et MAPK. Cela conduit à une augmentation de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire. Une seconde mutation de l'EGFR, notée T790M a aussi été observée chez certains patients et elle confère aux cellules tumorales une résistance à l'erlotinib ou au gefitinib. Les inhibiteurs de l'EGFR ne peuvent en effet plus se fixer au site réservé à l'ATP sur le domaine tyrosine kinase du récepteur de l'EGF et agir comme des inhibiteurs compétitifs de ce récepteur.

### Le bevacizumab

Le bevacizumab ou avastin est un anticorps monoclonal chimérique de la classe des IgG1. Il agit en se liant au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et en empêchant sa liaison à ses récepteurs. Sous l'effet de la stimulation par le VEGF, les cellules endothéliales prolifèrent et forment de nouveaux vaisseaux. Dans les tumeurs, cela diminue l'hypoxie des cellules tumorales en permettant l'apport continu en nutriments et oxygènes au centre de la tumeur. Dans des modèles murins de tumeurs coliques, un traitement par le bevacizumab diminue la formation de ces nouveaux vaisseaux ainsi que l'apparition de métastases.

Chez l'homme, dans des études cliniques, une augmentation de la survie est observée grâce au traitement par le bevacizumab chez des patients atteints de cancers colorectaux, cancer du sein, ou CPNPC (Dranitsaris et al.).

### *Perspectives d'amélioration des traitements*

Malgré toutes ces avancées dans la recherche de nouvelles thérapies pour les CPNPC, la résistance aux chimiothérapies reste une grande barrière dans le traitement de ces cancers quelque soit leur stade. Il existe deux champs de recherche principaux afin de surpasser les résistances aux chimiothérapies.

Le premier est la recherche de biomarqueurs qui permettront de déterminer le traitement le plus adapté à chaque patient. Ainsi, la présence en grande quantité de tubuline  $\beta$ III dans la tumeur est de mauvais pronostic pour la réponse au traitement par les taxanes. Une forte expression de ERCC1 est de mauvais pronostic pour la réponse aux thérapies basées sur les



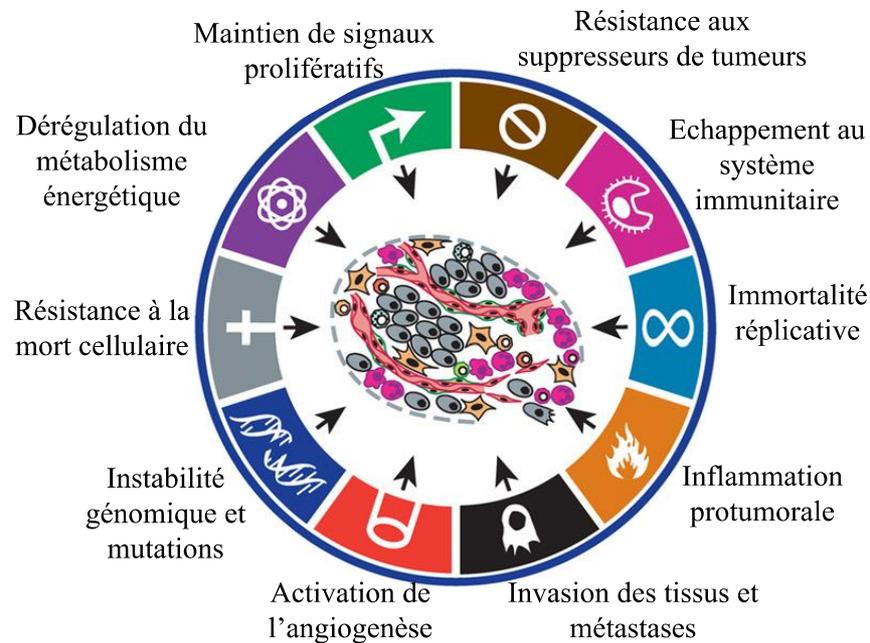
sels de platine et des mutations sur la protéine K-ras sont de mauvais pronostic pour la réponse au traitement par une association entre les sels de platine et la navelbine. Voici quelques exemples dans lesquels un biomarqueur peut aider sur le choix du traitement ayant le plus de chance d'être efficace chez un patient donné.

Un autre axe pour dépasser les phénomènes de résistance aux chimiothérapies est la recherche de petites molécules pouvant rendre aux chimiothérapies leur efficacité. L'inhibition de la molécule empêchant l'efficacité de la chimiothérapie peut permettre de rétablir l'effet de la chimiothérapie sur les cellules tumorales. C'est le cas pour la canfosmamide, cette petite molécule encore en essai clinique de phase III, permet de restaurer l'effet des sels de platine dans le cas d'une résistance due à une augmentation de la metallothionine GST  $\pi$ .

L'amélioration de la survie des patients atteints de CPNPC doit aussi se faire par la recherche de nouveaux traitements. Les immunothérapies sont actuellement un axe de recherche privilégié. Trois catégories de nouvelles immunothérapies se distinguent (Thomas and Hassan, 2012) :

- les vaccins contre des peptides présents uniquement sur les cellules tumorales. Ils sont créés à partir de lignées de cellules tumorales ou de peptides exprimés de façon aberrantes par les cellules tumorales.
- les inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaire, comme les anticorps empêchant l'action de PD-1 ou CTLA-4 mais augmentant l'action du système immunitaire. Tout deux font partie de la même famille et sont des récepteurs inhibiteurs présent sur les lymphocytes B et lymphocytes T activés. Ils empêchent la prolifération anarchique des cellules du système immunitaire.
- les agonistes des TLRs, permettant une augmentation de l'activation du système immunitaire contre la tumeur. Des essais cliniques ont été initiés mais sans résultats concluant sur l'utilisation d'agonistes de TLR9 et de TLR2 dans le cas de CPNPC.

Le cancer pulmonaire est donc une maladie encore en progression, le pic d'incidence de la maladie est attendu dans deux à trois dizaines d'années. Touchant déjà plusieurs millions de personnes dans le monde, il est important de mettre au point de nouvelles thérapies plus efficaces et plus supportables pour les patients. De plus, il est important dans la mise au point de ces nouvelles thérapies et l'amélioration de celles déjà existantes, de prendre en compte l'importance des phénomènes de résistances observés dans ce type de cancer.



**Figure 1 :** Les marqueurs des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011). Pour chacune de ces caractéristiques, une ou plusieurs stratégies de traitement des cancers peuvent être imaginées. Avec par exemple les inhibiteurs du VEGFR, diminuant l'activation de l'angiogenèse ; les inhibiteurs de télomérases pour l'immortalité réplivative ; les inhibiteurs des points de contrôle immunologique comme les anticorps anti CTLA-4 ou anti PD-1.

## II- Le microenvironnement tumoral

La tumeur est un environnement complexe composé de cellules tumorales, stromales, immunitaires et de vaisseaux.

### 1- La cellule tumorale

Le développement de la maladie néoplasique ou cancer se fait par l'acquisition de propriétés caractéristiques des tumeurs (Hanahan and Weinberg, 2011). Ils sont représentés dans la figure 1 et décrits ci-dessous :

- Maintien des signaux prolifératifs. La prolifération des cellules tumorales et leur suractivation peuvent avoir plusieurs origines. Il peut s'agir d'une augmentation de la production de facteurs de croissance, une augmentation de l'expression des récepteurs de ces facteurs de croissance comme l'EGFR ou une augmentation intracellulaire de la signalisation de ces récepteurs, comme les mutations de la PI3K qui est une protéine clé de la voie de signalisation des MAP kinase entraînant la réplication de l'ADN puis la mitose des cellules.

- Echappement aux suppresseurs de tumeur. La cellule tumorale est capable de contourner ou dérégler les signaux anti prolifératifs qui sont censés limiter l'entrée en mitose des cellules de l'organisme. Il peut s'agir de protéines transduisant un signal, comme la protéine RB (retinoblastoma-associated protein), qui permet l'entrée en cycle cellulaire ou non, ou de protéines impliquées dans la détection d'anomalies empêchant une division cellulaire normale, comme la protéine TP53, chargée de provoquer une entrée en apoptose lorsqu'une cellule présente trop de cassures dans son ADN. La perte de l'inhibition de contact est aussi un mécanisme d'échappement aux suppresseurs de tumeurs.

- Immortalisation des cellules tumorales et sortie de la senescence. Les cellules de l'organisme sont programmées pour un nombre limité de divisions cellulaires et entrer en phase de quiescence une fois ce nombre de division atteint. Cette entrée en quiescence est en partie déterminée par la longueur des télomères et une augmentation des télomérases dans les cellules peut conduire à une immortalisation des cellules. Ces enzymes vont en effet maintenir le potentiel de division des cellules en empêchant un raccourcissement des télomères des chromosomes trop importants.

- Invasion des tissus par la tumeur. Un facteur majeur de la progression tumorale est la migration des cellules tumorales dans l'organisme. Ces processus requièrent dans un premier



temps la perte des molécules d'adhésion qui permettent le maintien de l'homéostasie des tissus. Des enzymes dégradant la matrice extracellulaire sont produites dans l'environnement tumoral. Elles permettent de libérer les cellules tumorales de leur environnement. La transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales joue aussi un rôle très important dans leur capacité à envahir les tissus à distance.

- Angiogenèse. Les besoins en nutriments des cellules tumorales entraînent une activation constante de l'angiogenèse via une forte production de VEGF. Cette forte production est activée par les cellules tumorales et par l'hypoxie.

- Instabilité génomique. Dans les cellules tumorales, un taux de mutation important est observé. L'augmentation de ces mutations est en grande partie responsable de l'acquisition des caractéristiques des cellules tumorales citées ici. Les mutations les plus importantes et les plus fréquemment retrouvées sont celles concernant les gènes chargés de la détection d'anomalies cellulaires.

- Résistance à la mort cellulaire. Le moyen principal de l'organisme pour lutter contre le développement de tumeurs est l'apoptose. Elle permet la mort d'une cellule sans relargage dans son microenvironnement de molécules inflammatoires. L'apoptose est sous le contrôle de molécules régulatrices anti apoptotiques et de molécules effectrices. Dans le cas des tumeurs le déclenchement de l'apoptose peut être la réponse à un stress physiologique ou à un traitement par chimiothérapie. On remarque cependant dans les tumeurs à haut grade de malignité une possible augmentation de certaines protéines régulatrices de l'apoptose comme Bcl-2 ou d'autres membres de cette famille.

Dans le cas de nécrose cellulaire, les cellules relarguent dans le microenvironnement de nombreuses molécules ayant un potentiel proinflammatoire et protumoral, pouvant conduire à l'activation et au recrutement de cellules inflammatoires du système immunitaire dont le rôle va être d'empêcher la zone de nécrose de s'étendre. Cependant ces phénomènes peuvent être fortement protumoraux : ils vont activer l'angiogenèse, la prolifération et la motilité des cellules tumorales.

- Dérégulation du métabolisme énergétique de la cellule. Des recherches datant des années 1930 et 1950, avaient déjà montré le métabolisme cellulaire particulier des cellules tumorales. Ainsi, pour la production d'ATP, la cellule tumorale utilise de façon préférentielle la glycolyse au lieu de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. Ce moyen de

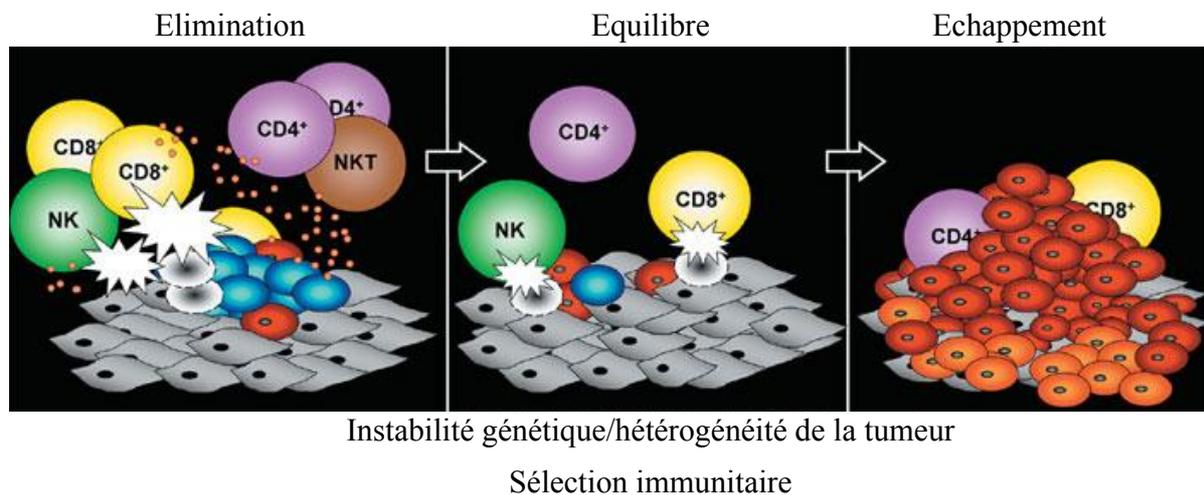


production d'énergie permet en même temps l'accumulation de macromolécules et organelles qui seront utilisés lors de la division cellulaire.

- Echappement à la destruction par le système immunitaire. Le système immunitaire est responsable de l'élimination de la majorité des tumeurs qui se développent dans notre organisme. Seules les tumeurs capables d'échapper au système immunitaire ou de le contrôler peuvent se développer. Il a été montré que les lymphocytes T CD8 cytotoxiques, les lymphocytes CD4 Th1, et les cellules NK ont un rôle majeur dans le contrôle du développement des tumeurs. Les études réalisées dans différents types de souris immunocompétentes ou déficientes ont permis de montrer que les cellules tumorales ont des propriétés variables d'immunogénicité. Cela a aussi permis le développement de la théorie de l'immunoediting par R. Schreiber, et détaillée ci-dessous. De plus en plus d'études de cohortes de patients atteints de tumeurs sont étudiées afin de comprendre le rôle du système immunitaire dans les tumeurs.

- Inflammation protumorale. L'infiltration des tumeurs par les cellules du système immunitaire en quantité et en qualité variable est un phénomène connu depuis de nombreuses années. Une forte infiltration des tumeurs par le système immunitaire est généralement le signe d'une forte réponse anti tumorale. Certaines études sur l'inflammation et le développement des cancers ont cependant montré qu'une inflammation chronique et prolongée pouvait accélérer le développement de la maladie néoplasique.

Les recherches réalisées par Hanahan et Weinberg permettent de montrer la complexité de l'environnement tumoral, dans lequel les différents types cellulaires (tumorales, stromales, endothéliales et immunitaires) établissent un dialogue, déterminant la progression de la tumeur et l'invasion des tissus. Ces caractéristiques des cellules tumorales peuvent aussi être à l'origine de nouvelles stratégies anti tumorales.



**Figure 2 :** Les trois E de l'immunoédition d'après Dunn et al. 2002. L'élimination représente l'immunosurveillance de la tumeur par le système immunitaire. L'équilibre est la phase durant laquelle le système immunitaire sélectionne les cellules tumorales les plus résistantes et élimine les moins adaptées. Durant la troisième phase, dite d'échappement, la prolifération des cellules tumorales n'est plus contrôlée par le système immunitaire et la tumeur se développe.

## 2- Microenvironnement immunitaire de la tumeur

### *L'immunoediting*

La théorie de l'immunosurveillance connue depuis les travaux de Ehrlich en 1909 et ceux de Thomas en 1959 a ensuite été redéfinie par R. Schreiber en 2004 (three Es of immunoediting). A partir d'observations sur des modèles murins et sur des cohortes de patients, les auteurs ont définis les trois phases de l'immunoédition : l'élimination, l'équilibre et l'échappement, et ils ont choisi le terme d'immunoédition au lieu d'immunosurveillance afin de mieux rendre compte des interactions complexes entre la tumeur et le système immunitaire aux différents stades de la maladie néoplasique (Dunn et al., 2004).

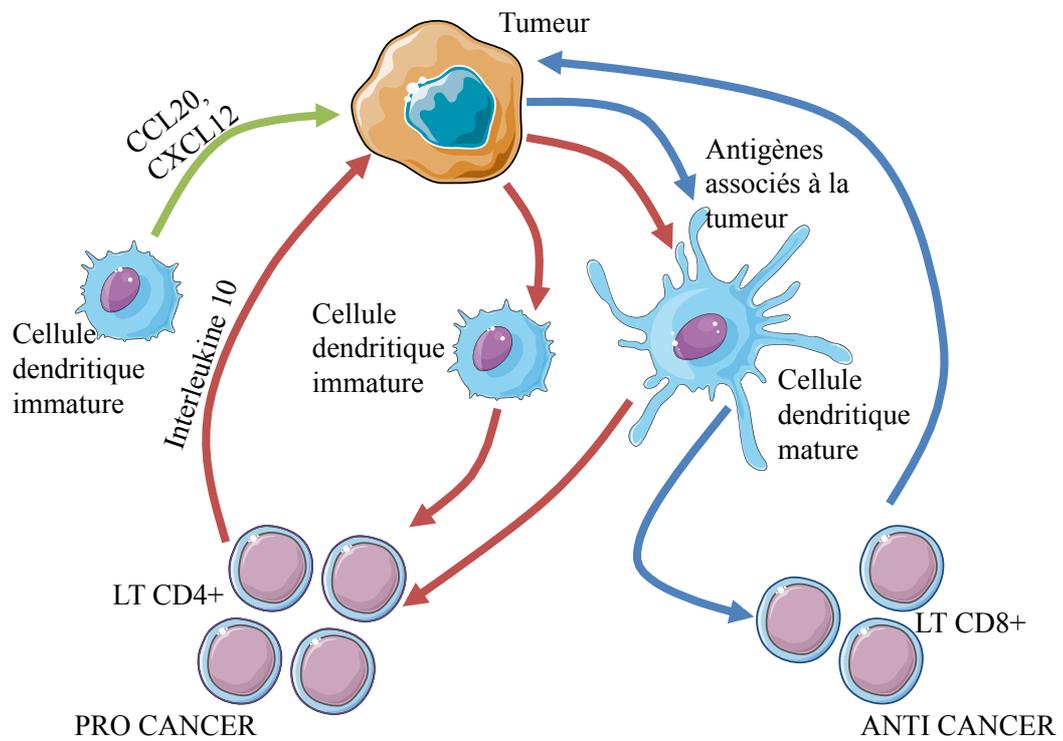
La première phase de l'immunoédition est l'élimination, elle correspond à ce qui à d'abord été définis comme l'immunosurveillance. Cela correspond à la phase de détection de la tumeur par le système immunitaire et à son activation contre la tumeur, pouvant conduire à l'élimination de celle-ci. Il s'agit de l'activation de mécanismes complexes impliquant les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. L'activation de ces mécanismes commence lorsque le système immunitaire reconnaît la tumeur sous la forme de cellules en croissance de façon anormale et d'un stroma désorganisé. La réorganisation du stroma à ce moment peut conduire à la production de molécules proinflammatoires et de chimiokines. Cela va permettre le recrutement et l'activation de cellules du système immunitaire dont les cellules NK, NKT, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et ou les macrophages. Une fois ces cellules activées au site de danger, elles vont augmenter cette réaction par la production d'autres molécules pro inflammatoires et de chimiokines permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires. Cette augmentation de la réaction inflammatoire conduit au recrutement de cellules du système immunitaire adaptatif comme les cellules dendritiques (DCs), celles-ci vont retourner aux ganglions drainant et dans ceux-ci réaliser la présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ présents dans les ganglions. Dans certains types de tumeurs, et notamment les tumeurs du poumon, des structures lymphoïdes tertiaires ont aussi été décrites. Dans ces organes lymphoïdes tertiaires, aussi appelés Ti-BALT (« Tumor-induced-Bronchus Associated Lymphoid Tissue »), les lymphocytes T CD3+ sont associés aux cellules dendritiques matures. Ces structures sont similaires aux structures lymphoïdes tertiaires retrouvées dans les muqueuses. De plus une forte infiltration en Ti-BALT est associé avec un bon pronostic pour la survie des patients (Dieu-Nosjean et al., 2008).



L'état d'élimination peut conduire à deux situations différentes : soit le système immunitaire est capable d'éliminer la tumeur, soit l'activation du système immunitaire ne permet l'élimination de toutes les cellules tumorales et l'on se retrouve dans un état d'équilibre dynamique entre les différents types de cellules immunitaires et la tumeur. Lors de cette phase une sélection comparable à la sélection darwinienne est réalisée sur les cellules tumorales, les clones les plus résistants au système immunitaire vont proliférer alors que les autres seront éliminés. L'acquisition de mutations dues à l'instabilité chromosomique, à l'excision nucléotidique ou des microsatellites va permettre l'évolution des cellules tumorales et leur résistance face au système immunitaire. La phase d'équilibre est la plus longue des trois phases de l'immunoediting et il peut s'écouler plus de vingt ans entre la première exposition au carcinogène et le développement de la tumeur visible macroscopiquement.

La phase d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire est due à une brèche dans le système immunitaire. Cette brèche dans le système immunitaire peut avoir différentes origines. Cela peut être dû à la production de molécules immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  ou par le recrutement et l'activation de lymphocytes T régulateurs. La résistance au système immunitaire peut aussi venir des cellules tumorales elles-mêmes via la modification de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, perte de l'expression de certains antigènes tumoraux, sécrétions des ligands de NKG2D (récepteur activateur des cellules NK), développement d'insensibilité à l'IFN- $\gamma$  ou pertes de molécules impliquées dans les voies de mort cellulaire.

Cette règle des trois Es de l'immunoediting montre le rôle ambivalent du système immunitaire dans les tumeurs et montre encore une fois que le développement de la tumeur est le résultat d'une communication entre la tumeur et son environnement. Les cellules tumorales influencent le système immunitaire autant que celui-ci peut les influencer.



**Figure 3 :** Rôle pro ou anti tumoral des cellules dendritiques et autres cellules de l'immunité (Mantovani et al., 2008).

### 3- Inflammation et cancer

Depuis les travaux de Virchow en 1863, le lien entre inflammation et cancer est connu. Il avait remarqué la présence de leucocytes dans les tissus néoplasiques et l'apparition de cancer majoritairement dans des organes suite à une inflammation chronique. Les travaux réalisés depuis rappellent la ressemblance qu'il y a entre l'inflammation due à une blessure et celle provoquée par l'apparition de cellules tumorales. Ces revues montrent aussi la complexité du processus et son importance dans le développement des cancers (Balkwill and Mantovani, 2001; Coussens and Werb, 2002; Balkwill and Coussens, 2004).

Dans les cas d'une inflammation consécutive à une blessure, le recrutement de différents types cellulaires dont les macrophages, neutrophiles ou cellules dendritiques et la réorganisation de la matrice extracellulaire vont conduire à la formation d'un nid dans lequel les fibroblastes et les cellules endothéliales vont pouvoir migrer et proliférer pour reformer le tissu endommagé grâce aux facteurs de croissance présents.

Les chimiokines et cytokines restant dans le milieu après la reformation du tissu vont jouer un rôle important dans le développement ou non d'une inflammation chronique et des molécules telles que le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$  vont jouer un rôle important dans le maintien de l'état inflammatoire.

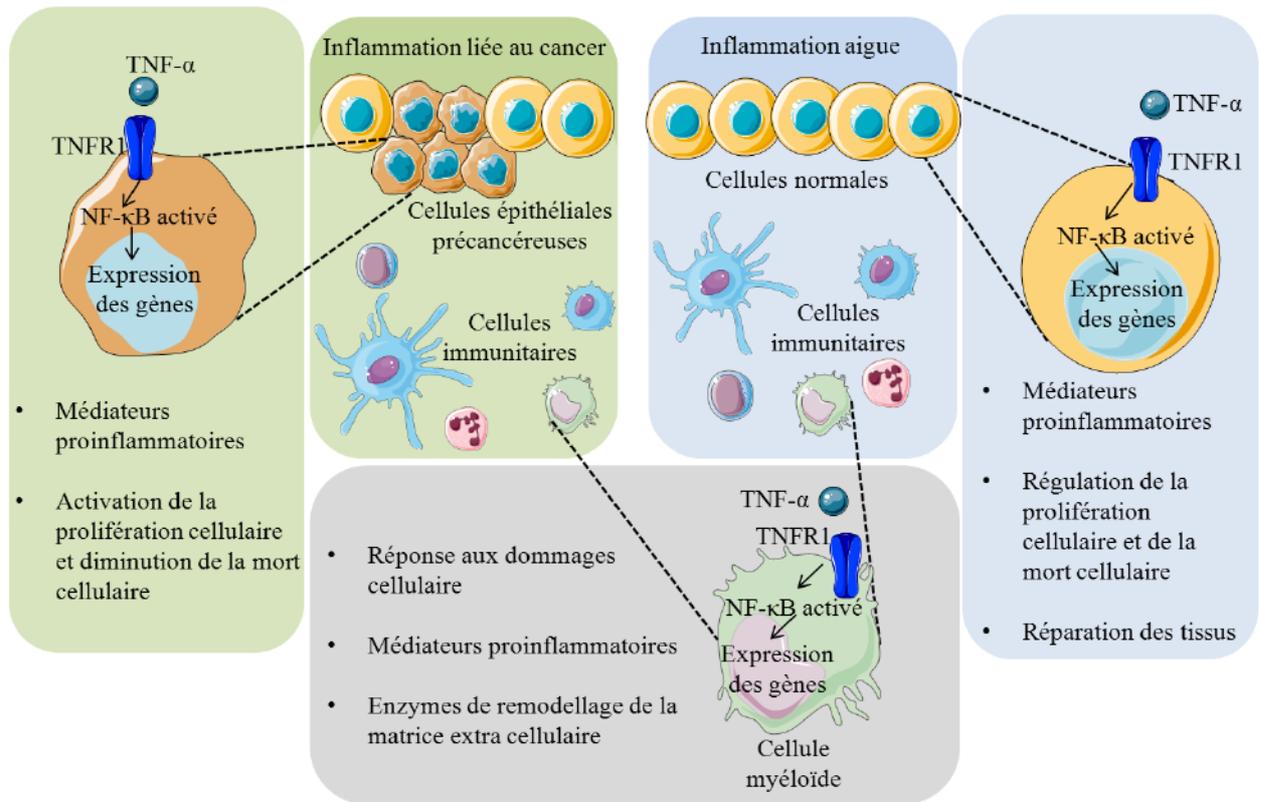
Différents types cellulaires sont à l'origine de la production des molécules proinflammatoires. Les articles de Coussens et Werb 2002; Mantovani et al. 2008 décrivent l'influence des macrophages et des cellules dendritiques associés aux tumeurs. Pour ces auteurs, l'induction de l'inflammation associée à la tumeur est majoritairement due au système immunitaire inné. Le système immunitaire adaptatif participe aussi au développement et au maintien de l'inflammation protumorale mais ces phénomènes sont initiés et maintenus par le système immunitaire inné.

Suivant les cytokines produites dans le milieu, la polarisation des cellules immunitaires se fait différemment. La polarisation des lymphocytes T en Th1 et des macrophages en M1 suite à l'activation par l'interféron- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , la reconnaissance de molécules bactériennes (LPS), ou le GM-CSF et va conduire à la production d'IL-12, IL-23, radicaux oxygénés libres, IL-1 et de TNF- $\alpha$ . La polarisation Th2 des lymphocytes T et M2 des macrophages se fait en présence d'IL-4 et IL-13 et va conduire à la production de fortes quantités d'IL-10. La polarisation Th2/M2 est dite pro-tumorale alors que la polarisation Th1/M1 est dite anti-tumorale (Sica and Mantovani, 2012).



L'inflammation provoquée par la tumeur peut aussi conduire au recrutement de cellules dendritiques via des chimiokines comme CCL20 ou CXCL12. Cependant, leur maturation peut être altérée dans la tumeur par le VEGF ou l'IL-6. La présence de ces molécules peut bloquer la maturation des cellules dendritiques, induire la production d'IL-10 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et rendre non fonctionnels ces deux types cellulaires. Ils deviennent alors tolérogènes pour les cellules tumorales. (Figure 3, Mantovani et al. 2008)

D'autres cellules de l'immunité innée ont un rôle protumoral. C'est le cas des neutrophiles dont le rôle protumoral a été récemment publié, comme les macrophages, les neutrophiles sont recrutés aux sites d'inflammation et vont activer la prolifération cellulaire, la migration des cellules tumorales via la dégradation de la matrice extracellulaire et la néoangiogenèse (Gregory and Houghton, 2011).



**Figure 4 :** Effet de l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules tumorales, immunitaires et épithéliales. D'après Balkwill et Coussens 2004.

## 5- Le rôle de NF- $\kappa$ B dans l'inflammation protumorale

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription majeur de l'inflammation. De nombreux processus d'inflammation sont activés par la transcription de gènes dus à l'activation de NF- $\kappa$ B. La régulation de NF- $\kappa$ B est très fine et implique de nombreuses autres protéines. L'inhibiteur principal de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B est IKK. Lorsque IKK est phosphorylé, il est ensuite dégradé par le protéasome. Cela libère NF- $\kappa$ B, qui va alors être transloqué dans le noyau et activer la transcription d'autres facteurs proinflammatoires.

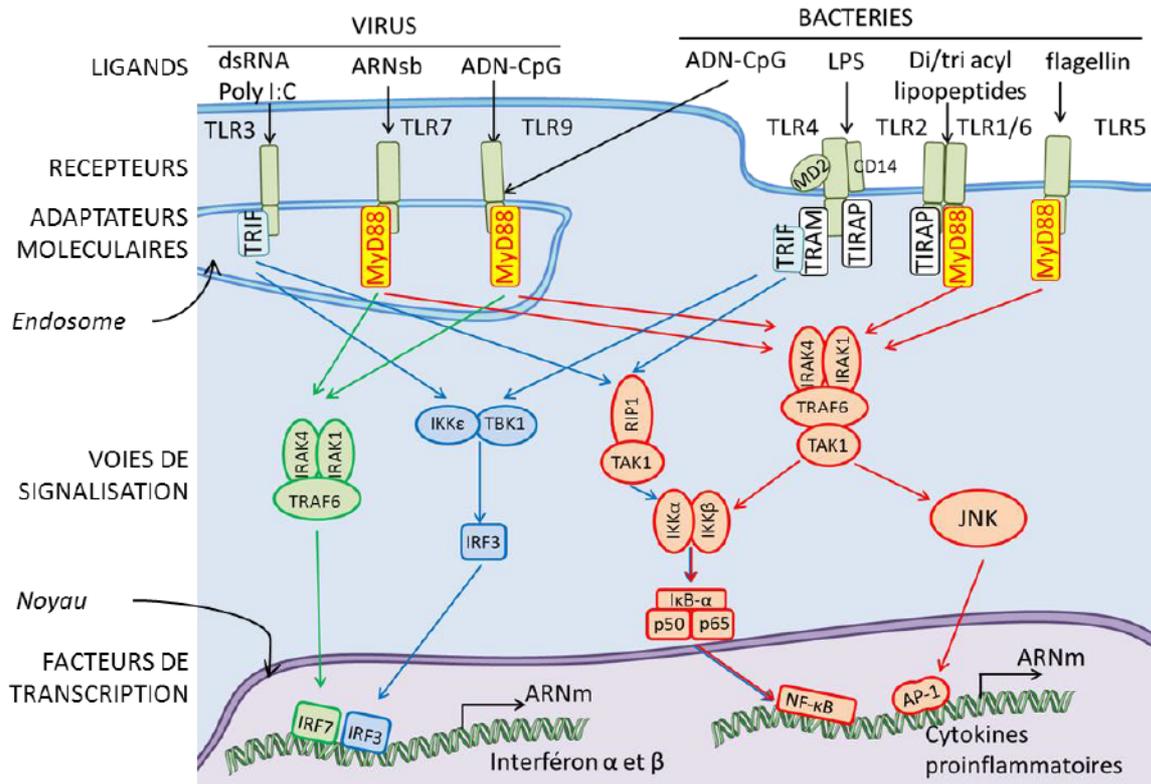
L'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B par la reconnaissance entre le TNF et son récepteur, peut avoir des effets opposés selon les tissus dans lesquels elle est activée. Dans les tissus normaux, cela provoque une inflammation aiguë induisant dans les cellules épithéliales, une augmentation de la production de molécules proinflammatoires, une régulation de la prolifération et de la mort cellulaire (les cellules endommagées entrent en apoptose alors que les autres prolifèrent pour maintenir l'homéostasie tissulaire), et une réparation des tissus. Au niveau des cellules immunitaires, l'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B conduit à une réponse des cellules aux dommages causés, une augmentation de la production de médiateurs proinflammatoires et d'enzymes de remodelage de la matrice extra cellulaire.

Dans les cellules tumorales, l'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B conduit à la production de médiateurs proinflammatoires et à la régulation de la mort cellulaire. Mais dans ces cas là, une diminution de la mort cellulaire et une augmentation de la prolifération cellulaire sont observées (Balkwill and Coussens, 2004). Cela passe notamment par la production de protéines anti apoptotiques comme celles de la famille des IAPs qui vont se lier à des effecteurs de l'apoptose et notamment les procaspases-3 et 7. D'autres molécules anti apoptotiques comme les protéines de la famille de Bcl-2 sont retrouvées surexprimées dans certains cancers.

## 6- TLRs, inflammation et cancer

### *Infection, inflammation et cancer*

Il existe des preuves épidémiologiques du lien entre infection, inflammation et cancer. Dans le cas d'infection par la bactérie *Helicobacter Pylori* des inflammations chroniques de l'épithélium gastrique intestinal sont observées, conduisant à une augmentation de l'incidence des cancers gastriques chez les patients infectés par la bactérie. Lorsque les patients sont infectés par les virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C, une hépatite chronique peut se



**Figure 5:** Ligands et voies de signalisation des TLRs. Des PAMPs viraux sont reconnus par TLR3, 7, 8 et 9 alors que des PAMPs bactériens sont reconnus par TLR2/1, 2/6, 4 et 9. La majorité des TLRs ont comme adaptateur moléculaire MYD88. TRIF, TRAM et TIRAP sont beaucoup plus rarement impliqués mais toutes les voies de signalisation conduisent à l'activation de NF-κB. D'après Kluwe et al 2009.

développer et se terminer par un carcinome hépatocellulaire. Le virus d'Epstein Barr est quant à lui responsable de carcinome nasopharyngé ou de lymphome de Burkitt. Dans tous ces cas, la première étape du développement du cancer est l'altération des barrières comme la peau ou les muqueuses, conduisant à l'infection, à l'activation des macrophages et d'autres cellules de l'immunité innée puis au développement de l'inflammation chronique et enfin au développement du cancer.

Dans les cancers non induits par des infections, les étapes sont les mêmes. Le cancer apparaît lorsque les barrières sont soumises à des agressions répétées. C'est le cas dans les poumons, exposés au tabac, aux hydrocarbures ou au nickel.

Dans les cancers en général, ces données épidémiologiques montrent l'importance du système immunitaire inné et de l'inflammation qui résulte de son activation. Certains récepteurs présents à la surface de ces cellules ont un rôle primordial dans l'activation de ces cellules et permettent la reconnaissance de signaux de danger. Il s'agit des PRR (Karin et al., 2006).

#### *Les TLRs*

Les PRR ou Pattern Recognition Receptors, sont les récepteurs de l'immunité innée permettant une discrimination entre les molécules du soi et du non soi par les cellules de l'immunité innée et une réponse immunitaire rapide à la découverte de molécules du non soi. Ce processus de reconnaissance des pathogènes ou des dommages cellulaires (inflammation, cellules dégradées, etc) enclenche l'activation des cellules immunitaires innées : mastocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles... Ces cellules vont phagocyter les pathogènes et permettre la présentation antigénique par les cellules dendritiques afin d'activer les cellules de l'immunité adaptative.

Les TLRs sont une famille de 11 récepteurs. Ils sont nommés ainsi en référence aux protéines codées par le gène toll et retrouvé chez la drosophile. Les TLRs connus chez les mammifères partagent en effet une grande similarité avec ce groupe de protéines. Les TLRs sont définis par la présence de domaines LRR (Leucin Rich Repeat) sur leur partie extracellulaire et un domaine TIR (Toll Interleukine-1 Receptor) sur la partie intracellulaire. La diversité des TLR permet la reconnaissance de nombreux ligands de types différents et d'origines différentes. Ainsi, TLR2, formant un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6 va reconnaître des composants de la membrane des bactéries GRAM+ ; TLR4, le LPS de la paroi des bactéries GRAM- ; TLR5, la flageline des bactéries flagellées ; TLR3, des ARN bactériens ou viraux double brin ; TLR7, des ARN bactériens ou viraux simple brin ; TLR8, des ADN ou ARN viraux ou bactériens ; TLR9, des fragments d'ADN bactériens riches en C et G (CpG).

**Tableau 2 :** Ligands endogènes possibles des TLRs Adapté de M. F. Tsan, 2006. Pour le moment, peu de ligands endogènes des TLRs sont connus. Ce sont pour la plupart des protéines, ligands de TLR4 et TLR2.

<b>Molécule endogène</b>	<b>Préparation</b>	<b>TLR impliqué(s)</b>
Fibrogène	Protéine native purifiée	TLR4
Protéine A du surfactant	Protéine native purifiée	TLR4
Domaine extracellulaire A de la fibronectine	Produit recombinant	TLR4
Heparan sulfate	Fragments de polysaccharide purifiés	TLR4
Acide hyaluronique soluble	Fragments de polysaccharide purifiés	TLR4
Défensine $\beta$ 2	Protéine recombinante fusionnées	TLR4
HMGB1 (High mobility group box1 protein)	Protéine native purifiée	TLR4 et TLR2
ARN messenger	ARN transcripts in vitro et ARNm natif purifiés	TLR3

Pour permettre la reconnaissance de composés des membranes bactériennes, les TLR2 et TLR4 sont présents à la surface des cellules alors que les TLR3, 7, 8 et 9 sont présents dans les endosomes intracellulaires.

La reconnaissance des PAMPs par les TLRs est une pierre d'angle de l'activation du système immunitaire inné. Cela permet une activation efficace et rapide de celui-ci. Même si les TLRs ont des ligands différents, les voies de signalisation activées sont les mêmes (figure 5). Dans la plupart des cas, l'adaptateur moléculaire permettant la transduction du signal est MYD88, sauf pour TLR3 où l'adaptateur est TRIF, pour TLR4 où il s'agit de TRAM et pour TLR2 où il s'agit de TIRAP. Toutes ces voies de signalisation conduisent à la liaison entre NF- $\kappa$ B et l'ADN cellulaire et permettent la transcription d'ARNm codant pour des cytokines proinflammatoires et à la liaison entre les IRF3 et 7 et l'ADN et entraînent la transcription d'ARNm codant pour les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  (Figure 6).

Les voies de signalisation principalement activées par les TLRs sont celles de NF- $\kappa$ B, des MAPkinases, de c-JUN kinases impliquées dans la sécrétion des cytokines inflammatoires et dans la prolifération et des IRF impliquées dans la production des interférons de type I (IFNs  $\alpha$  et  $\beta$ ). Ces voies de signalisation vont permettre l'orchestration de la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte contre les pathogènes. Mais il a aussi été montré que les TLRs permettent la régulation de la mort cellulaire via l'activation de la production de protéines anti-apoptotiques comme bcl-2 ou d'inhibiteur de la voie des caspases de la famille des IAPs. Cela permet de réguler l'homéostasie des tissus en cas de blessure puisque les TLRs en plus d'être exprimés par les cellules du système immunitaire, sont exprimées par les cellules épithéliales des tissus.

Les TLRs ont deux rôles très intéressants pour la réparation et le maintien des tissus. Dans le cas d'infection par des pathogènes, ils permettent l'activation du système immunitaire généralement dans des organes en contact avec le milieu extérieur ou la flore bactérienne.

Dans le cas de dommages causés par une blessure, l'activation des TLRs va permettre la réparation des tissus par une activation de la division cellulaire ou une inhibition de l'apoptose. Dans ces cas-là les ligands des TLRs ne sont plus les PAMPs mais des molécules internes relarguées dans le milieu en cas de nécrose ou par la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles sont appelées DAMPs pour Damaged Associated Molecular Patterns. Certains de ces ligands ont déjà été identifiés, notamment pour TLR4 et TLR2. Ils sont cités dans le tableau 2.



## 7- TLRs et tumeurs

Le rôle des TLRs dans l'initiation et le développement de la réponse immunitaire et inflammatoire en fait un élément clé du lien entre infection, inflammation et cancers. Cependant, les études réalisées sur le rôle des TLRs dans les tumeurs sont plutôt contradictoires. D'après certains auteurs, la stimulation des TLRs entraîne une réponse immunitaire pouvant combattre voire éliminer les cellules tumorales alors que pour d'autres, la stimulation des TLRs dans les tumeur joue un rôle protumoral en favorisant un environnement inflammatoire chronique ou en stimulant directement les cellules tumorales.

### *Rôle anti tumoral des TLRs*

Des ligands des TLRs sont déjà utilisés dans certaines immunothérapies anti cancéreuses. C'est le cas de l'imiquimod et du gardiquimod, des ligands de synthèse de TLR7 pour le moment étudiés dans le traitement de mélanome B16 chez la souris C57Bl/6. Dans cette étude, les auteurs activent le système immunitaire et particulièrement les cellules dendritiques plasmacytoïdes contre la tumeur avec ces agoniste de synthèse de TLR7 (Drobits et al., 2012). Des ligands de TLR4, obtenus par l'inactivation de microorganismes sont utilisés dans le traitement de cancers de la tête et du cou ou dans les cas de cancers de la vessie invasifs (Fávaro et al., 2012). Pour TLR9, des motifs CpG, administrés avec des taxanes sont en essais cliniques de phase II dans le cas de CPNPC et la survie des patients ainsi traités semble être prolongée par rapport à celle des patients traités avec la chimiothérapie seule (Manegold et al., 2008). Un essai clinique de phase III est programmé afin de confirmer ces résultats.

Les TLRs sont exprimés par les cellules de l'immunité innée, monocytes, macrophages, ainsi que par les cellules dendritiques. Le rôle anti tumoral des ligands des TLRs vient de l'activation des cellules immunitaires contre la tumeur. Cette activation a été bien décrite dans le cas de traitement de mélanomes cutanés avec des agonistes de TLR7 (Drobits et al., 2012; Jiménez-Baranda et al., 2012). Dans un premier temps, la stimulation de TLR7 peut provoquer la transformation des DCs plasmacytoïdes en DCs tueuses qui vont pouvoir lyser les cellules tumorales ciblées. La stimulation de TLR7 dans ce cas là peut augmenter la présentation antigénique et donc la réponse immunitaire contre la tumeur. Cela peut aussi avoir un rôle indirect sur les cellules immunitaire en activant la production d'interférons de type I par les cellules dendritiques. Cette production d'interférons conduit à l'activation des cellules NK, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, et des lymphocytes B.



### *Rôle pro tumoral de l'activation des TLRs*

Dans les travaux réalisés précédemment au laboratoire sur le rôle de TLR7 dans le CPNPC, nous avons montré un rôle protumoral de la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales. Dans ce cas-là, la stimulation de TLR7 induit l'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B, de celle des MAPkinases et donc une augmentation de la prolifération des cellules tumorales et une résistance à la chimiothérapie (Cherfils-Vicini et al., 2010).

Sur une lignée de cellules tumorales de cancer du sein, l'expression de différents TLRs a été montrée, la lignée utilisée présente en quantités variables des ARNm pour les TLRs 1 à 10 avec une quantité particulièrement importante de TLR4. Dans ces expériences, les auteurs ont montré que la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les cellules tumorales était diminuée lorsque les cellules sont transfectées avec des siARN dirigés contre le TLR4. Ainsi, l'absence de TLR4 diminue l'inflammation de l'environnement de la tumeur (Yang et al., 2010).

De la même façon, la présence de TLR4 sur des lignées cellulaires de cancer du colon a été observée. Dans ce cas là, les auteurs observent :

- la stimulation des cellules tumorales par le LPS, via TLR4, avec une augmentation de la production par les cellules tumorales de cytokines pro inflammatoires (IL-6 et IL-12)
- l'immunosuppression par inhibition de la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules Natural Killer.
- la diminution de la taille des tumeurs des souris et l'augmentation de leur survie lorsqu'elles sont traitées par des siARN dirigés contre TLR4.

Les auteurs concluent de ces travaux que la présence de TLR4 sur les cellules tumorales diminue l'activation des cellules immunitaire et que cela diminue leur réponse contre la tumeur. Cependant leurs travaux ne donnent pas de résultats sur l'activation de TLR4 sur les cellules tumorales. Selon eux, cela ne pourra être étudié que lorsque les ligands endogènes de TLR4 seront connus. Ils ont cependant observé une diminution de la taille des tumeurs lorsque les souris sont traitées avec des siARN ciblant TLR4 et leur survie est prolongée. Ils concluent de ces travaux que la présence de TLR4 sur les cellules tumorales est un facteur protumoral (Huang et al., 2005).

Des résultats attestant du rôle protumoral de la stimulation des TLRs ont été montrés sur des lignées de cellules tumorales de carcinome hépatocellulaire murin exprimant le TLR2 et le



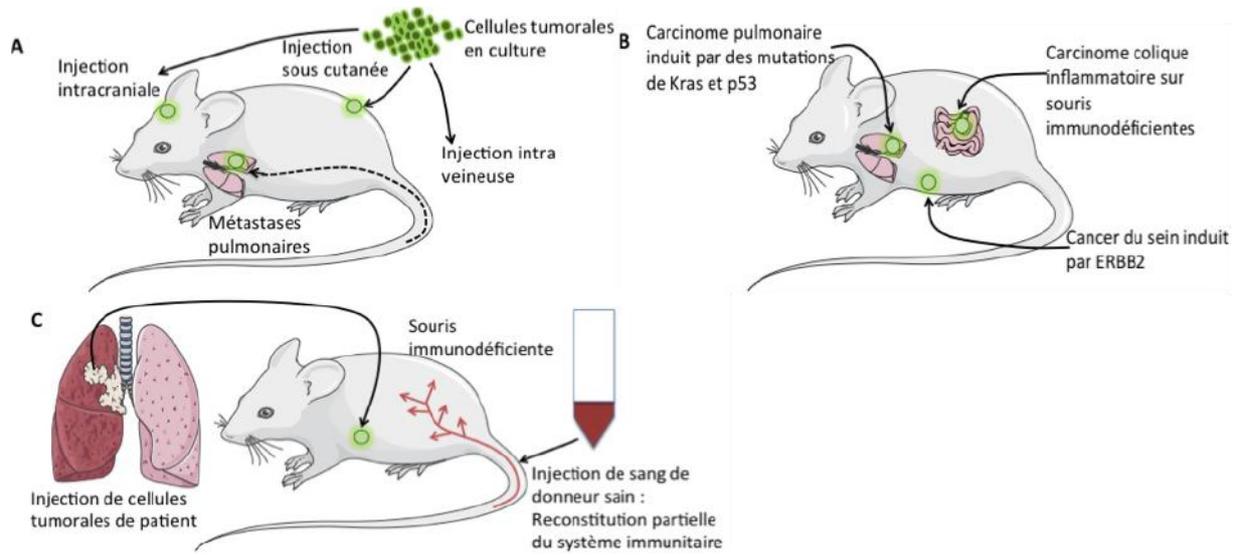
TLR4. Dans ce cas là, la présence d'agonistes de TLR2 induit une augmentation de la croissance tumorale par rapport au groupe contrôle. Dans cette étude, l'augmentation de la prolifération cellulaire observée est due à un effet direct de l'agoniste de TLR2 sur les cellules tumorales. La présence de la bactérie au contact des cellules tumorales induit une activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B et de la voie de signalisation des MAP kinases. Cette étude apporte une autre preuve de l'étroite relation entre infection et cancer et montre aussi le rôle possible que les TLRs peuvent avoir sur la prolifération des cellules tumorales (Huang et al., 2007).

#### *Rôle pro-tumoral de TLR7 dans les tumeurs*

D'autres articles se sont intéressés à l'effet de la stimulation de TLR7 coexprimé par les cellules tumorales. L'équipe Ochi et al. a publié en 2012 un article sur le rôle pro-tumoral de TLR7 dans la carcinogenèse pancréatique. Chez l'homme, un pourcentage non négligeable de patients exprime TLR7 sur leurs cellules tumorales, il en va de même pour leur modèle de cancer du pancréas chez la souris induit par une mutation de Kras et de p38. Dans cet article, les auteurs ont démontré le rôle fortement protumoral de la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales et sur les cellules du microenvironnement tumoral. Ainsi, pour les auteurs, l'expression de TLR7 par les cellules tumorale n'est pas le seul facteur protumoral, mais l'inflammation maintenue dans le microenvironnement de la tumeur est aussi fortement protumorale.

Ces résultats renforcent l'hypothèse défendue par Julien Cherfils au laboratoire sur le rôle protumoral de la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales. Dans cet article la stimulation de TLR7 par des agonistes de synthèse induit une augmentation de la prolifération cellulaire et de la résistance à la chimiothérapie. Une signature moléculaire a été définie, montrant une augmentation de gènes antiapoptotiques comme bcl-2.

La stimulation de TLR7 étant possiblement induite par la présence de PAMPs, dans le cancer du poumon, son étude est primordiale. Le poumon est en effet un organe à l'interface entre le milieu intérieur et le milieu extérieur, il est donc soumis à de nombreuses agressions virales ou bactériennes. L'étude des phénomènes conduisant à la progression tumorale nous a paru particulièrement importante. Pour cette étude, nous avons eu besoin d'étudier un environnement complexe comprenant à la fois les cellules tumorales et des les cellules du système immunitaire, inné ou adaptatif.



**Figure 6 :** Les différents types de modèles murins d'étude de l'immunologie des tumeurs pulmonaires. A, Tumeurs transplantables. B, Tumeurs génétiquement induites. C, Souris humanisées. (Dranoff, 2011)

### III- Modèles murins en immunologie des tumeurs.

L'utilisation de modèles murins a permis depuis de nombreuses années de comprendre les mécanismes de formation et de croissance et d'étudier les traitements possibles des tumeurs. Ils sont d'ailleurs une étape essentielle dans l'étude de nouveaux traitements et notamment de nouvelles immunothérapies. Il existe trois principaux systèmes d'étude des tumeurs chez le petit animal, les tumeurs transplantables, les tumeurs génétiquement induites et les tumeurs greffés à des souris humanisées.

Les tumeurs transplantables sont le modèle le plus simple à mettre en place et à étudier. Pour cela des lignées de cellules tumorales sont utilisées. Il s'agit de cellules tumorales apparues de manière spontanée sur des animaux (le mélanome B16, la carcinome épidermoïde LLC, la carcinome du sein 4T1 ou le lymphome à cellules T EL4 etc) ou induite par des agents chimiques (lignée de fibrosarcome obtenues par injection de methylcholanthrène). Ces tumeurs facilement cultivables in vitro permettent une comparaison des tests réalisés in vitro avec les résultats obtenus chez les animaux. Les cellules après culture et amplification sont injectées par différentes voies sur des animaux de même fond génétique que les cellules. Des cellules tumorales humaines peuvent aussi être greffées sur des lignées murines immunodéficientes. Ces tumeurs ont généralement une croissance rapide et forment des tumeurs de grande taille en quelques semaines de façon très reproductible entre les animaux, rendant ces techniques utiles pour l'évaluation de traitements curatifs ou prophylactiques des tumeurs.

L'utilisation de transfert de gènes a permis ces dernières années de coupler à ces techniques l'utilisation de la bioluminescence. Le suivi de la croissance tumorale et de la formation de métastase est facilité par les procédés de détection de la luminescence in vivo. Par le même procédé de transfert de gènes, il est possible de rendre plus immunogéniques ces tumeurs. Pour cela, des antigènes comme l'ovalbumine sont introduits dans le patrimoine génétique des cellules tumorales injectées aux souris. L'ovalbumine étant une protéine retrouvée dans le blanc d'oeuf, elle induit une forte réponse immunitaire.

Dans l'étude de l'immunité antitumorale, ces modèles ont permis la découverte de nombreux traitements antitumoraux qui ont été testés sur des modèles de tumeurs transplantables et la démonstration de la théorie de l'immunoediting. Cependant, certaines des phases de l'immunoediting ne sont pas ou difficilement étudiables sur des modèles de tumeurs transplantables du fait de leur faible immunogénicité ou de leur croissance extrêmement rapide et de tels modèles ne sont que peu pertinents par rapport aux pathologies humaines

**Tableau 3 :** Forces et limites des modèles utilisés dans l'étude de l'immunologie des tumeurs. (Dranoff, 2011)

Modèle expérimental	Forces	Limites
Tumeurs transplantables	<ul style="list-style-type: none"> <li>• simplicité de l'expérimentation</li> <li>• formation de la tumeur rapide et évaluation de la réponse au traitement rapide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reconstitution du microenvironnement peu relevante</li> </ul>
Tumeurs génétiquement induites	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutations génétiques retrouvées dans les cancers humains</li> <li>• Meilleure relevance du microenvironnement immunitaire et de la croissance tumorale</li> <li>• Tolérance à la tumeur par le système immunitaire et immunosuppression similaire à ce qui est observé dans les tumeurs humaines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Développement de la tumeur et de la réponse aux thérapeutiques plus longue</li> <li>• Augmentation du cout et de la complexité de la génération et maintien des lignées</li> </ul>
Souris humanisées	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etude directe des populations immunitaires humaines</li> <li>• Reproduit l'hétérogénéité des tumeurs humaines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• difficile d'avoir une compatibilité entre le donneur de sang et de l'échantillon tumoral</li> <li>• Reconstitution du système immunitaire incomplète</li> <li>• Impact des facteurs murins sur les cellules immunitaires humaines non complètement défini</li> <li>• Cout élevé</li> </ul>

Pour remédier à cela, et étudier dans des conditions plus physiologiques le développement de la tumeur et la réponse immunitaire contre celle-ci, des modèles de tumeurs induites génétiquement ont été mis au point. Des enzymes entraînant des réarrangements de l'ADN des cellules comme la recombinaison CRE et qui permettent d'exciser le moment voulu un gène anti oncogène, ou l'injection de virus intégratif contenant des protooncogènes sont utilisés. Les gènes visés sont généralement K-ras et p53 qui sont retrouvés mutés dans de nombreuses tumeurs humaines. Ces deux techniques permettent la reproduction de tumeurs proches des tumeurs humaines puisque les causes en sont plus proches que lors de l'injection de lignées de cellules tumorales. L'utilisation de tels modèles peut être couplée à la bioluminescence afin de suivre la croissance tumorale au site de développement ainsi que la formation de métastases à distance.

Cependant le système immunitaire murin est différent du système immunitaire humain. L'utilisation de souris humanisées permet d'avoir une réponse sur le comportement du système immunitaire humain à la présence de cellules tumorales. Il s'agit aussi du système le plus complexe car il nécessite des souris fortement immunodéficientes. Chez ces souris le système immunitaire est absent ou non fonctionnel. Celui-ci est reconstitué par l'injection de cellules immunitaires humaines. Selon les recherches menées, les cellules humaines peuvent varier. Des recherches de ce type avec injection de cellules dendritiques, lymphocytes B et lymphocytes T ont permis de déterminer comment se fait la présentation antigénique afin d'activer la réponse immunitaire adaptative contre des tumeurs du sein humaines.

Ces trois modèles d'études présentés dans le tableau 3, ont chacun leur intérêt dans l'étude de l'immunité des tumeurs et des immunothérapies antitumorales. Tous ont leurs forces et leurs faiblesses dans la compréhension du développement tumoral et du microenvironnement immunitaire. Cependant, aucun de ces modèles ne permet une compréhension complète du microenvironnement immunitaire de la tumeur et de l'effet des immunothérapies contre les tumeurs.



# Matériels et méthodes

## 1- Marquage de TLR7 en cytométrie en flux et immunohistochimie

L'expression de TLR7 est détectée par cytométrie en flux ou par immunohistochimie. Dans les deux cas, le protocole de détection était déjà mis en place à mon arrivée au laboratoire. Sur les lignées de cellules tumorales, le protocole le plus utilisé est la cytométrie en flux. L'expression de TLR7 sur les cellules est majoritairement intracytoplasmique. Il y a donc une étape de perméabilisation avant l'ajout de l'anticorps. L'anticorps utilisé est un anticorps polyclonal de lapin directement couplé à la phycoerythrine (PE). La quantification de l'expression de TLR7 sur les cellules tumorales par cytométrie en flux se fait en déterminant l'intensité de fluorescence moyenne des cellules (MFI).

En immunohistochimie, le protocole est à moitié automatisé. Les étapes de déparafinage des lames et démasquage antigénique se font manuellement alors que l'étape de marquage peut se faire grâce à un automate. L'anticorps utilisé est le même que pour la cytométrie en flux. Un anticorps fait chez la chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à la biotin est utilisé comme anticorps secondaire. La reconnaissance entre la biotin et la streptavidine couplé à la horse raddish peroxydase (HRP) permet une amplification du signal ainsi que la révélation des cellules marquées.

La quantification de l'expression de TLR7 par les cellules tumorales se fait manuellement. Il s'agit d'évaluer le pourcentage de cellules tumorales positives sur 10 champs de la tumeur à l'objectif 20 du microscope et de faire une moyenne sur ces 10 champs.

(Voir annexe 4 pour les références des anticorps et produits)

## 2- Expériences de résistance à la chimiothérapie in vitro

Les expériences de résistance aux chimiothérapies ont été précédemment réalisées au laboratoire par un comptage de colonies formées et colorées au crystal violet (cf annexe 1, triggering of TLR7...). L'utilisation de ce test était possible car les lignées cellulaires utilisées A549 et SK-MES sont des lignées cellulaires adhérentes. Pour les expériences réalisées dans cette étude, cela n'était pas possible car les cellules de la lignée cellulaire LL/2 ne sont pas complètement adhérentes et ne forment pas de colonies in vitro.

Nous avons donc utilisé le test simple de comptage au bleu trypan. Le bleu trypan permet de marquer les cellules mortes et un comptage des cellules sous microscope permet une évaluation du nombre de cellules mortes et de cellules vivantes dans chacune des conditions.

**Tableau 4 :** Agonistes de TLR7 utilisés.

agoniste	Type de composé	Effets sur les cellules tumorales	Doses utilisées
Loxoribin	Analogue de la guanosine	- effet protumoral sur les cellules A549 - pas d'effet sur les cellules tumorales LL/2 - effet sur les cellules murines du système immunitaire (C57Bl/6)	- 10µg - 40µg
CL264	Analogue de l'adénine	- effet sur les cellules murines du système immunitaire (C57Bl/6) - effet protumoral sur les cellules LL/2	- 10µg - 40µg

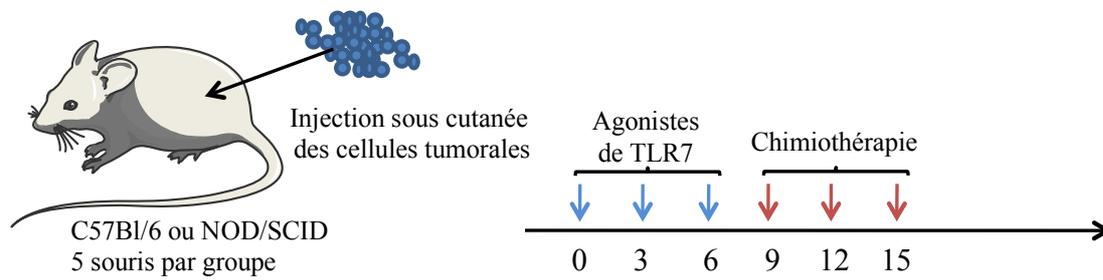
Les cellules sontensemencées à raison de  $0,3 \times 10^6$  cellules par puits dans 1mL de leur milieu de culture habituel, DMEM+10% SVF pour les cellules LL/2 et CCL10% pour les A549 (voir annexe 5 pour la composition des milieux de culture). Elles sont incubées 48h avec les agonistes de TLR7 à différentes doses puis la chimiothérapie est ajoutée pour 24h. Les cellules dans les puits sont ensuite comptées au bleu trypan (dilution au 1/10 dans le bleu trypan et comptées sur cellules de Malassez).

### 3- Agonistes et immunorégulateurs de TLR7 utilisés.

Seuls des agonistes de synthèse de TLR7 ont été utilisés pour ces expériences. Il s'agit d'analogues de bases de l'ADN. L'agoniste de TLR7 utilisé à mon arrivée au laboratoire était la loxoribine, cet analogue de la guanosine est actif sur les cellules A549. Lorsque nous avons commencé les expériences sur les cellules LL/2, nous nous sommes rendus compte que la loxoribine n'a aucun effet sur ces cellules. J'ai donc testé d'autres agonistes et nous avons remplacé la loxoribine par le CL264 pour les expériences sur les cellules LL/2. Dans le tableau 4, tous les agonistes de TLR7 utilisés dans cette étude sont regroupés et leurs effets sur les différentes lignées cellulaires ou sur le système immunitaire sont résumés.

Il n'existe actuellement pas d'inhibiteur ou d'antagoniste de TLR7 mais afin de contrer les effets de la stimulation du récepteur chez les souris, nous avons utilisé des immunorégulateurs. Il s'agit de petites séquences d'ADN empêchant la transcription puis la traduction de la protéine. L'oligonucléotide est nommé IRS661 (Barrat et al., 2005; Ushida et al., 2012) et sa séquence est la suivante : 5'-GCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3'. Comme contrôle, nous avons utilisé une autre séquence oligonucléotitique appelée ODN et de séquence suivante : 5'-TCCTGCAGGTTAAGT-3'. Les deux molécules ont été injectées à raison de 40µg par injection et par souris.

Pour les injections aux animaux, tous les agonistes, chimiothérapies et immunorégulateurs sont préparés afin d'être injectés dans 100µL de PBS 1X.



**Figure 7 :** Modèles d'injections des cellules tumorales et de traitements avec les agonistes de TLR7 et la chimiothérapie sur les souris NOD/SCID ou C57Bl/6. Les cellules tumorales sont injectées au jour 0, les agonistes de TLR7 aux jours 0, 3 et 6 et la chimiothérapie aux jours 9, 12 et 15.

#### 4- Animaux utilisés.

Deux lignées murines ont été utilisées pour ces expériences. Les expériences réalisées ont d'abord concerné les cellules A549 puisqu'il s'agissait de la suite des travaux de Julien Cherfils sur des lignées cellulaires humaines de CPNPC. Nous avons donc commencé nos expériences *in vivo* de résistance à la chimiothérapie avec les cellules A549 greffées à des souris NOD/SCID immunodéficientes. Ces souris autorisent les greffes xenogéniques. Elles n'ont pas de lymphocytes B ou T (leur développement est altéré) et leur cellules Natural Killer (NK) sont altérées. Les autres cellules du système immunitaire, (monocytes, macrophages, granulocytes, etc) ainsi que le système du complément sont normaux. Les expériences ont été commencées sur des souris âgées de 6 à 10 semaines, à partir d'un élevage réalisé au Centre d'Exploration Fonctionnelle du CRC.

La lignée cellulaire LL/2 est une lignée murine. Nous avons donc pu la greffer à des souris C57Bl/6 immunocompétentes de même fond génétique H2b. Ces souris sont issues de l'élevage de Charles River. Les expériences ont été commencées sur des souris âgées de 7 semaines.

#### 5- Expériences *in vivo*

Les expériences de suivi de la croissance tumorale et de résistance à la chimiothérapie suite à l'injection d'agonistes de TLR7 sont toutes réalisées sur le même schéma (figure 7). Les cellules tumorales sont injectées par voie sous cutanée au J0 de l'expérience à raison de  $1 \times 10^6$  cellules par souris, dans 100 $\mu$ L de PBS 1X. Aux jours 0, 3 et 6, les souris reçoivent les agonistes de TLR7 à différentes doses, toujours dilués dans 100 $\mu$ L de PBS 1X. Les agonistes utilisés sont la loxoribine à 10 ou 40 $\mu$ g et le CL264 à 10 ou 40 $\mu$ g. Le contrôle utilisé est le PBS 1X, injecté aux mêmes jours que les agonistes et avec le même volume.

Dans le cas où une chimiothérapie est injectée, celle-ci est administrée lorsque les tumeurs cutanées sont palpables chez tous les animaux. Les tumeurs sont palpables chez certains animaux lors de la dernière injection de l'agoniste de TLR7, les animaux sont donc traités par la chimiothérapie à partir du jour 9 et aux jours 12 et 15. La chimiothérapie utilisée est le cisplatine. Nous avons choisi cette chimiothérapie car il s'agit de la plus utilisée dans le traitement des CPNPC.

La taille de la tumeur est mesurée sur chaque souris deux fois par semaine avec un pied à coulisse. Les expériences réalisées ont reçu l'aval du comité éthique Charles Darwin (saisine

**Tableau 5:** Mix d'anticorps utilisés pour la détermination des populations immunitaires impliquées dans la réponse à la stimulation par TLR7 (voir annexe X pour les références, clones et fournisseurs)

Population étudiée	Population myéloïde	Population lymphoïde
Anticorps utilisés	CD45 PE-Cy7 CD11b-eFluor450 CD11c-PE F4/80-Alexa Fluor 700 CMHII-FITC CD86-APC Gr1-PerCP Cy5.5	CD45 PE CD19-APC CD3-APC-eFluor780 CD4-PE Texas Red CD8-Alexa Fluor 700 CD69-PE Cy7

n°CE5/2010/057) et un protocole de traitement de la douleur a été défini ainsi qu'un point limite pour le sacrifice des animaux.

Pour les expériences où une étude du système immunitaire est nécessaire, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, 48h après la dernière injection de l'agoniste de TLR7. La tumeur ainsi que les ganglions drainant (ganglions inguinaux et axillaires) sont prélevés.

#### 6- Marquage par cytométrie en flux des populations immunitaires

Ces marquages sont réalisés sur les cellules immunitaires infiltrant la tumeur et les ganglions. La tumeur est dilacérée et incubée 30min avec de la DNase et de la libérase (voir annexe 3). Les cellules sont alors filtrées sur une membrane 0,25µm et centrifugées. Le culot est resuspendu dans 6mL de PBS 1X et déposé sur 3mL de FICOLL pour permettre la séparation des cellules tumorales et des cellules immunitaires. Après cette étape et un lavage en PBS, les sites non spécifiques de fixation des anticorps sont saturés grâce à une incubation avec du 2.4G2, cet anticorps se fixe au CD16 et au CD32 (récepteurs des fragments constants des anticorps). Après lavage, les mélanges d'anticorps sont ensuite ajoutés sur les cellules. Deux mélanges sont réalisés, un pour étudier les populations lymphocytaires et leur activation, l'autre pour les populations myéloïdes et leur activation. Tous les anticorps sont utilisés dilués au centième dans du PBS 1X.

**Tableau 6 :** Résumé de la cohorte de 352 patients atteints de CPNPC de stades I à III sans chimiothérapie néoadjuvante (cohorte complète, groupe avec forte expression de TLR7, et faible expression de TLR7 par les cellules tumorales).

	Cohorte complète (352)	Forte expression de TLR7 (106)	Faible expression de TLR7 (246)
<b>Sexe</b>			
Homme	268(76%)	77(73%)	191(78%)
Femme	84(24%)	29(27%)	55(22%)
<b>Type de cancer</b>			
Adénocarcinome	245(71%)	88(85%)	157(65%)
Carcinome épidermoïde	84(24%)	15(14%)	69(29%)
Carcinome à grandes cellules	9(3%)	1(1%)	8(3%)
Autres	7(2%)	0	7(3%)
<b>Stades du cancer</b>			
Stade I	153(43%)	42(40%)	111(45%)
Stade II	93(26%)	25(23%)	68(28%)
Stade III	106(31%)	39(37%)	67(27%)
<b>BPCO</b>			
BPCO-Non	189(57%)	58(60%)	131(56%)
BPCO-Oui	141(43%)	39(40%)	102(44%)
<b>Statut tabagique</b>			
Non	59(17%)	24(23%)	35(15%)
Oui	287(83%)	78(77%)	197(85%)
<b>Survie</b>			
Décédé	211(60%)	76(72%)	135(55%)
Vivant	141(40%)	30(28%)	111(45%)

## 7- Cohortes de patients atteints de CPNPC

Grâce à l'étroite collaboration entre notre équipe de recherche et les équipes de chirurgie thoracique et anatomopathologie de l'Hôtel Dieu, des cohortes de patients atteints de CPNPC ont été constituées. Des marquages de TLR7 en immunohistochimie ont été réalisés sur la cohorte présentée dans le tableau 6 : stades I à IIIa, pas de chimiothérapie néoadjuvante ; et sur la cohorte présentée dans le tableau 7 : stades IIIa avec chimiothérapie néoadjuvante. La chimiothérapie néoadjuvante est une chimiothérapie administrée avant résection chirurgicale de la tumeur.

**Tableau 7 :** Résumé de la cohorte de 109 patients atteints de CPNPC de stade III traités avec une chimiothérapie néoadjuvante (cohorte complète, groupe avec forte expression de TLR7, et faible expression de TLR7 par les cellules tumorales).

	Cohorte complète (352)	Forte expression de TLR7 (106)	Faible expression de TLR7 (246)
<b>Sexe</b>			
Homme	84(77%)	22(79%)	62(77%)
Femme	25(23%)	6(21%)	19(23%)
<b>Type de cancer</b>			
Adénocarcinome	51(53%)	9(43%)	42(57%)
Carcinome épidermoïde	33(35%)	11(52%)	22(30%)
Carcinome à grandes cellules	10(10%)	0	9(12%)
Autres	2(2%)	1(5%)	1(1%)
<b>Statut tabagique</b>			
Non	88(86%)	27(96%)	61(82%)
Oui	14(14%)	1(4%)	13(18%)
<b>Stades du cancer</b>			
Stade I	0	0	0
Stade II	0	0	0
Stade III	51(100%)	8(100%)	43(100%)
<b>Statut vital</b>			
Décédé	78(72%)	26(93%)	52(64%)
Vivant	31(28%)	2(7%)	29(36%)
<b>Type de chimiothérapie</b>			
Cisplatine+Navelbine	41(46%)	10(44%)	31(45%)
Cisplatine+Gemcitabine	34(37%)	9(41%)	25(36%)
Cisplatine+Taxol	7(8%)	1(5%)	6(9%)
Cisplatine+ VP16	3(3%)	1(5%)	2(3%)
Carboplatine+Gemcitabine	1(1%)	0	1(1%)
Carboplatine+Navelbine	1(1%)	1(5%)	0
Autres	14(4%)	0	4(6%)

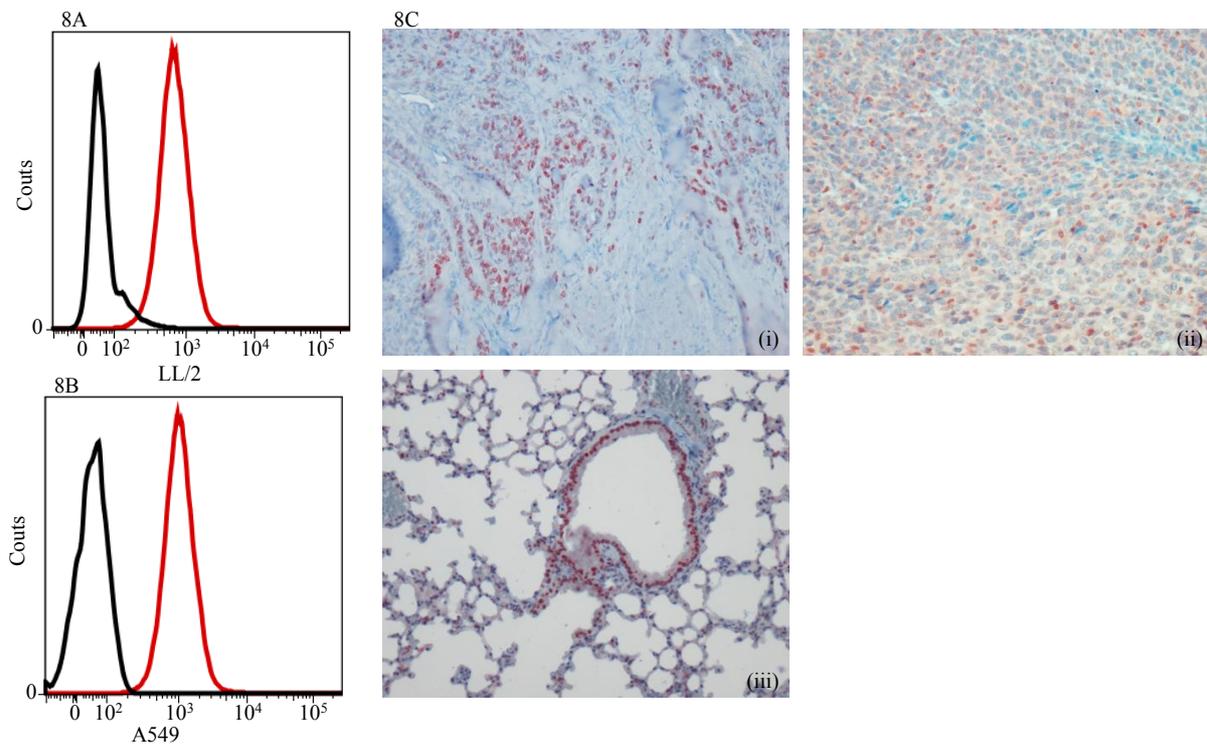
## 8- Tests statistiques utilisés

Dans les expériences de mesure de la taille de la tumeur chez les souris, les courbes représentent la moyenne de la taille de la tumeur dans chaque groupe (n=5 souris par groupe au début de l'expérience) avec l'écart type pour chaque groupe. Des tests statistiques Mann Whitney sont réalisés à tous les temps. Un p inférieur à 0,05 est considéré comme significatif. Les courbes et les tests ont été réalisés avec le logiciel Prism5 (Graphpad).

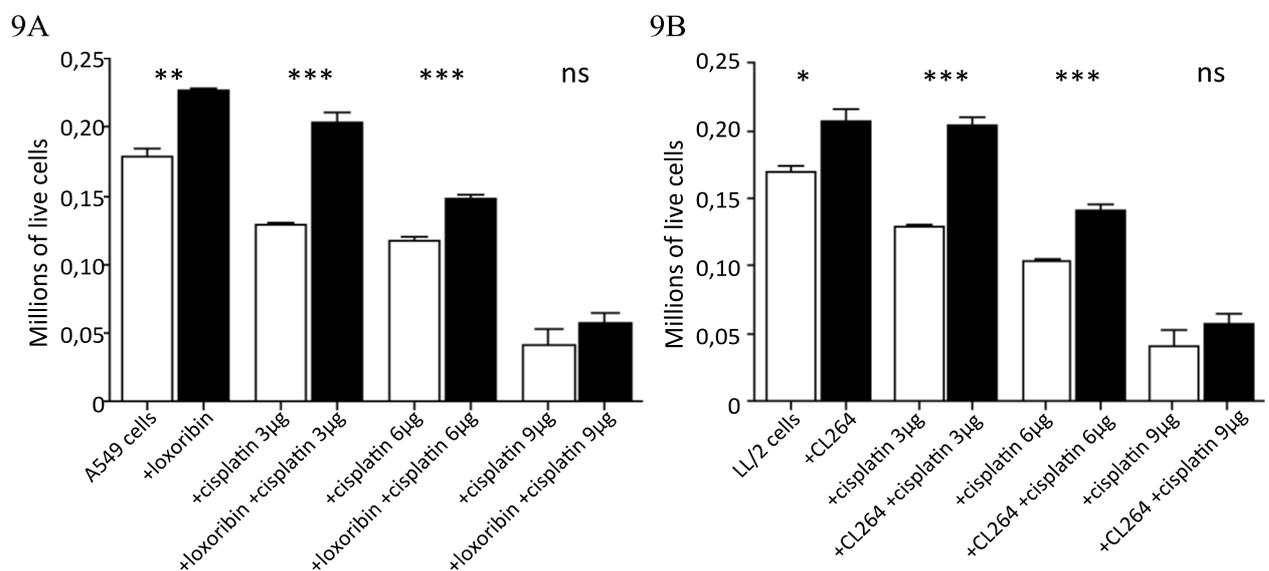
L'étude de la survie des patients en fonction de l'expression de TLR7 sur les cellules tumorales se fait par des courbes de Kaplan Meier une fois le cut-off optimal déterminé. Le cut-off optimal est la valeur seuil de l'expression de TLR7 par les cellules tumorales pour laquelle la valeur de p pour les tests logrank est la plus faible. C'est donc la valeur qui permet classer les patients en deux groupes, faible à moyenne et forte expression de TLR7 par les cellules tumorales.

Le cut-off optimal pour les deux cohortes a été déterminé à 82% de cellules tumorales positives pour TLR7. Une correction a été appliquée à ce test afin de ne pas surestimer la significativité des tests. Ces corrections sont décrites dans l'article de Altman (Altman, 2001).

Les courbes et les tests ont été réalisés sur les logiciel Prism5 (Graphpad) et Statview (Abacus Systems).



**Figure 8** : Expression de TLR7 par les lignées de cellules tumorales. Marquage par cytométrie en flux des lignées de cellules tumorales LL/2 (**8A**) et A549 (**8B**). Les cellules sont fixées et perméabilisées avant d'être saturées par du 2.4G2 et incubées avec l'anticorps anti TLR7. **8C**, marquages pour TLR7 en immunohistochimie au grossissement x200. **(i)** : tumeur A549 greffée à des souris NOD/SCID ; **(ii)** : tumeur LL/2 greffée à des souris NOD/SCID ; **(iii)** : poumon normal de souris C57Bl/6.



**Figure 9** : Résistance des cellules tumorales in vitro au cisplatine avec ou sans l'agoniste de TLR7. Les cellules sont cultivées 48h en présence ou non de l'agoniste de TLR7, loxoribine à 1μg/mL pour les A549 et CL264 à 1μg/mL pour les LL/2, puis 24h avec le cisplatine à 3, 6 ou 9μg/mL. **9A**, comptage au bleu trypan des cellules A549 après les 72h de culture ; **9B**, comptage des cellules LL/2 après les 72h de culture. Les tests statistiques utilisés sont des Mann Whitney (ns : pas de différence statistiquement significative ; \* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01 ; \*\*\* : p<0,001). Expériences réalisées trois fois.

## Résultats

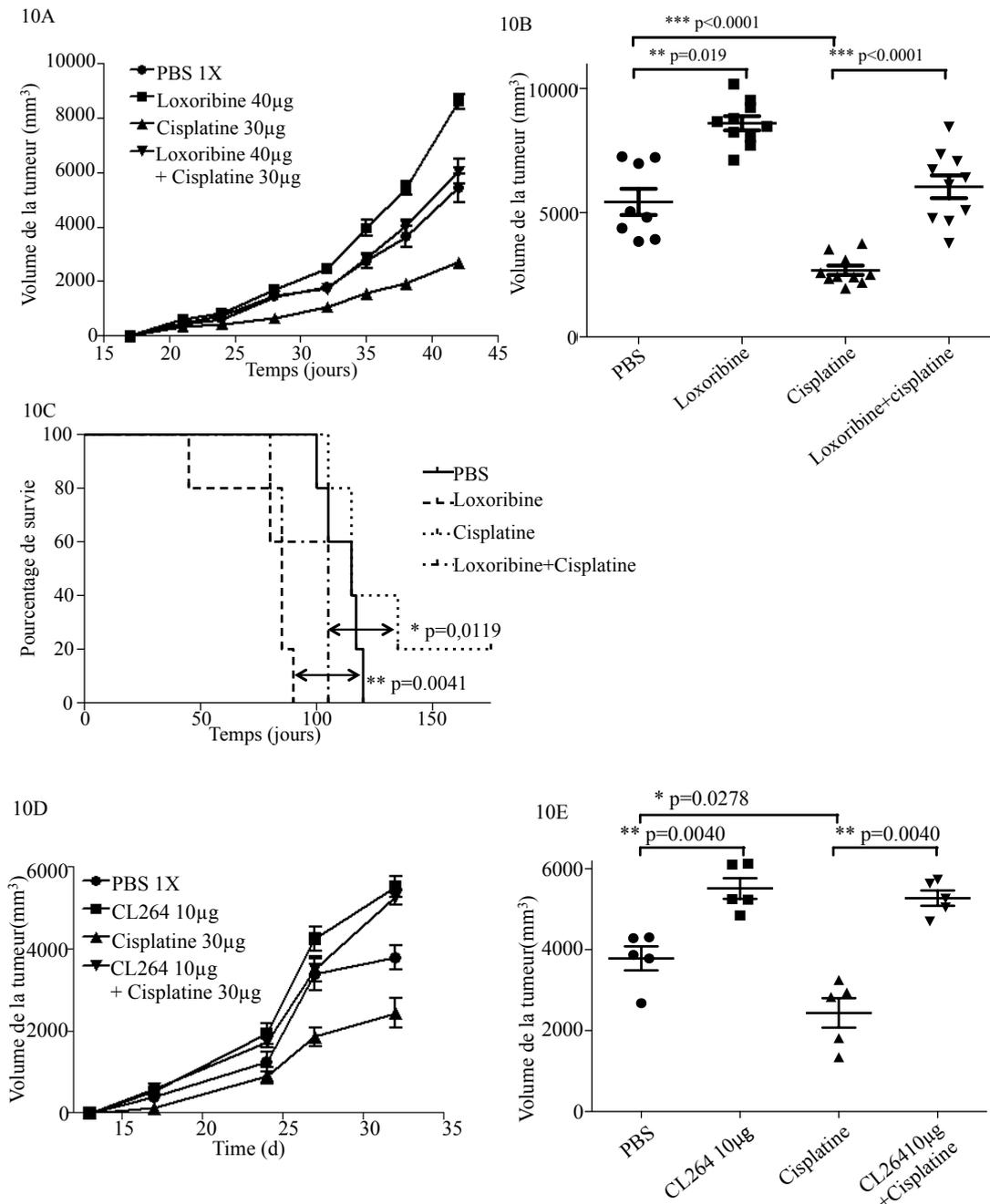
### 1- Expression de TLR7 par les cellules tumorales

La première étape de ce travail a été de vérifier que les cellules tumorales murines de la lignée LL/2 expriment bien le TLR7, comme cela avait été montré pour les cellules de la lignée humaine A549. Nous avons étudié l'expression de TLR7 par cytométrie en flux et par immunohistochimie sur des tumeurs développées dans des souris NOD/SCID. Les résultats sont présentés sur la figure 8. En cytométrie en flux, un décalage entre le pic de l'isotype contrôle et celui de l'anticorps anti TLR7 est observé correspondant à l'expression de TLR7 par les cellules tumorales. En immunohistochimie, un marquage perinucléaire rouge est observé sur les cellules tumorales. Dans le poumon normal, humain ou murin, les cellules non tumorales exprimant TLR7 sont les cellules de l'épithélium bronchique.

### 2- Progression tumorale et résistance à la chimiothérapie induite par la stimulation de TLR7 in vitro

La résistance à la chimiothérapie in vitro a été montrée par simple comptage des cellules avec du bleu trypan. Dans les deux cas, le nombre de cellules vivantes par puits est plus important lorsque les cellules ont été prétraitées avec un agoniste de TLR7 que lorsque seul du PBS 1X a été ajouté au milieu de culture. Le nombre de cellules vivantes passe alors de 0,18 à 0,23 millions de cellules pour les A549 et de 0,16 à 0,21 millions de cellules pour les LL/2, cette augmentation du nombre de cellules tumorales vivantes est significative. Lorsque les cellules sont traitées avec 3 $\mu$ g de cisplatine, le nombre de cellules vivantes passe de 0,18 à 0,13 millions pour les A549 alors que lorsque les cellules sont prétraitées avec la loxoribine il passe à 0,20 millions. Pour les cellules LL/2, le nombre de cellules vivantes passe de 0,16 à 0,14 millions de cellules vivantes avec la chimiothérapie et à 0,20 millions de cellules tumorales lorsque les cellules ont été prétraitées avec le CL264, les résultats sont significatifs pour cette dose. Des résultats similaires sont observés pour la dose de 6 $\mu$ g de cisplatine. Dans ce cas-là, le nombre de cellules vivantes passe de 0,11 à 0,145 millions pour les LL/2 et de 0,13 à 0,15 millions pour les A549 (Figure 9).

Pour la dose la plus élevée de cisplatine, 9 $\mu$ g, le nombre de cellules vivantes dans les puits prétraités par l'agoniste de TLR7 ou non prétraité n'est pas statistiquement significatif. Nous avons donc observé une résistance à la chimiothérapie qui est fonction de la dose de chimiothérapie utilisée.

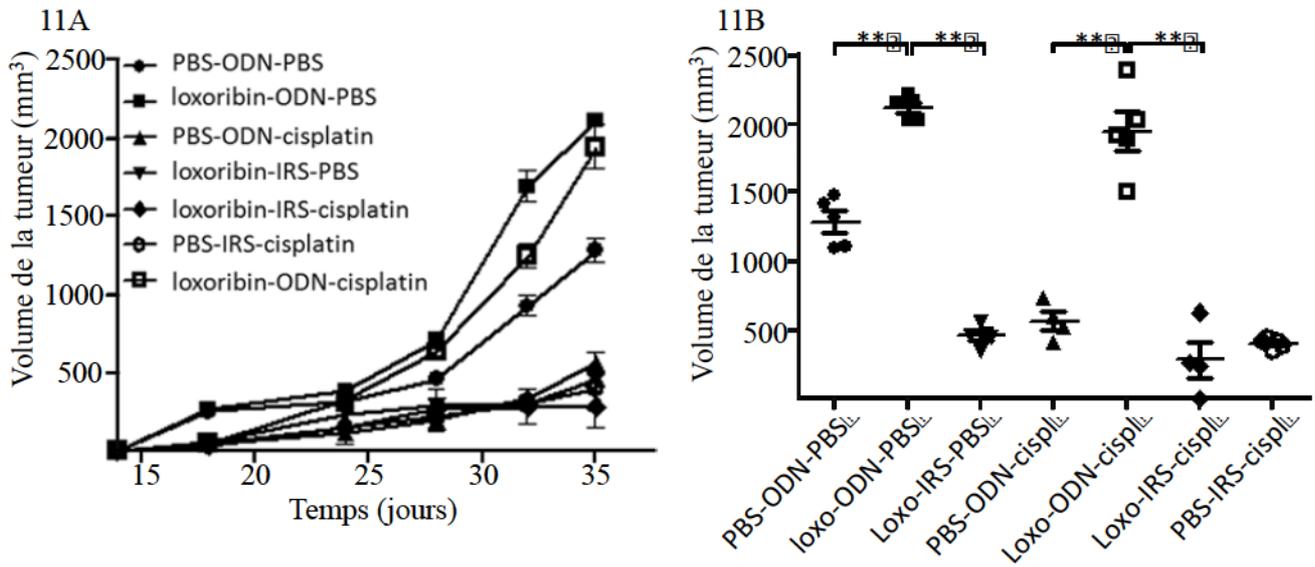


**Figure 10** : Résistance à la chimiothérapie in vivo.  $1 \times 10^6$  cellules A549 ou LL/2 sont injectées aux souris immunodéficientes NOD/SCID par voie sous cutanée. **10A** et **B** La loxoribine est injectée par voie sous cutanée, à raison de  $10 \mu\text{g}$  dans  $100 \mu\text{L}$  de PBS 1X par injection, aux jours 0, 3 et 6. La chimiothérapie est injectée par voie sous cutanée aux jours 9, 12 et 15, à raison de  $30 \mu\text{g}$  dans  $100 \mu\text{L}$  de PBS 1X par injection sous cutanée. **10A** : Croissance tumorale au cours du temps après injection de cellules tumorales A549. **10B** : Représentation de la taille des tumeurs des souris en  $\text{mm}^3$  au dernier jour de l'expérience. **10C** : Survie des souris au cours du temps. La loxoribine est injectée par voie sous cutanée aussi, à raison de  $10 \mu\text{g}$  dans  $100 \mu\text{L}$  de PBS 1X par injection, aux jours 0, 3, 6 et 9. La chimiothérapie est injectée par voie sous cutanée aux jours 12, 15, 18 et 21 à raison de  $30 \mu\text{g}$  dans  $100 \mu\text{L}$  de PBS 1X. **10D** : Croissance tumorale au cours du temps après injection de cellules tumorales LL/2. **10E** : Représentation de la taille des tumeurs des souris en  $\text{mm}^3$  au dernier jour de l'expérience. La taille de la tumeur est mesurée deux fois par semaine au pied à coulisse. La hauteur, la longueur et la largeur sont mesurées. Les tests statistiques utilisés sont des Mann Whitney (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ) pour les expériences de croissance des tumeurs et des logrank pour les expériences de survie. Les expériences de suivi de la croissance tumorale ont été réalisées trois fois, avec les A549 et trois fois avec les LL/2. L'expérience de survie des souris avec les cellules A549 a été réalisée deux fois.

### 3- La stimulation de TLR7 in vivo induit une résistance à la chimiothérapie

Les cellules tumorales ont été greffées à des souris NOD/SCID immunodéficientes afin d'étudier l'impact de la stimulation de TLR7 in vivo sur les cellules tumorales (Figure 10). Pour cela,  $10^6$  cellules tumorales A549 ou LL/2 ont été injectées sous la peau de souris NOD/SCID. Au jour de l'injection des cellules, les agonistes de TLR7, loxoribine ou CL264 ont aussi été injectés ainsi qu'aux jours 3 et 6, à raison de  $10\mu\text{g}$  par souris. Les groupes contrôles reçoivent du PBS au lieu de l'agoniste. La chimiothérapie est injectée aux jours 9, 12 et 15 à raison de  $30\mu\text{g}$  de cisplatine. La figure 10A montre la croissance des tumeurs au cours du temps. Lorsque les souris sont traitées avec l'agoniste de TLR7, la tumeur croît plus rapidement et atteint une taille plus importante que lorsque les souris sont traitées avec du PBS. Lorsqu'elles sont traitées par la chimiothérapie, la taille des tumeurs est plus petite qu'avec le traitement par du PBS, et lorsque les deux traitements sont administrés, la croissance de la tumeur est comparable au groupe de souris contrôle traitées par du PBS. Au jour 45, jour de la fin de l'expérience, la taille des tumeurs chez les souris traitées avec du PBS atteint  $5000\text{mm}^3$  en moyenne (Figure 10B). Lorsque les souris ont été traitées avec l'agoniste de TLR7, la taille des tumeurs atteint  $8000\text{mm}^3$ , et lorsqu'elles sont traitées avec la chimiothérapie, le volume tumoral est réduit à  $2500\text{mm}^3$ . Cette réduction n'est pas observée si les souris ont reçu le traitement combiné d'agoniste de TLR7 et de chimiothérapie (la taille des tumeurs est en moyenne de  $6000\text{mm}^3$ ). On observe une augmentation de la prolifération tumorale ainsi qu'une résistance à la chimiothérapie suite à l'injection de l'agoniste de TLR7.

Ces traitements affectent aussi la survie des souris, comme présenté dans la figure 10C. Les souris traitées avec l'agoniste de TLR7 ont une survie significativement diminuée par rapport aux souris non traitées ou aux souris traitées avec la chimiothérapie. Et lorsque les souris reçoivent l'agoniste de TLR7 et la chimiothérapie, leur temps de survie est diminué par rapport aux souris ayant reçu la chimiothérapie seule ou du PBS. Dans le cas des cellules LL/2 injectées sur des souris NOD/SCID et traitées avec du CL264, de la chimiothérapie et du PBS, les mêmes résultats sont obtenus. La croissance des tumeurs est plus rapide et conduit à une tumeur plus importante lorsque les animaux sont traités avec l'agoniste de TLR7 par rapport aux animaux non traités. Lorsque la chimiothérapie est injectée, la croissance tumorale est diminuée et lorsque les deux traitements, agoniste de TLR7 et chimiothérapie sont injectés, la croissance est plus forte qu'avec la chimiothérapie seule. Ces résultats sont présentés dans la figure 10D. Au dernier jour de l'expérience, figure 10E, la taille moyenne des tumeurs des souris est de  $5000\text{mm}^3$  dans le groupe de souris traitées avec du PBS,  $5500\text{mm}^3$  pour les souris recevant l'agoniste de TLR7,  $2500\text{mm}^3$  pour celles recevant la chimiothérapie et  $5000\text{mm}^3$  pour les souris recevant l'agoniste de TLR7 et la chimiothérapie.



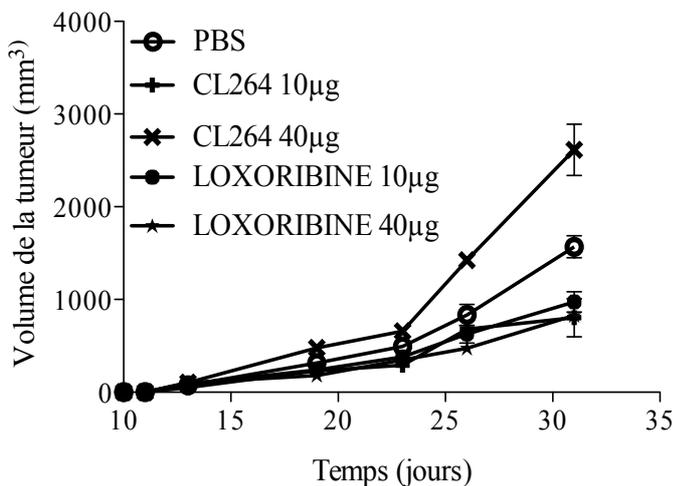
**Figure 11** : Inhibition de la stimulation de TLR7.  $1 \times 10^6$  cellules A549 sont injectées aux souris par voie sous cutanée. La loxoribine est injectée par voie sous cutanée à raison de  $10 \mu\text{g}$  dans  $100 \mu\text{L}$  de PBS 1X par souris, aux jours 0, 3 et 6. L'inhibiteur de TLR7, l'IRS661 (noté IRS) est injecté par voie sous cutanée également, aux mêmes jours que la loxoribine. La chimiothérapie est ensuite injectée à raison de  $30 \mu\text{g}$  dans  $100 \mu\text{L}$  de PBS1X, par voie sous cutanée aux jours 9, 12 et 15. La taille de la tumeur est mesurée deux fois par semaine au pied à coulisse. La hauteur, la longueur et la largeur sont mesurées. **12A**, Evolution de la taille des tumeurs en fonction du temps. **12B**, Taille de la tumeur en fonction du groupe au jour de la fin de l'expérience. Les tests statistiques utilisés sont des Mann Whitney (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ). L'expérience a été réalisée une fois.

Nous observons dans les deux cas, avec les cellules LL/2 traitées par le CL264 et avec les A549 traitées par la loxoribine, que la taille de la tumeur chez les souris traitées avec les agonistes de TLR7 est plus élevée que celle des souris traitées avec le PBS seul. De plus, lorsque la chimiothérapie est ajoutée, la taille de la tumeur diminue, sauf si les souris ont préalablement reçu le traitement avec l'agoniste de TLR7.

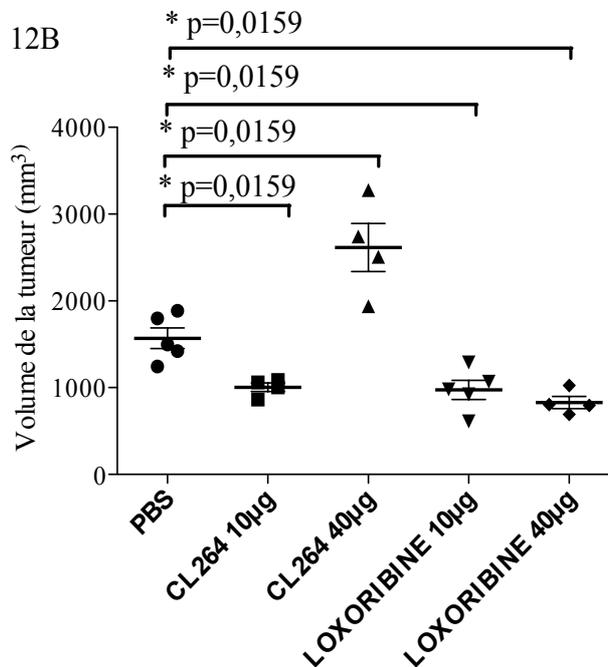
Pour vérifier que la stimulation de TLR7 est bien l'élément conduisant à une résistance à la chimiothérapie, nous avons utilisé un inhibiteur de celui-ci, sous la forme de séquence d'ADN immunorégulatrice dont le mode d'action n'est pas connu mais dont l'effet inhibiteur de TLR7 a déjà été observé dans d'autres modèles comme des modèles de lupus ou d'inhibition de l'inflammation après implantation de biomatériaux (Barrat et al., 2005; Guiducci et al., 2010a, 2010b; Ushida et al., 2012).

La figure 11A montre les effets de l'inhibiteur de TLR7 sur la croissance tumorale et l'induction de la résistance à la chimiothérapie. Lorsque la séquence ODN, contrôle de l'IRS661 est ajoutée aux différents traitements, PBS, agoniste de TLR7 et/ou chimiothérapie, cela n'entraîne pas de différence avec ce qui a été observé précédemment, dans la figure 10A. Au contraire, l'injection de la séquence IRS661 et de la loxoribine entraîne une diminution de la croissance tumorale. Une diminution de la taille moyenne des tumeurs est observée au jour 35, la taille des tumeurs passe de 2200mm<sup>3</sup> à 500mm<sup>3</sup> (Figure 11B).

12A



12B



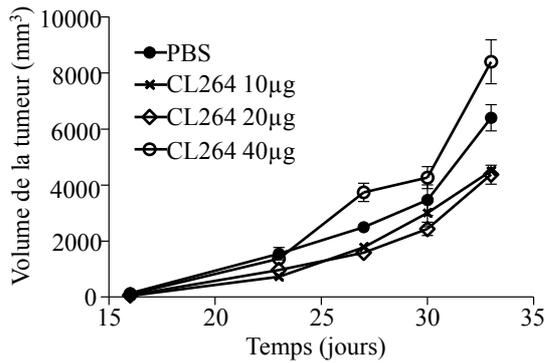
**Figure 12** : Effets de différents agonistes de TLR7 sur la croissance tumorale dans des souris C57Bl/6, immunocompétentes.  $1 \times 10^6$  cellules LL/2 sont injectées aux souris par voie sous cutanée à J0. Les agonistes de TLR7, le CL264 et la loxoribine sont injectées aux jours 0, 3 et 6 dans 100µL de PBS1X. **12A** : Taille de la tumeur en fonction du temps. **12B** : Taille de la tumeur au dernier jour de l'expérience. La taille de la tumeur est mesurée deux fois par semaine au pied à coulisse. La hauteur, la longueur et la largeur sont mesurées. Les tests statistiques utilisés sont des Mann Whitney (ns : pas de différence statistiquement significative ; \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ). L'expérience a été réalisée trois fois.

4- La stimulation de TLR7 sur des souris immunocompétentes conduit à un effet pro- ou anti-tumoral.

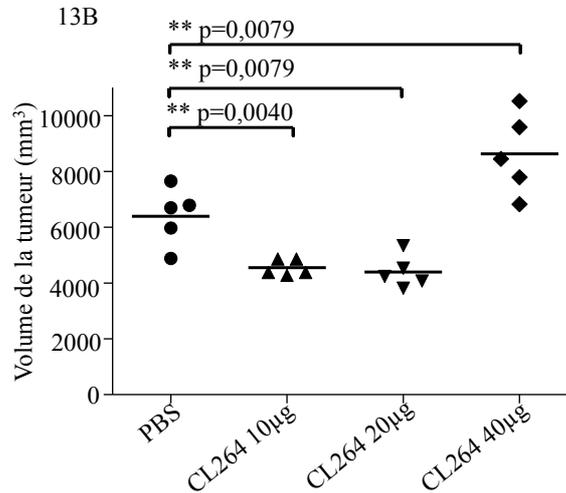
Des expériences ont été réalisées avec les deux agonistes de TLR7, la loxoribine et le CL264 sur les souris C57Bl/6. Le protocole expérimental est le même que dans l'expérience précédente mais sans injection de chimiothérapie. Les animaux sont traités à chaque injection avec 10 ou 40µg de CL264 ou de loxoribine.

De façon très intéressante, dans cette expérience, la stimulation de TLR7 conduit à deux réponses possibles. Dans le premier cas, lorsque les animaux sont traités avec la loxoribine à n'importe laquelle des deux doses, la taille de la tumeur à la fin de l'expérience est inférieure par rapport aux animaux contrôles, traités avec du PBS. Ces résultats diffèrent de ce qui a été obtenu avec les souris NOD/SCID et les tumeurs A549 où la loxoribine a un effet protumoral. Lorsque les souris sont traitées avec 10µg de CL264, la taille de la tumeur est aussi diminuée par rapport à la taille de la tumeur chez les souris traitées avec du PBS. Au contraire de cela, les tumeurs des souris traitées avec 40µg de CL264 ont une taille plus importante que celle des souris traitées avec du PBS (Figure 12).

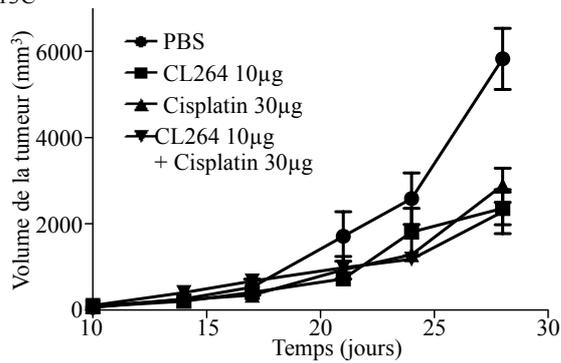
13A



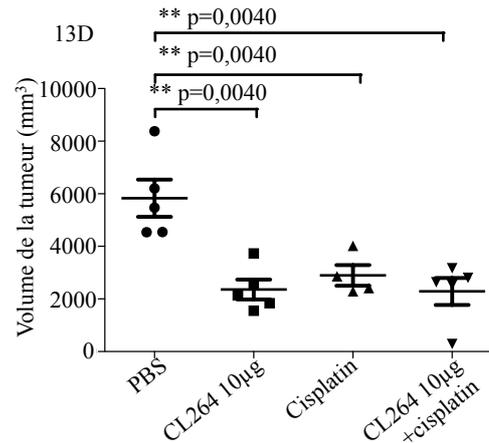
13B



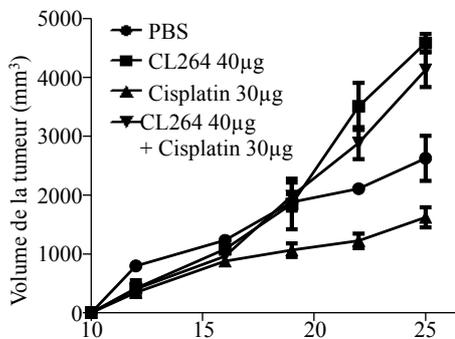
13C



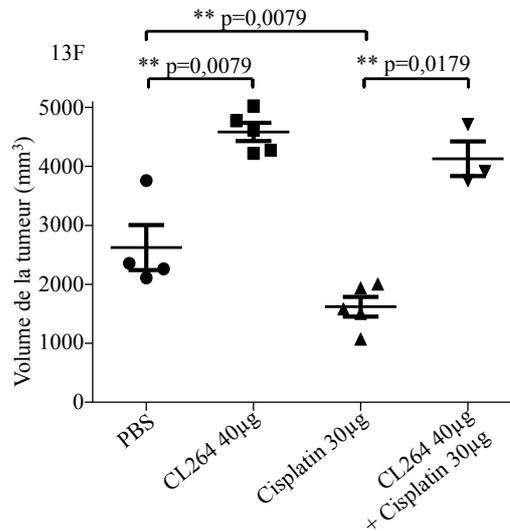
13D



13E



13F



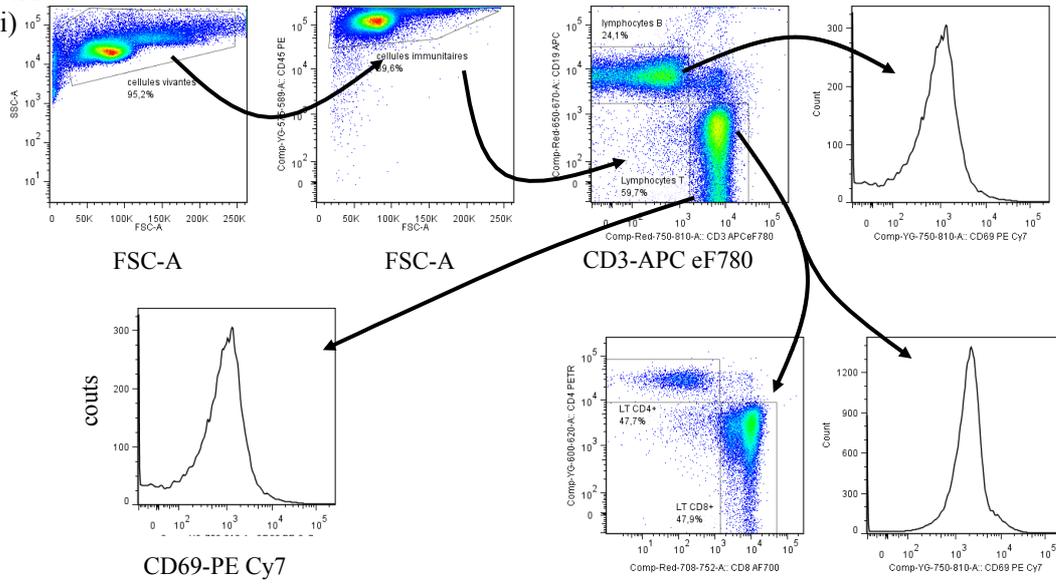
**Figure 13** : Effets de la stimulation de TLR7 dans un modèle de souris immunocompétentes. **13A** et **13B** : Les cellules tumorales sont greffées au jour 0 et les souris sont traitées par injection sous cutanée de 10µg, 20µg ou 40µg de CL264 aux jours 0, 3 et 6. **13C** et **13D** : Les cellules tumorales sont greffées au jour 0 et les souris sont traitées par injection sous cutanée de 10µg de CL264 aux jours 0, 3 et 6. La chimiothérapie est ensuite injectée par voie sous cutanée à raison de 30µg par souris aux jours 9, 12, et 15. **13E** et **13F** : Les cellules tumorales sont greffées au jour 0 et les souris sont traitées par injections sous cutanée de 40µg de CL264 aux jours 0, 3 et 6. La chimiothérapie est ensuite injectée par voie sous cutanée à raison de 30µg par souris aux jours 9, 12, et 15. **13A**, **13C** et **13E** : Représentation de l'expérience en taille de la tumeur en fonction du temps. **13B**, **13D** et **13F** Représentation en taille de la tumeur au dernier jour de l'expérience. La taille de la tumeur est mesurée deux fois par semaine au pied à coulisse. La hauteur, la longueur et la largeur sont mesurées. Les tests statistiques utilisés sont des Mann Whitney (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ). Les expériences ont été réalisées deux fois.

Nous avons par la suite étudié les effets de différentes doses de CL264 sur la réponse à la chimiothérapie. Les cellules tumorales sont greffées à J0 à raison de  $1 \times 10^6$  cellules dans 100 $\mu$ L de PBS 1X par injection sous cutanée. Les agonistes de TLR7 et la chimiothérapie sont injectés selon le même protocole que dans les expériences sur les souris NOD/SCID immunodéficientes. Les souris ont été traitées avec différentes doses de CL264 (Figure 13).

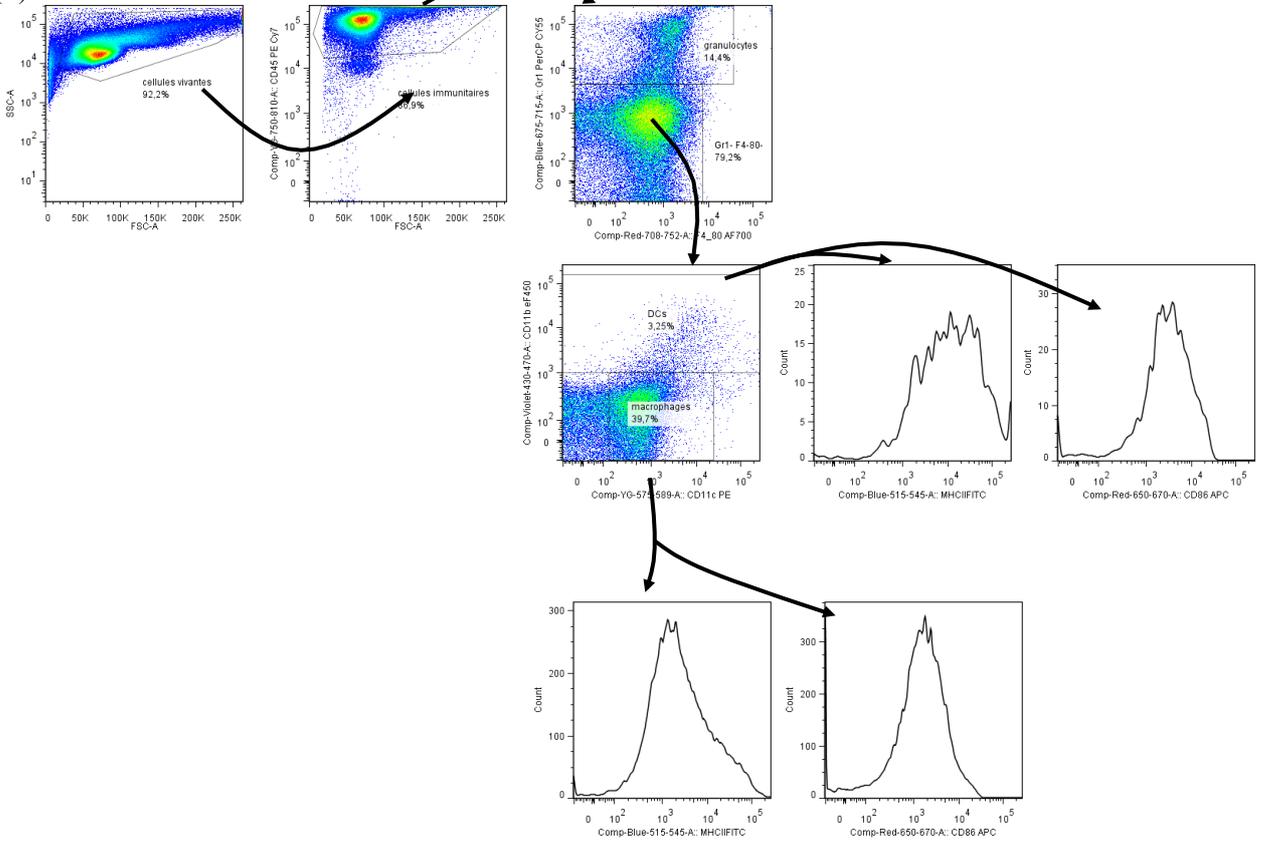
Dans cette expérience, nous observons une résistance à la chimiothérapie lorsque les souris sont traitées avec la forte dose de CL264. Au contraire, la faible dose d'agoniste a un effet antitumoral, probablement par activation du système immunitaire. Nous avons étudié cette activation du système immunitaire dans l'expérience suivante.

14A

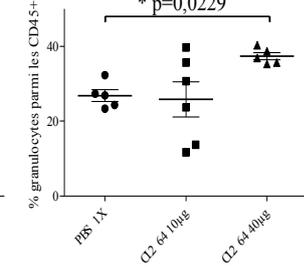
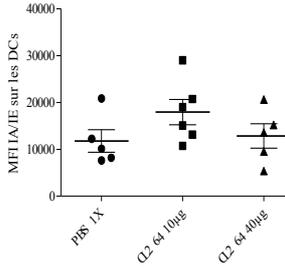
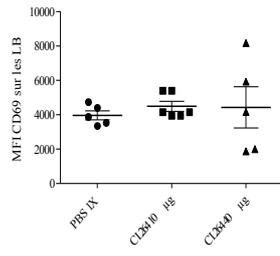
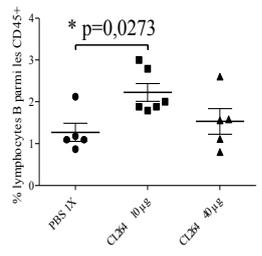
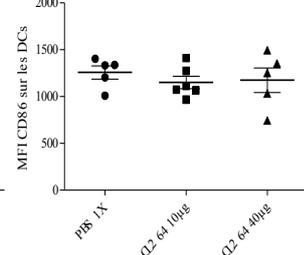
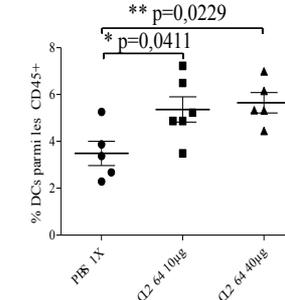
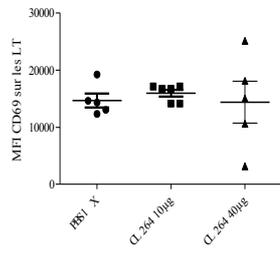
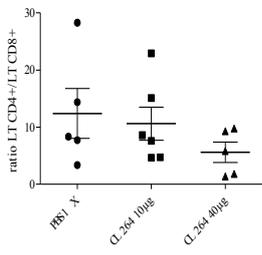
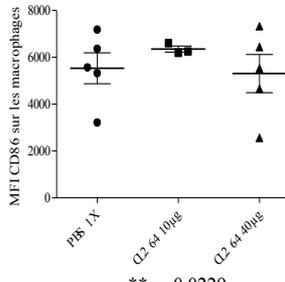
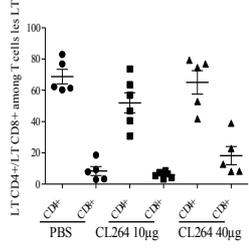
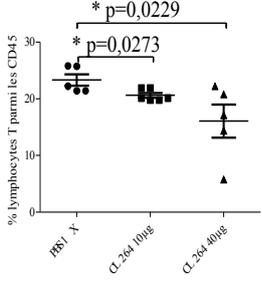
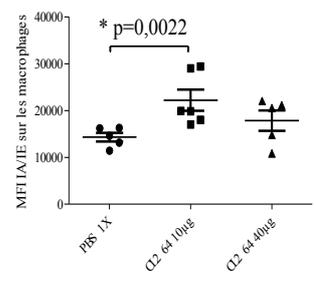
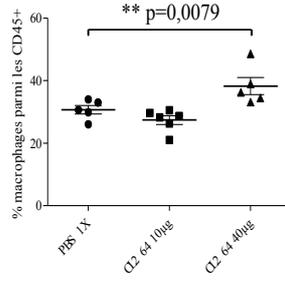
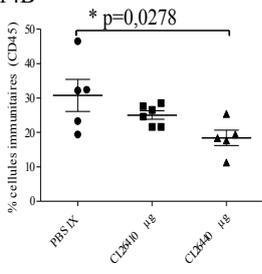
(i)

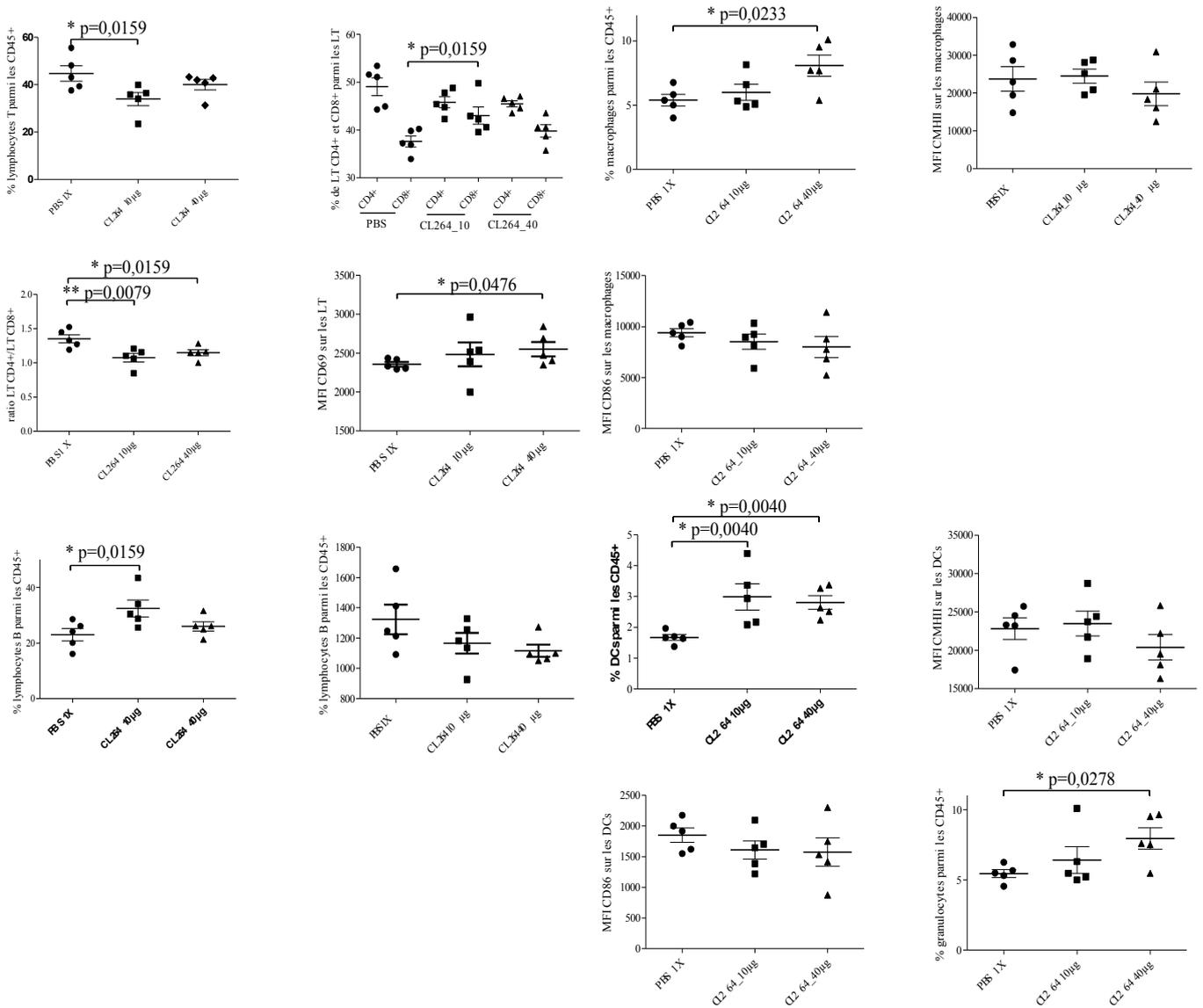


(ii)



14B

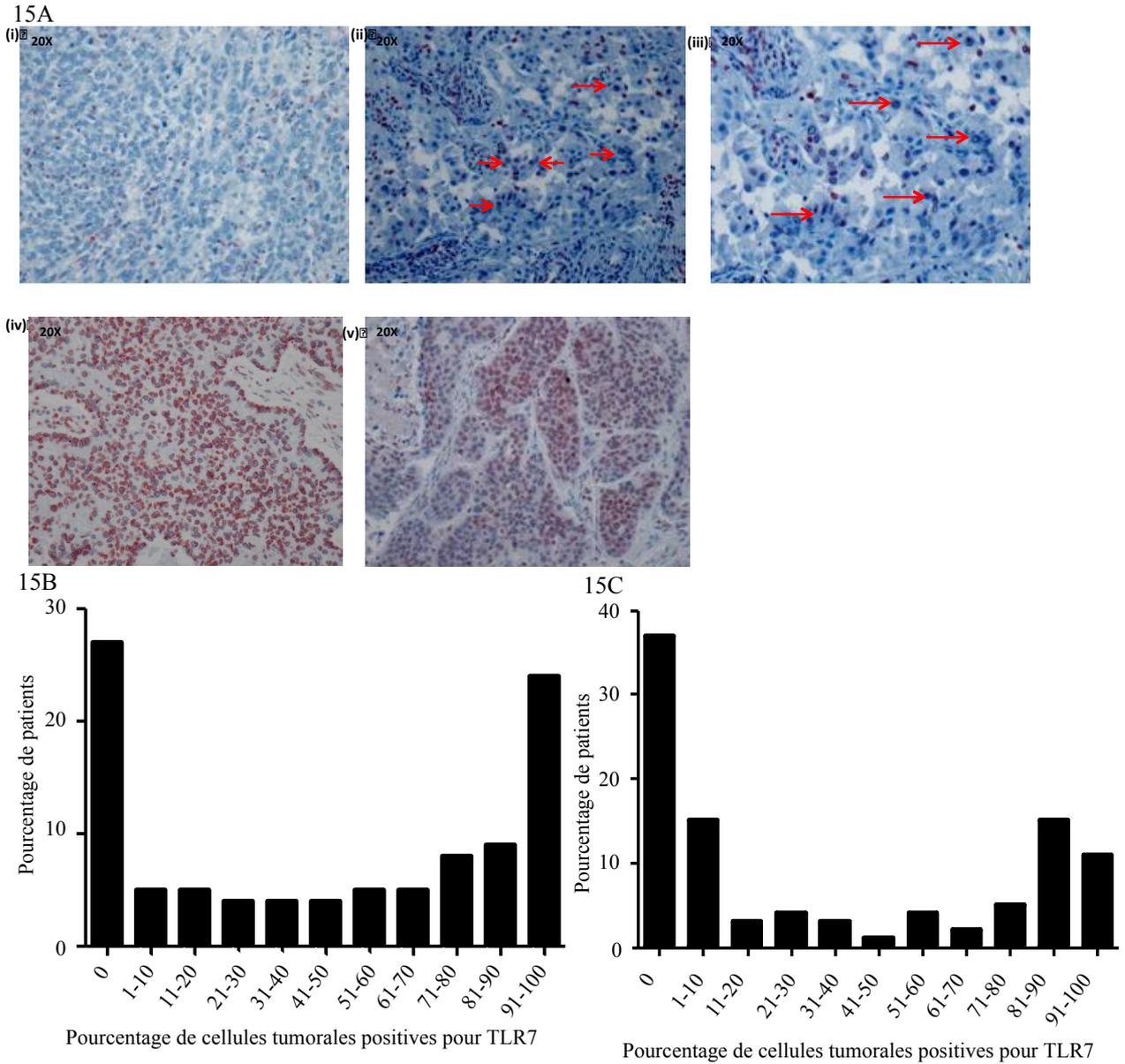




**Figure 14 :** Variations des populations immunitaires après injection des agonistes de TLR7. Les souris utilisées sont des souris C57Bl/6 âgée de 7 semaines au début de l'expérience. Les cellules tumorales sont greffées au jour 0 et les souris sont traitées par injection sous cutanée de 10µg ou 40µg de CL264 aux jours 0, 3 et 6. Elles sont sacrifiées au jour 7 et les tumeurs ainsi que les ganglions drainants sont prélevés. Les cellules sont marquées avec les anticorps définis dans le matériel et méthodes. **14A :** Stratégie de sélection des populations immunitaires utilisées pour la tumeur et les ganglions drainants. **14B :** Proportions des différentes populations immunitaires étudiées dans la tumeur. **14C :** Proportions des différentes populations immunitaires étudiées dans les ganglions drainants. L'expérience a été réalisée deux fois.

## 5- Implication du système immunitaire après stimulation de TLR7

Pour mesurer l'activation du système immunitaire, les souris sont sacrifiées 24h après la dernière injection d'agoniste de TLR7. La tumeur, ainsi que les ganglions drainants (ganglions axillaires) sont prélevés, dilacérés et un marquage par cytométrie en flux est réalisé. Dans la tumeur, une diminution de la proportion de cellules immunitaires (cellules CD45<sup>+</sup>) est observée chez les souris traitées avec les agonistes de TLR7. Cette diminution est significative avec la forte dose de l'agoniste de TLR7. Les cellules CD45<sup>+</sup> passent de 30 à 20% de cellules CD45<sup>+</sup> parmi toutes les cellules présentes dans la tumeur. Cependant, avec une expression de ce nombre en pourcentage, cela peut venir de l'augmentation du nombre des cellules tumorales dans ce cas plutôt que d'une diminution du nombre de cellules immunitaires en nombre absolu. A la forte dose d'agoniste, on observe dans la tumeur, une augmentation du pourcentage des granulocytes (de 25% à 40%), de macrophages (de 30 à 40%) et de cellules dendritiques (de 3,5% à 5%) parmi les cellules CD45<sup>+</sup> totales. Concernant les cellules de l'immunité adaptative, on observe une diminution du pourcentage de lymphocytes T (de 23% à 15%) et une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes B, à faible dose d'agoniste (de 1,2 à 2,1%). Les proportions des sous populations de lymphocytes T, T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, ne sont pas modifiées et l'activation des lymphocytes, observée par l'intensité de fluorescence moyenne du CD69 n'est pas modifiée non plus (Figure 14B). Dans les ganglions drainants la tumeur, on observe également une augmentation de la proportion des granulocytes et des DCs dans le groupe de souris traitées avec la forte dose de l'agoniste de TLR7 est retrouvée (Figure 14). Mais les proportions de macrophages dans les groupes de souris traitées ne sont pas modifiées par rapport au groupe de souris contrôle. Leur activation non plus n'est pas modifiée, contrairement à ce qui est observé dans la tumeur. Pour les populations de l'immunité adaptative, des modifications plus importantes sont observées. Ainsi, on retrouve l'augmentation de la proportion des lymphocytes B dans le groupe des souris ayant reçu la faible dose de l'agoniste de TLR7, passant de 22% chez les contrôles à 32% (et 25% dans le groupe de la forte dose). Les proportions des lymphocytes T et de leur sous populations sont elles aussi modifiées. Chez les souris contrôles, on observe 40% de lymphocytes T, avec une MFI de 2400 pour l'anticorps anti CD69 répartis en 50% de T CD4<sup>+</sup> 37% de T CD8<sup>+</sup> (les 13% restant sont négatifs pour le CD4 et le CD8). Chez les souris traitées avec la faible dose on passe à 30% de lymphocytes T, avec une MFI de 2500 pour l'anticorps anti CD69 répartis en 47% de T CD4<sup>+</sup> 43% de T CD8<sup>+</sup> (les 10% restant sont négatifs pour le CD4 et le CD8). Chez les souris traitées avec la forte dose on passe à 33% de lymphocytes T, avec une MFI de 2500 pour l'anticorps anti CD69 répartis en 47% de T CD4<sup>+</sup> 40% de T CD8<sup>+</sup> (les 13% restant sont négatifs pour le CD4 et le CD8) (figure 14C).



**Figure 15 :** Pourcentage de patients exprimant TLR7 sur les cellules tumorales. **15A**, marquage en immunohistochimie pour TLR7 sur lames de patients (i), 0% des cellules tumorales expriment TLR7, (ii) 10% des cellules tumorales expriment TLR7, (iii) 50% des cellules tumorales expriment TLR7, (iv) 100% des cellules tumorales expriment TLR7, (v) 70% des cellules tumorales expriment TLR7 **15B**, expression de TLR7 par les cellules tumorales des patients de la cohorte de patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie néoadjuvante. **15C**, expression de TLR7 par les cellules tumorales des patients de la cohorte de patients après une chimiothérapie néoadjuvante.

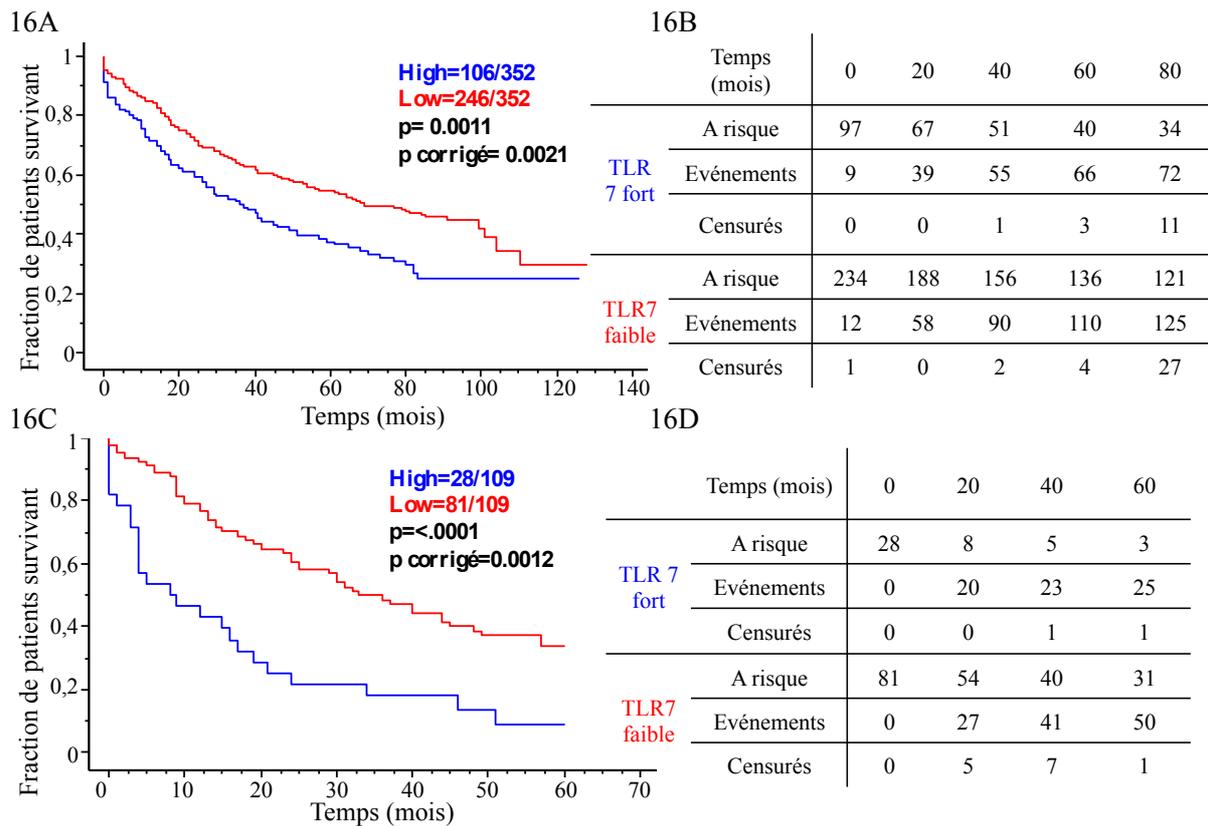
## 6- Valeur pronostique de l'expression de TLR7 sur des cohortes de patients

Ces travaux ont été réalisés par Saradiya Chatterjee, dans le cadre de sa thèse. J'ai participé à cette étude car les deux sujets, l'étude du rôle de TLR7 dans le développement du CPNPC chez la souris et les effets de la présence de TLR7 chez l'homme sont étroitement liées et permettent tous les deux de mieux comprendre le rôle de TLR7 dans le développement des tumeurs.

L'utilisation de ces cohortes a été possible grâce à la présence du Pr Diane Damotte dans notre équipe de recherche en plus de son activité d'anatomopathologiste à l'Hotel Dieu. Le recrutement des patients inclus dans ces cohortes est réalisé grâce à une étroite collaboration avec les équipes de chirurgie thoracique et d'anatomopathologie de cet hôpital. Les patients atteints de CPNPC et opérés de leur tumeur (stades I à IIIa), ont été recrutés entre 2000 et 2005. Il s'agit majoritairement de patients atteints d'adénocarcinome. Les données démographiques et cliniques des patients sont présentées dans les tableaux 7 et 8. Le tableau 7 correspond à la cohorte de patients atteints de CPNPC n'ayant pas reçu de chimiothérapie néoadjuvante. Le tableau 8 correspond à la cohorte de patients ayant reçu de chimiothérapie néoadjuvante. Le choix du traitement par la chimiothérapie néoadjuvante, c'est à dire avant la résection chirurgicale, se fait sur la base de l'envahissement ganglionnaire. Cependant, la prescription de cette chimiothérapie est la responsabilité du médecin prenant en charge le patient et une certaine hétérogénéité est observée que ce soit dans le choix de la chimiothérapie ou pour le stade auquel elle est prescrite.

Nous avons eu accès à des lames de tissu tumoral inclus en paraffine. Le choix des blocs a été fait par des anatomopathologistes, sur la base de l'infiltrat immunitaire et la présence de cellules tumorales, observés sur des colorations HES. Les blocs sélectionnés sont les plus infiltrés en cellules immunitaires et contiennent au moins 30% de cellules tumorales. La première cohorte, décrite dans le matériel et méthode (tableau 7) est composée de 352 patients. La seconde est composée de 109 patients ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante. Les données sur les patients ont été collectées par les cliniciens et ont permis d'étudier la survie des patients en fonction du pourcentage de cellules tumorales exprimant TLR7.

Des marquages de TLR7 ont été réalisés sur les deux cohortes de patients. La figure 16 nous permet de confirmer les résultats obtenus par Julien Cherfils ainsi que certaines observations faites sur les lignées de cellules tumorales. Les marquages pour TLR7 réalisés par immunohistochimie (16A) nous confirment que comme les lignées cellulaires que nous avons étudié, les patients peuvent exprimer le TLR7 sur leurs cellules tumorales. Cette expression



**Figure 16** : Effet de l'expression de TLR7 par les cellules tumorales sur la survie des patients. **16A**, courbe de survie par la méthode de Kaplan-Meier pour la cohorte de patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie. **16B**, données associées. **16C**, courbe de survie par la méthode de Kaplan-Meier pour la cohorte de patients ayant reçu la chimiothérapie neo-adjuvante. **16D**, données associées. Dans les tableaux, sont présentés pour chaque groupe, les patients censurés, à risque et le nombre d'événements à chaque temps. Le p correspond au test logrank à la valeur seuil de 82% de cellules tumorales positives pour TLR7, et le p corrigé correspond au même p après correction par la méthode de Altman (Altman, 2001).

est hétérogène, allant de 0% à 100% de cellules positives pour TLR7. Il existe un contrôle interne du marquage de TLR7 car certaines populations de cellules immunitaires sont toujours positives pour TLR7. Chez les patients ou aucune cellule tumorale positive pour TLR7 n'est observée, il y a toujours des cellules immunitaires positives pour ce marquage. Trente pour cent des patients n'expriment pas du tout de TLR7 sur leurs cellules tumorales. Cependant, en faisant la somme de tous les patients

présentant au moins 1% de cellules tumorales positives pour TLR7, on remarque qu'environ 70% de ces patients sont positifs pour TLR7 sur leurs cellules tumorales. On observe aussi que le pourcentage de patients ayant une très forte expression de TLR7 est plus élevé dans la cohorte de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules n'ayant pas reçu de chimiothérapie néoadjuvante (figure 16B) que dans celle de patients ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante (figure 16C).

Une fois la quantification des cellules tumorales exprimant TLR7 réalisée, la méthode de Kaplan-Meier, couplée à celle du cutoff optimal, a été utilisée pour mesurer la différence de survie entre les groupes de patients ayant une forte expression de TLR7 et ceux présentant une expression faible ou modérée. Avec les données présentes dans chaque cohorte, nous avons étudié la survie globale des patients en fonction de l'expression de TLR7. Le cut-off optimal, c'est à dire la valeur seuil entre les deux groupes de patients (expression forte ou faible/modérée de TLR7 par les cellules tumorales) est de 82% pour les deux cohortes. Les courbes détaillées et les données de la survie des patients classés par groupes sont présentées dans la figure 16.

Les courbes présentées dans la figure 16 montrent que la survie des patients ayant plus de 82% de cellules tumorales exprimant TLR7, ont une survie globale significativement plus courte que les patients ayant moins de cellules tumorales exprimant TLR7. Pour la cohorte de patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie, la moitié des patients ayant une forte expression de TLR7 décède environ 40 mois après la résection chirurgicale de la tumeur alors que lorsque l'expression de TLR7 est faible, la moitié des patients est décédée 70 mois environ après la résection chirurgicale de la tumeurs. Pour la cohorte de patients ayant reçu la chimiothérapie néoadjuvante, la médiane de survie passe de 10 à 40 mois. Une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales est donc de mauvais pronostic pour les patients atteints de CPNPC.



## Discussion

Au cours de cette étude sur le rôle de TLR7 dans le CPNPC, nous avons montré que les cellules tumorales de CPNPC peuvent exprimer TLR7, et que la stimulation de ce récepteur de l'immunité innée sur les cellules de CPNPC a un effet protumoral. Nous avons aussi montré que la stimulation de ce récepteur *in vivo*, sur des lignées de cellules murines ou humaines de CPNPC, conduit à une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire ainsi qu'à une résistance à la chimiothérapie. Ces résultats ont été obtenus *in vitro* et *in vivo* sur des lignées de souris immunodéficientes.

Dans des modèles murins immunocompétents, la stimulation de TLR7 par un agoniste de synthèse peut conduire à deux situations différentes. Dans le cas où une faible dose de l'agoniste est injectée aux souris, l'effet du ligand sur les cellules du système immunitaire semble être plus fort que l'effet sur les cellules tumorales puisque dans ce cas là, nous observons un effet antitumoral. Lorsqu'une forte dose de l'agoniste est injectée aux souris, nous observons le même effet que chez les souris immunodéficientes, à savoir une augmentation de la croissance tumorale et une résistance à la chimiothérapie.

Chez l'homme, nous avons observé sur deux cohortes de patients atteints de CPNPC, la première sans chimiothérapie néoadjuvante, la deuxième avec une chimiothérapie néoadjuvante, l'effet de l'expression de TLR7 par les cellules tumorales sur la survie des patients. Dans les cohortes étudiées, la survie est réduite chez les patients ayant une plus grande proportion de cellules tumorales positives pour TLR7.

Des études sur le rôle des TLRs sur les cellules tumorales ont déjà été réalisées mais se limitent soit à des lignées cellulaires, soit à des études sur des patients mais aucune étude publiée aujourd'hui ne regroupe autant de données différentes, avec des lignées cellulaires, des modèles murins et des cohortes de patients. Toutes les données recueillies pour le moment montrent un rôle important de TLR7 dans l'inflammation protumorale et dans l'induction de résistance à la chimiothérapie.

### 1- Expression de TLR7 par les cellules tumorales

L'expression de TLRs est connue sur les cellules de l'immunité innée et sur les cellules épithéliales. L'expression de certains TLRs a été montrée sur des lignées de cellules tumorales humaines ou murines (Kelly et al., 2006; Earl et al., 2009; González-Reyes et al., 2010). Les exemples cités ici s'intéressent à tous les TLRs connus et l'expression de TLR4 est la plus décrite dans différents types de cancers. Cependant, dans certains cas, les cellules



tumorales d'un tissu expriment certains TLRs alors que le tissu sain ne l'exprime pas. C'est le cas pour TLR9 dans le CPNPC. Les résultats obtenus montrent que l'activation de TLR9 par ces ligands sur des cellules tumorales de CPNPC entraîne la production de chimiokines entraînant le recrutement de monocytes (Droemann et al.).

Dans le poumon également, une équipe s'intéressant à l'expression de TLR3 par les cellules de poumon normal chez la souris a observé une augmentation de l'expression de TLR3 par cytométrie en flux et par immunohistochimie lorsque les souris sont traitées avec un agoniste de TLR3, le poly I:C. Cette augmentation de l'expression de TLR3 est associée avec une augmentation de l'inflammation et du recrutement de populations immunitaires innées, comme les polynucléaires éosinophiles et cellules mononuclées dans les poumons ainsi qu'une diminution de la fonctionnalité des poumons (Stowell et al., 2009).

Pour TLR7, des études menées sur différents types de tumeur ont montré une coexpression, à la fois sur les cellules du système immunitaire et sur les cellules tumorales. Dans le cancer du pancréas, la présence de TLR7 est un facteur important de la carcinogenèse dans différents modèles murins et chez l'homme (Ochi et al., 2012). Dans le CPNPC, les travaux réalisés précédemment au laboratoire montrent que TLR7 est exprimé par certaines lignées de cellules tumorales, comme les SK-MES et les A549 que nous avons utilisées pour notre étude, et par les cellules tumorales de 70% des patients atteints de CPNPC (Cherfils-Vicini et al., 2010). Les résultats sont confirmés par notre étude. L'expression de TLR7 a été observée sur nos lignées de cellules tumorales en immunohistochimie et en cytométrie en flux (figure 9). Sur les patients de la cohorte, l'expression de TLR7 est hétérogène, elle est comprise entre 0 et 100% de cellules tumorales positives pour TLR7. La majorité des patients a des cellules tumorales exprimant TLR7 (72% des patients de la cohorte sans chimiothérapie néoadjuvante et 63% des patients de la cohorte post chimiothérapie néoadjuvante).

La présence de TLR7 sur les cellules tumorales est inhabituelle, puisqu'il s'agit d'un récepteur habituellement présent sur les cellules du système immunitaire. L'expression de TLR7 par les cellules de CPNPC peut être le résultat d'une exposition prolongée à des ARN ou ADN viraux comme pour l'expression de TLR3 dans les poumons des souris dans l'étude précédemment citée.

Le lien entre cancer et inflammation étant connu de longue date, la présence de TLR7 sur les cellules tumorales peut avoir un rôle important dans l'activation de l'inflammation protumorale. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis des cellules tumorales en présence de leurs ligands.



## 2- Progression tumorale et résistance à la chimiothérapie induites par la stimulation de TLR7 in vitro

La présence des TLRs n'est pas le seul paramètre à étudier dans l'étude des effets de la stimulation de TLR7 sur les lignées tumorales. Il faut aussi vérifier que la forme présente est une forme fonctionnelle, capable de transduire un signal intracellulaire. Les travaux préalablement réalisés au laboratoire ont montré que la stimulation de TLR7 induit une activation atypique de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B par phosphorylation de I $\kappa$ B- $\alpha$ , mais pas de dégradation de celui-ci. Les résultats ont été obtenus sur la lignée cellulaire A549 et la même activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B a été observée sur la lignée cellulaire LL/2.

Nous avons étudié l'effet de la stimulation de ce ligand sur les cellules tumorales au niveau de la prolifération cellulaire avec ou sans chimiothérapie. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 9 et montrent que la stimulation de TLR7 induit une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'une résistance à la chimiothérapie. Ces observations reflètent l'importance de la présence de ces récepteurs sur les cellules tumorales dans le développement des tumeurs et dans la réponse à la chimiothérapie.

Quelques études font état d'une stimulation directe par des agonistes des TLRs sur les cellules tumorales. Il a été montré que la stimulation de TLR3 par des ligands de synthèse peut induire une apoptose des lignées de cellules tumorales de cancer du sein. Cette apoptose est le résultat de l'activation d'une voie particulière de NF- $\kappa$ B (Salaun et al., 2006). Cependant, cette étude a été réalisée sur des lignées de cellules tumorales humaines et l'article ne fait état d'aucune activation du système immunitaire par le TLR3 et d'aucune inflammation chronique en résultant.

Un autre article, s'intéresse à l'induction de la prolifération cellulaire et de la résistance à la chimiothérapie après la stimulation de TLR4 par le LPS. Les auteurs observent sur des lignées cellulaires humaines de cancer des ovaires une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'une résistance au paclitaxel lorsque les cellules sont traitées par du LPS. Dans ce cas aussi, il y a une activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B via l'adaptateur moléculaire MYD88. La stimulation par l'agoniste de TLR4 induit aussi une surexpression de protéines impliquées dans les mécanismes de survie cellulaire et de cytokines proinflammatoires. L'intérêt majeur de cette étude réside dans l'analyse de la survie des patients exprimant ou non dans les tissus tumoraux MYD88. La survie des patients est diminuée lorsque les tissus tumoraux expriment MYD88. Les auteurs concluent de ces recherches que l'activation de la



voie de signalisation passant par TLR4 et MYD88 active la progression tumorale ainsi que la résistance à la chimiothérapie (Kelly et al., 2006).

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la présence de TLR7 sur les cellules tumorales, aux effets de la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales ainsi que sur les cellules immunitaires.

### 3- Le double rôle de la stimulation de TLR7 in vivo

La première étape de cette partie de l'étude a été de vérifier que les données obtenues in vitro, à savoir l'augmentation de la progression tumorale et la résistance à la chimiothérapie observées étaient reproductibles in vivo. Des expériences ont donc été réalisées sur des lignées murines immunodéficientes, les souris NOD/SCID. L'injection des cellules tumorales aux souris se fait par voie sous cutanée, les tumeurs ainsi obtenues sont facilement observables et mesurables. Les agonistes de TLR7 ont été injectés en même temps que la tumeur puis tous les trois jours afin de reproduire une inflammation chronique. La chimiothérapie est, injectée une fois que les tumeurs sont palpables et observables.

Les résultats obtenus sont les mêmes qu'in vitro, l'injection d'agonistes de TLR7 entraîne une augmentation de la taille des tumeurs et une résistance à la chimiothérapie, ces résultats sont valables pour les deux lignées de cellules tumorales utilisées. De plus, pour la lignée cellulaire humaine de CPNPC, A549, la survie des souris aussi est affectée par la stimulation de TLR7. Lorsque les souris reçoivent l'agoniste de TLR7, leur survie est significativement diminuée par rapport aux souris ne le recevant pas, avec ou sans chimiothérapie.

L'observation de la résistance à la chimiothérapie in vivo est une nouveauté par rapport à ce qui est décrit dans la littérature. Dans différents modèles murins de cancers pancréatiques, il a été observé que la stimulation des cellules tumorales par des agonistes de TLR7 induit une augmentation de la prolifération cellulaire et du développement des cancers pancréatiques (Ochi et al., 2012). Dans cet article, les auteurs ont montré que les voies de signalisation de Notch et STAT3 sont activées mais les effets de la stimulation de TLR7 après traitement par chimiothérapie ne sont pas étudiés.

Dans notre étude, la spécificité du rôle de la stimulation de TLR7 a été confirmée par l'utilisation d'un antagoniste de TLR7. La molécule utilisée a déjà servi dans des modèles murins de traitement du lupus et est brevetée pour diminuer l'inflammation lors de greffes de biomatériaux (Barrat et al., 2005; Ushida et al., 2012). Nous avons montré que lorsqu'il est injecté en même temps que l'agoniste de TLR7, l'effet de ce dernier est inhibé. Et plus que cela, l'inhibition de TLR7 a un effet antitumoral. En effet, lorsque cet antagoniste est utilisé



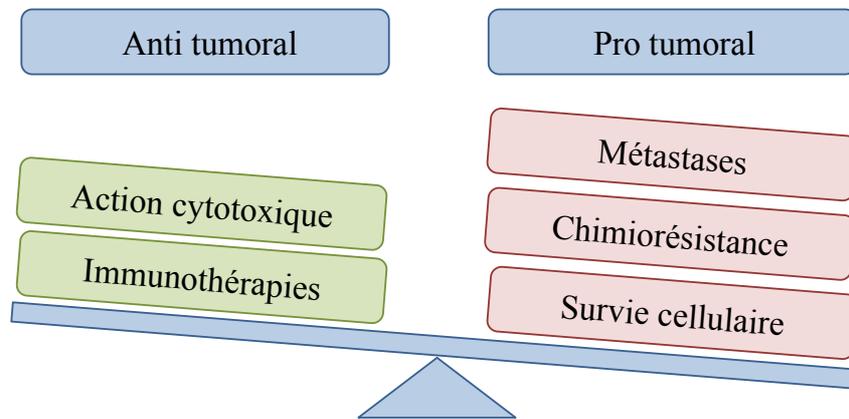
seul, la taille des tumeurs est diminuée par rapport au groupe contrôle de souris traitées avec du PBS à la place de l'agoniste et avec l'ODN contrôle au lieu de la séquence immunorégulatrice. Cet effet pose la question du rôle des ligands endogènes de TLR7 possiblement présents au site de la tumeur.

Des résultats similaires ont été reportés sur les effets des antagonistes de TLR4 et de TLR7 (Earl et al., 2009; Ochi et al., 2012). L'inhibition de TLR4 sur des lignées de cellules tumorales de cancer du colon conduit à une diminution de la masse tumorale sur des souris immunocompétentes. Dans les modèles de cancers pancréatiques, l'inhibition de TLR7 se fait par les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés dans notre étude. Les observations faites sur l'utilisation de ces inhibiteurs sont les mêmes que dans le cancer du poumon, ces inhibiteurs confèrent une protection sur le développement des tumeurs pancréatiques.

Les deux lignées cellulaires réagissent de la même façon à la stimulation par les agonistes de TLR7, cependant, le fait que la lignée LL/2 soit une lignée murine, nous permet de greffer ces cellules tumorales sur des souris immunocompétentes et d'étudier l'effet de la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales et sur les cellules immunitaires. Il s'agit des données représentées dans la figure 13. Selon la dose d'agoniste de TLR7 utilisé, un effet pro ou anti tumoral est observé. Avec les faibles doses d'agoniste, un effet antitumoral est observé. Les tumeurs des souris traitées avec les faibles doses des agonistes de TLR7, 10 et 20µg de CL264, sont de plus petite taille que celle des souris traitées avec du PBS.

Ces résultats sont cohérents avec les études réalisées récemment sur le mélanome. Dans les cas de mélanome, les souris sont traitées par des applications de crèmes contenant des agonistes de TLR7 imiquimod et gardiquimod. L'application de ces crèmes augmente l'activation du système immunitaire et notamment des cellules dendritiques contre la tumeur (Lee et al., 2007; Redondo et al., 2007; Ma et al., 2010; Drobits et al., 2012).

Cependant, aucun des articles cités ici s'intéressant au rôle antitumoral de la stimulation de TLR7 sur les cellules de l'immunité innée n'a étudié l'expression du TLR par les cellules tumorales et à l'éventuelle stimulation des cellules tumorales provoquée par la présence du récepteur. De plus, aucun article ne compare les effets de la stimulation de TLR7 sur les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire. Nous avons montré que de fortes doses de l'agoniste de TLR7 permettent de renverser la balance entre les deux phénomènes. Ainsi, avec une forte dose de l'agoniste de TLR7, 40µg de CL264, un effet protumoral et une résistance à la chimiothérapie sont observés, comme lorsque les cellules sont greffées à des souris immunodéficientes.



**Figure 17 :** La présence des TLRs sur les cellules tumorales et leur stimulation dans différents modèles murins peut avoir des effets opposés, pro ou anti tumoral. Même si les ligands des TLRs sont utilisés en thérapies de certaines pathologies, leur utilisation dans les cas de cancer doit se faire prudemment car les effets de la stimulation des TLRs sur des cellules tumorales de patients ne sont pas encore bien déterminés.

Pour valider que l'effet anti tumoral observé est bien du à une stimulation du système immunitaire par l'agoniste de TLR7, nous avons étudié les populations immunitaires, par cytométrie en flux, sur des souris ayant reçu les cellules tumorales ainsi que différentes doses des agonistes de TLR7.

#### 4- Activation du système immunitaire par la stimulation de TLR7.

La réponse immunitaire activée par l'imiquimod dans le traitement du mélanome chez des souris passe en grande partie par le système immunitaire innée puisque la présence de cellules de l'immunité adaptative n'est pas requise pour l'élimination de ces tumeurs. Les cellules dendritiques sont les cellules les plus importantes dans cette réponse et c'est le passage de cellules dendritiques immatures à cellules dendritiques tueuses, produisant des protéines cytolytiques contre les cellules tumorales qui permet une réponse aussi efficace (Drobits et al., 2012; Jiménez-Baranda et al., 2012).

Afin de comparer nos résultats et ce qui est publié dans la littérature, nous nous sommes intéressés aux populations immunitaires dans les tumeurs et dans les ganglions drainants de ces tumeurs. Dans la tumeur, une diminution de certaines populations immunitaires est observée lorsque la dose d'agoniste de TLR7 est augmentée. En étudiant de façon plus précise les populations immunitaires modulées par l'injection des agonistes de TLR7, nous avons observé que la population subissant la plus forte baisse est celle des lymphocytes T et d'autres équipes ont montré une lymphopénie induite par la stimulation de TLR7 (Gunzer et al., 2005).

A la faible dose de l'agoniste de TLR7, dans la tumeur et dans le ganglion, la réponse immunitaire observée est le signe de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative structurée, un pourcentage de macrophages, similaire à celui observée chez les souris traitées avec du PBS 1X mais une augmentation de leur activation observée par l'augmentation de la présentation du CMH de classe II et une augmentation significative de la proportion de cellules dendritiques dans la tumeur. Une augmentation de la proportion de lymphocytes B est aussi observée dans la tumeur. Ces lymphocytes expriment le TLR7 de façon particulièrement importante, il n'est donc pas étonnant d'observer cette augmentation de leur proportion. Dans les ganglions drainants des souris traitées avec la faible dose de l'agoniste de TLR7, une augmentation de la proportion de cellules dendritiques est aussi observée. Cela est un signe de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative dans les sites où se fait la présentation antigénique. Dans ces mêmes sites, nous avons observé que la proportion de lymphocytes T est diminuée et celle des lymphocytes B augmentée, comme dans la tumeur. Mais cette fois-ci, la répartition entre les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est elle aussi modifiée. La proportion de



lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est augmentée et le ratio des CD4<sup>+</sup> sur les CD8<sup>+</sup> est diminuée. L'expression des marqueurs d'activation sur ces populations immunitaires n'est pas modifiée.

Les résultats obtenus ont montré une grande importance de la présence et de l'activation de TLR7 sur les cellules tumorales dans le développement de la tumeur ainsi que dans la survie des souris. Ces récepteurs de l'immunité innée, lorsqu'ils sont stimulés dans les cellules tumorales ont la possibilité de conduire à un état inflammatoire protumoral dans des modèles murins immunocompétents et immunodéficients (figure 17). Cependant la stimulation des cellules immunitaires par les ligands de TLR7 peut avoir un effet antitumoral. L'aboutissement de ce projet est l'étude dans une cohorte de patients atteints de CPNPC de la relation entre la survie des patients et l'expression de TLR7 par les cellules tumorales.

Cela nous apporte des éléments de réponse sur le rôle pro ou antitumoral de la stimulation de TLR7 chez un hôte immunocompétents et nous renseigne aussi sur la pertinence de l'utilisation d'agonistes des TLRs dans les cancers.

#### 5- Valeur pronostic de l'expression de TLR7 sur des cohortes de patients

Une expression hétérogène de différents TLRs a été montrée dans différents types de cancer. Cette hétérogénéité de l'expression des TLRs a amené les chercheurs à étudier le lien entre l'expression des TLRs par les cellules de la tumeur et la survie des patients.

Une équipe s'est intéressée au lien entre la présence des TLRs et le développement du carcinome épidermoïde de l'œsophage. Ils ont montré par PCR quantitative et par immunohistochimie que les cellules tumorales peuvent exprimer les TLRs 3, 4, 7 et 9. Dans cette étude, les auteurs trouvent, pour TLR7 et TLR9, une association entre l'expression de ces TLRs et l'avancement de la pathologie. Il y a plus de patients avec une forte expression de TLR7 et TLR9 dans les stades avancés que dans les stades précoces. De plus une forte expression de TLR3 est le signe d'une augmentation du risque d'envahissement ganglionnaire. La présence de TLR3 donc aussi un signe de la progression de la maladie. Les auteurs concluent de cette étude que la présence des TLRs sur les cellules tumorales est un signe de l'avancement de la maladie (Sheyhidin, 2011). Des résultats similaires sont retrouvés dans le cancer du sein. Dans une cohorte de patients atteints de cancer du sein, une forte expression de TLR3 par les cellules tumorales est associée de façon significative avec l'apparition de métastases (González-Reyes et al., 2010).

Dans ces deux études, la présence des TLRs a aussi été étudiée sur d'autres types cellulaires que les cellules tumorales. Dans les deux études, il a été montré que l'expression de TLR4 et TLR9 sur les cellules mononuclées inflammatoires est de mauvais pronostic pour la survie des patients



et la présence de TLR9 sur les cellules du stroma est aussi associé avec une diminution de la survie pour les patients.

Dans le cancer ovarien, c'est l'importance de la voie de signalisation entre le TLR4 et MYD88 qui a été étudiée par l'équipe de Kelly et al., 2006. Sur une cohorte de patientes atteintes de cancers ovariens de stades avancés (IIIa et IV), les auteurs ont étudié la corrélation entre la survie des patientes et l'expression de l'adaptateur moléculaire MYD88. Malgré le peu de patients inclus dans leur cohorte, la différence de survie entre le groupe ayant une forte expression de MYD88 et celui ayant une faible expression est significative (Kelly et al., 2006).

Dans l'étude que nous avons réalisée, l'expression de TLR7 par les cellules tumorales des patients est très variable (figure 15). En utilisant la méthode du cutoff optimal, nous avons pu montrer que les patients ayant plus de 82% de cellules tumorales positives pour TLR7 ont une survie diminuée par rapport aux patients ayant moins de 82% de cellules tumorales positives pour TLR7. Ces résultats ont été montrés sur les deux cohortes de patients atteints de CPNPC étudiées.

Dans la cohorte de patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie néoadjuvante avant la résection chirurgicale de la tumeur, la médiane de survie des patients ayant une faible expression de TLR7 sur leurs cellules tumorales est de plus de 80 mois, soit deux fois plus que la médiane de survie des patients ayant une forte expression de TLR7. Pour ces derniers, la médiane de survie est de 40 mois. Pour la cohorte des patients opérés après chimiothérapie, la médiane de survie passe de 10 mois chez les patients ayant une forte expression de TLR7 à presque 40 mois chez les patients ayant une faible expression de TLR7. De tels résultats sur deux cohortes rétrospectives de 352 et 109 patients montre l'importance du rôle de TLR7 dans le développement, et la prolifération tumorale.

Cette étude conduite sur des lignées cellulaires, des modèles murins et des cohortes de patients a permis d'apporter de nouvelles preuves aux théories sur les liens entre inflammation et développement des cancers. Nous avons montré que la présence de récepteurs liés à l'immunité innée mais aussi à l'inflammation est un facteur favorisant le développement tumoral.

Dans les lignées cellulaires, la présence de TLR7 et de ces agonistes conduit à une augmentation de la croissance cellulaire ainsi qu'à une résistance à la chimiothérapie. Les mêmes résultats ont été obtenus in vitro dans des modèles murins immunodéficients.

Les résultats obtenus lors de la transposition de ces expériences dans un modèle murin immunocompétents étaient inattendus. Même si il était connu que l'inflammation peut avoir un effet pro ou anti tumoral, nous ne nous attendions pas à retrouver cette différence avec la

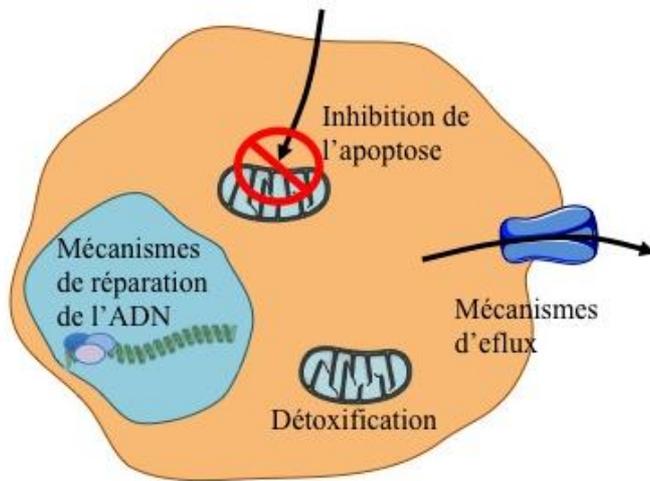


même molécule ou en stimulant un même récepteur, TLR7, sur des types cellulaires différents et dans un modèle murin immunocompétent.

De plus, les résultats obtenus sur les cohortes de patients atteints de CPNPC valident ce qui a déjà été observé dans la littérature sur l'expression des TLRs par les cellules tumorales mais nous montre aussi l'importance que la présence de TLR7 peut avoir dans le développement du CPNPC.

L'ensemble des résultats obtenus pose de nouvelles questions :

- Quels sont les mécanismes de résistance induits par la stimulation de TLR7
- Quels sont les effets sur la migration cellulaire et la formation de métastases de la stimulation par les agonistes de TLR7
- La stimulation des cellules tumorales peut elle induire la transition épithéliaux mésenchymateuse
- L'expression de TLR7 par les cellules tumorales des patients peut-elle servir de biomarqueur pronostic pour la survie des patients



**Figure 18 :** Principaux mécanismes de résistances aux chimiothérapies. Les mécanismes de réparation de l'ADN interviennent lorsque les patients sont traités avec des agents intercalants de l'ADN. Les mécanismes de détoxification et d'efflux sont des mécanismes très généraux, impliqués dans les résistances à plusieurs types de thérapies (chimiothérapie, trithérapie pour le VIH, antibiothérapie, etc). Les mécanismes d'inhibition de l'apoptose comprennent protéines inhibant l'activation de la voie des caspases.

## Perspectives

Les travaux présentés ici posent plusieurs questions et peuvent servir de bases à d'autres études. Une augmentation de la croissance tumorale et une résistance à la chimiothérapie ont été observées après stimulation des cellules tumorales par les agonistes de TLR7 mais les protéines impliquées dans ces processus n'ont pas été complètement identifiées. De plus, une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales de patients est de mauvais pronostic sur leur survie globale. Ces données indiquent que l'expression de TLR7 est un facteur important à prendre en compte pour moduler la prise en charge thérapeutique du patient. Par ailleurs, il est important de déterminer quels sont les ligands endogènes possibles de TLR7, chez les patients, afin de pouvoir proposer des thérapies venant contrer les effets de ces ligands potentiels.

### 1- Mécanismes de résistances aux chimiothérapies

L'apparition de mécanismes de résistances aux chimiothérapies est un phénomène connu dans le CPNPC, les combattre est devenu une part importante dans le traitement de ce type de cancer (Chang, 2011). Dans l'étude que nous avons menée, une résistance à la chimiothérapie est induite par la stimulation de TLR7 dans des lignées de cellules tumorales humaines et murines, mais les mécanismes complets conduisant à cette résistance ne sont pas connus. Dans l'étude publiée précédemment au laboratoire, une augmentation de l'ARNm codant pour la protéine Bcl-2 a été retrouvée lorsque les cellules ont été stimulées par des agonistes de TLR7. La surexpression de cette protéine a aussi été retrouvée dans les cellules tumorales des patients. Il existe cependant d'autres types de résistances aux chimiothérapies passant par des mécanismes différents. Les trois principaux sont :

- l'inhibition de l'apoptose
- l'activation de la prolifération cellulaire
- les mécanismes d'efflux
- les mécanismes de détoxification cellulaire.

Une étude a aussi été menée au laboratoire sur les gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose. Pour cette étude, nous avons utilisé les tumeurs des souris de l'expérience présentée en figure 11A et 11B. Les ARN ont été extraits de ces tumeurs et des PCR quantitatives ont été réalisées (méthode Taqman Low Density Array). Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes. Cette expérience a été réalisée sur les tumeurs des souris en fin d'expérience. Il est possible qu'à ce stade, il n'y ait plus



d'expression différentielle des gènes et par conséquent, qu'aucune différence dans l'expression de protéines liées à l'apoptose n'ait pu être observée.

Pour éviter ce problème nous allons utiliser une approche différente. Nous souhaitons réaliser un tri des cellules tumorales à partir des prélèvements de patients. Nous avons accès à de tels prélèvements grâce à notre collaboration avec le service d'anatomopathologie de l'Hôtel-Dieu. Lorsque les patients subissent une résection chirurgicale, il nous est possible d'obtenir un fragment de la tumeur avant fixation. Sur des échantillons de ce type, nous avons utilisé les anticorps reconnaissant les protéines cytokératine, EMA (Epithelial Membrane Antigen) et BerEp4, permettant la reconnaissance des cellules épithéliales. Dans la tumeur, des anticorps dirigés contre ces protéines permettent de distinguer les cellules tumorales des fibroblastes du stroma et des cellules immunitaires. Nous souhaitons réaliser un tri par cytométrie en flux ou par billes magnétiques avec ces anticorps. Une fois les cellules tumorales isolées du reste de la tumeur, des extractions d'ARN sont réalisées. A partir des ARN, nous souhaitons réaliser une analyse transcriptomique sur une large série de gènes impliqués dans les mécanismes de résistance cités. La corrélation de l'expression de ces gènes avec l'expression de TLR7 par les cellules tumorales est possible grâce à la quantification de TLR7 par immunohistochimie sur des lames de tissus tumoral comme présenté dans l'étude rétrospective des cohortes de patients. Nous voulons mener une étude similaire à partir des lignées de cellules tumorales que nous étudions après stimulation par les agonistes de TLR7 ou non. Pour valider et confirmer que la stimulation de TLR7 est à l'origine de l'apparition de ces mécanismes de résistance aux chimiothérapies, nous souhaitons réaliser d'autres expériences in vitro sur les lignées cellulaires LL/2 et A549, avec des séquences d'ADN immunorégulatrices permettant l'inactivation de la voie de signalisation de TLR7.

Une étude au niveau protéique devra aussi être menée pour confirmer que les ARNm des gènes observés comme étant différentiellement exprimés dans les différents groupes de patients sont bien traduits et que ces protéines sont bien impliquées dans les mécanismes de résistance aux chimiothérapies. Cette confirmation pourra se faire par western blot sur des protéines extraites des cellules tumorales de patients, par cytométrie en flux ou bien par immunohistochimie.

Une fois que des protéines cibles auront été identifiées et confirmées, que leur rôle dans les mécanismes de résistances aux chimiothérapies et que leur induction par TLR7 auront été confirmées, nous souhaitons établir sur les cohortes de patients atteints de CPNPC, le lien entre la survie des patients et l'expression de ces protéines impliquées dans les mécanismes de résistance aux chimiothérapies.

L'utilisation des données cliniques des patients de la cohorte de CPNPC ayant été opérés après chimiothérapie, pourrait nous permettre de faire le lien entre l'expression des protéines



de résistance aux chimiothérapies et la réponse aux traitements. Cela nous permettrait éventuellement d'identifier un traitement ne conduisant pas à une résistance à la chimiothérapie malgré une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales.

## 2- Autres modèles murins d'étude du rôle de TLR7 dans le développement et la progression de CPNPC

Lors des travaux précédemment menés au laboratoire sur le rôle de la stimulation de TLR7 dans le CPNPC, une augmentation de l'expression des ARNm codant pour la protéine CCR4 avait été observée. Il a été montré que dans le cancer du sein, les cellules tumorales formant des foyers métastatiques sont les cellules positives pour CCR4. Il s'agit en effet d'un récepteur de chimiokines et cette famille de protéines est largement impliquée dans les phénomènes de migration cellulaire (Olkhanud et al., 2009). De plus, d'autres articles ont montré que la présence des TLRs dans les tumeurs était un facteur pouvant favoriser l'apparition de métastases (Earl et al., 2009; Olkhanud et al., 2009; González-Reyes et al., 2010). Mais l'étude de la migration cellulaire et de la formation de métastases n'est pas possible dans le modèle murin que nous utilisons. L'injection de tumeur sous cutanée n'est pas un bon système pour étudier la migration des cellules tumorales. Ces cellules de CPNPC ont conservé un tropisme pour les cellules pulmonaires et lors de dissections de nos souris à la fin des expériences réalisées, nous n'avons observé des tumeurs secondaires que dans les poumons. Ce modèle n'est donc pas relevant dans l'étude de la formation de métastases.

Pour cela nous sommes intéressés à un modèle de CPNPC génétiquement induit par mutation constitutive hétérozygote de K-ras et mutation conditionnelle de la protéine p53. Dans ce modèle, les souris sont porteuses hétérozygotes de la mutation G12D de K-ras et le gène codant la protéine p53 est compris entre deux séquences lox. La recombinaison CRE est insérée dans un lentivirus qui est injecté par voie intratrachéale aux souris. Les cellules pulmonaires infectées par ce lentivirus vont donc être mutées pour K-ras et subir une excision du gène anti oncogène p53 par la recombinaison CRE. Cette double mutation est à l'origine d'adénocarcinomes pulmonaires chez toutes les souris (contre 80% des souris ayant la mutation K-ras G12D seule) (DuPage et al., 2009). En plus de la recombinaison CRE, les lentivirus injectés peuvent être porteur de la luciférase et de l'ovalbumine. La présence de la luciférase permet un suivi de la croissance tumorale et de la formation de métastase sans sacrifier les souris, et l'ovalbumine permet l'induction d'une réaction immunitaire plus forte contre les cellules tumorales par rapport aux cellules tumorales sans ovalbumine (DuPage et al., 2012).

Depuis quelque mois, nous avons commencé une collaboration avec le Pr Olivier Lantz (institut Curie, Paris) qui a un élevage de ces souris à l'institut Curie. Nous souhaitons,



maintenant que nous avons confirmé la présence de TLR7 sur les cellules tumorales de ce modèle, étudier le développement de ces tumeurs et la formation des métastases à distance de la tumeur primaire avec ou sans injection d'agonistes de TLR7.

Ce modèles de CPNPC a aussi l'avantage d'être orthotopique, les cellules tumorales se trouvent sur le site dont elles sont issues, contrairement aux modèles que nous avons utilisés jusqu'à présent où une tumeur pulmonaire se retrouvait injectée sous la peau des souris. Une étude de la réaction immunitaire dans le poumon sera donc possible. Avec ce modèle, en plus de l'étude de la formation des métastases, nous voudrions étudier les effets de la stimulation de TLR7 par des ARN viraux issus de virus respiratoire dans ce modèle, au lieu de la stimulation par des agonistes de synthèse, comme présenté dans cette étude. Cela donnerait des informations sur les effets possibles des infections virales sur le développement de CPNPC chez les patients et pourraient conduire à une étude plus poussée sur la relation entre TLR, infection et développement du cancer.

La greffe de cellules tumorales de patients sur des souris immunodéficientes et l'application d'un protocole identique à ce qui a été fait sur les cellules A549 pourrait permettre de répondre aux questions sur les effets de la stimulation de TLR7 sur des cellules tumorales positives ou négatives pour ce récepteur. En effet, une augmentation de l'expression des TLRs est observée lorsque ceux-ci sont stimulés par leurs agonistes (Stowell et al., 2009). Les cellules tumorales de patients réagissent-elles donc de la même façon à la stimulation par TLR7 ou bien cette réaction est dépendante du statut de TLR7 au début de l'expérience ? Il est important de pouvoir répondre à cette question sur l'induction possible de l'expression de TLR7 par ses propres ligands, car si les ligands naturels connus de TLR7 sont des ARN viraux, de plus en plus de ligands endogènes des TLRs sont découverts et si pour TLR7, ces ligands endogènes sont des ARN issus de la dégradation de la cellules, il est possible qu'ils soient présents en forte proportion dans le milieu tumoral et conduisent donc à une forte activation de TLR7 protumorale.

### 3- Les ligands endogènes de TLR7

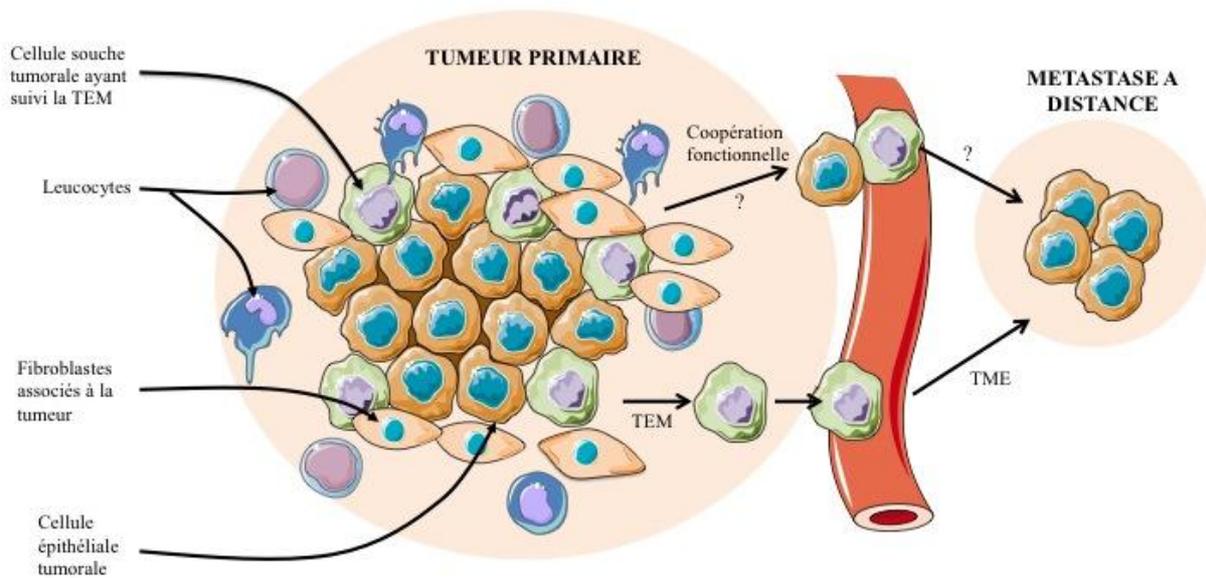
Dans l'étude réalisée ici, nous n'avons utilisé pour des raisons de facilité que des ligands synthétiques de TLR7. Il s'agit d'analogues des bases de l'ADN, la guanosine pour la loxoribin et l'adénine pour le CL264. Les ligands endogènes des TLRs sont présents dans l'organisme et sont impliqués dans les mécanismes de réparation tissulaire et d'activation de l'inflammation et de l'immunité innée. Cette activation est dans ces cas là, due à la présence dans le milieu d'acide hyaluronique, d'héparan sulfate, de fibronectine (des composants de la matrice extracellulaire) de protéine hsp, et de surfactant pulmonaire, qui sont reconnus pas le



TLR4 ou à la présence de cellules nécrotiques reconnus par le TLR2. Dans tous ces cas, une activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B est observée, conduisant à l'expression de gènes codant pour des protéines inflammatoires ou impliquées dans la réparation tissulaire. Une maturation des cellules dendritiques est aussi observée. Lorsque des cellules sont dégradées et que des complexes entre la chromatine et des IgG se forment, c'est la voie de signalisation de TLR9 qui est activée et cela conduit à une activation des lymphocytes B. Cette activation de l'immunité innée par les ligands endogènes des TLRs est connue pour être impliquée dans certaines maladies autoimmunes (Beg, 2002; Barrat et al., 2005; Rifkin et al., 2005).

Dans notre cas la stimulation de TLR7 par des ligands endogènes pourrait conduire à une augmentation de l'activation des cellules tumorales et donc à une augmentation de la croissance des tumeurs. Une étude a montré que des microARN présents dans les exosomes de cellules tumorales A549 et SK-MES, des lignées de CPNPC humains et LLC, lignée de CPNPC murine, sont capables de se lier aux TLR7 et TLR8 et d'activer les voies de signalisation de ces TLRs. L'étude a montré que la liaison des miARN se fait sur le TLR7 murin et sur le TLR8 humain. Pour montrer cela, les auteurs ont utilisé les lignées cellulaires HEK transfectées avec les TLRs d'intérêt. Lorsque l'expérience est faite avec la lignée HEK transfectée pour le TLR7 humain, aucune activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B n'est observée.

D'après les travaux précédents réalisés au laboratoire, nous avons vu que tous les patients ont une forte expression de TLR8 sur leurs cellules tumorales. Seule l'expression de TLR7 varie. Notre hypothèse est la suivante : chez l'homme, la liaison entre les TLRs et les ARN simple brin, miARN ou ARN viraux, se fait par un hétérodimère entre TLR7 et TLR8. La présence d'un seul des deux récepteurs n'est pas suffisante pour l'activation par tous les ARNs. Afin d'étudier ces phénomènes, nous avons la possibilité d'utiliser des ARN interférents pour TLR7 ou TLR8. Ces petits fragments d'ARN vont, en se fixant sur l'ARNm codant pour TLR7 ou TLR8, entraîner sa dégradation et empêcher sa traduction en protéine. Avec l'absence d'un des deux ou des deux TLRs dans les cellules tumorales, nous pourrions étudier l'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B ou bien la production d'interférons de type I afin de déterminer si les cellules tumorales ont été activées par des ligands endogènes. Nous souhaitons tester comme ligands endogènes des ARNm ou des miARN issus des prélèvements non fixés de tumeurs de CPNPC, obtenus à l'Hôtel Dieu.



**Figure 19 :** Rôle de la transition épithéliaux mésenchymateuse dans la formation de métastases à distance. Il existe d'autres mécanismes que la transition épithéliaux mésenchymateuse mais ils sont peu connus (notés « ? »). d'après Polyak and Weinberg, 2009.

#### 4- Expression de TLR7 et transition épithélio mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM et la transition mésenchymato-épithéliale ou TME sont des processus connus dans le développement embryonnaire. Ils permettent des modifications cellulaires et moléculaires complexes et des modifications des programmes de différenciation cellulaire. Ces processus sont connus pour être impliqués dans la formation de métastases à distance de la tumeur primaire à cause de la perte de molécules d'adhésion cellulaire, comme celles de la famille des cadhérines, des desmosomes ou des jonctions serrées entre les cellules, et l'acquisition de protéines permettant un remodelage de la matrice extra cellulaire, comme montré dans la figure 9 (Polyak and Weinberg, 2009).

Des études récentes ont montré l'implication de la TEM dans d'autres mécanismes de la progression tumorale que l'invasion des tissus à distance. Des publications ont montré l'implication de la TEM dans la résistance à la mort cellulaire et la sénescence, la résistance aux chimiothérapies et immunothérapies, un échappement à l'immunosurveillance et une augmentation de l'inflammation. L'activation de la TEM dans des conditions physiologiques, est observée dans la croissance embryonnaire et la réparation tissulaire. Dans le cas du développement tumoral, l'activation des voies de signalisation de Notch, Wnt ou Smad suite à la reconnaissance entre le TGF- $\beta$  et son récepteur (Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009).

L'activation de la TEM conduit à des effets similaires à ceux observés par la stimulation des cellules tumorales par les agonistes de TLR7 :

- résistance à la chimiothérapie et à la mort cellulaire
- échappement aux immunothérapies (augmentation de la croissance tumorale après le traitement par les agonistes de TLR7 pouvant dans certains cas servir d'immunothérapie).

Une de nos hypothèses sur les effets de la stimulation des cellules tumorales par les agonistes de TLR7 est l'activation de la TEM par la stimulation de TLR7.

La vérification de cette hypothèse peut se faire de façon très simple. Les marqueurs de la TEM sont la disparition des molécules d'adhésion et surtout de la E-cadhérine et l'apparition des protéines Snail, Twist ou de la famille de Zeb. Cette détection peut se faire facilement par Western Blot, sur les protéines totales extraites des lignées de cellules tumorales traitées ou non par les agonistes de TLR7.

Type de biomarqueur	Utilisation clinique	Identification	Validation	Exemple
Pronostique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- choix du traitement</li> <li>- sélection de patients</li> <li>- stratification des patients</li> </ul>	facile mais imparfaite ou biaisée	fréquente mais souvent inadaptée à cause des biais d'identification	La mutation du proto-oncogène K-ras est un facteur pronostic pour le développement du CPNPC (Slebos et al., 1990)
Prédictif	<ul style="list-style-type: none"> <li>- choix du traitement</li> <li>- sélection de patients</li> <li>- stratification des patients</li> </ul>	difficile, nécessite de grandes cohortes	Rare, nécessite de grandes cohortes	ERCC1 est un marqueur de la mauvaise réponse au traitement par les sels de platine dans le CPNPC (Gao et al., 2011)

**Table 8 :** Définition des biomarqueurs pronostic et prédictif et exemple. D'après Buyse et al., 2010.

## 5- Utilisation des TLRs comme biomarqueurs

Les biomarqueurs sont des indicateurs mesurables liés à une activité physiologique normale ou non. Ils permettent de diagnostiquer une pathologie, d'adapter un traitement ou de donner une indication sur l'issue d'une pathologie.

Les biomarqueurs sont répartis en deux catégories, pronostiques et prédictifs. Leur identification permet d'adapter les traitements aux patients, de sélectionner et classer les patients en groupes pour des études cliniques ou pour un traitement. La connaissance de ces biomarqueurs est un facteur important pour les futurs traitements des cancers. Ils permettent l'utilisation de traitements plus personnalisés pour chaque patient. La personnalisation des traitements peut permettre d'augmenter l'efficacité d'un traitement ou bien de diminuer les effets secondaires en le changeant.

Les biomarqueurs pronostics permettent de prévoir l'évolution de la pathologie sans prise en compte du traitement alors que les biomarqueurs prédictifs prédisent la réponse au traitement du patient. Un biomarqueur peut être à la fois pronostic et prédictif. Pour TLR7, nous avons montré que sa présence sur de nombreuses cellules tumorales est reliée à une diminution de la survie des patients. La présence de TLR7 sur les cellules tumorales peut donc être un facteur pronostic de la survie des patients. Si pour le moment les études réalisées sur les deux cohortes n'apportent que cette information, une étude plus poussée pourrait apporter plus de résultats.

L'étude de la cohorte de patients atteints de CPNPC et opérés après chimiothérapie mérite d'être approfondie afin d'essayer de relier la présence de TLR7 à la réponse à la chimiothérapie et au type de chimiothérapie utilisée. Différentes chimiothérapies sont utilisées dans le CPNPC et il est possible que certaines entraînent plus facilement des mécanismes de résistance induit par la stimulation de TLR7 que d'autres. Si ce travail d'analyse de la cohorte permet de mettre en évidence la corrélation entre la présence de TLR7 et le développement de résistances à une chimiothérapie particulière dans les cellules tumorales des patients, il sera aussi possible de vérifier dans les lignées cellulaires que la stimulation de TLR7 conduit bien à la résistance à la chimiothérapie. Avec des études plus poussées sur l'induction de ces mécanismes par les agonistes de TLR7, et la confirmation de ces résultats sur plusieurs cohortes de patients, nous espérons adapter ces résultats au traitement des patients.

Ainsi, cette étude sur les effets de la présence de TLR7 sur les cellules tumorales de CPNPC amène de nombreuses réponses aux interrogations laissées par les travaux précédemment réalisés au laboratoire, notamment sur les effets de la stimulation de TLR7 à la fois sur les



cellules tumorales et sur les cellules immunitaires in vivo. Si une réponse a été apportée sur cette question par l'utilisation de modèles murins, sur les patients, nous n'avons pas encore d'éléments de réponse à cause de l'hétérogénéité possible du système immunitaire des patients. Pour répondre à cette question, nous souhaitons reprendre les lames sur lesquelles une quantification de l'expression de TLR7 n'a été faite que sur les cellules tumorales. Ces blocs ont été sectionnés comme étant les plus infiltrés en cellules immunitaires et présentant au moins 30% de cellules tumorales. Afin de mesurer l'impact sur la survie de l'expression de TLR7 par les cellules immunitaires, il serait possible de mettre en place une évaluation de l'expression de TLR7 par les cellules immunitaires et de corrélérer les scores obtenus avec la survie des patients.

Cette étude a été initiée par des travaux réalisés sur des lignées de cellules tumorales et des études sur différents modèles murins de CPNPC puis l'expression de TLR7 a été quantifiée chez les patients atteints de CPNPC. Les résultats obtenus ici posent de nombreuses autres questions sur des sujets très fondamentaux, comme le rôle de la stimulation de TLR7 sur l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse ou la connaissance des ligands endogènes de TLR7 et l'étude de leur présence dans les tumeurs. Cependant, une partie importante de la poursuite de cette étude à partir des résultats obtenus est tournée vers le suivi clinique des patients. Nous espérons que TLR7 pourrait être un biomarqueur de la survie des patients et que son utilisation en clinique pourrait améliorer l'adaptation des traitements afin de diminuer les phénomènes de résistance aux chimiothérapies.



## Bibliographie

- Altman, D.G. (2001). Systematic reviews in health care: Systematic reviews of evaluations of prognostic variables. *BMJ* 323, 224–228.
- Balkwill, F., and Coussens, L.M. (2004). Cancer: An inflammatory link. *Nature* 431, 405–406.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357, 539–545.
- Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 202, 1131–1139.
- Beg, A.A. (2002). Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends in Immunology* 23, 509–512.
- Buyse, M., Sargent, D.J., Grothey, A., Matheson, A., and Gramont, A. de (2010). Biomarkers and surrogate end points—the challenge of statistical validation. *Nature Reviews Clinical Oncology* 7, 309–317.
- Chang, A. (2011). Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer* 71, 3–10.
- Cherfils-Vicini, J., Platonova, S., Gillard, M., Laurans, L., Validire, P., Caliandro, R., Magdeleinat, P., Mami-Chouaib, F., Dieu-Nosjean, M.-C., Fridman, W.-H., et al. (2010). Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *Journal of Clinical Investigation* 120, 1285–1297.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., Chaisemartin, L. de, et al. (2008). Long-Term Survival for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures. *JCO* 26, 4410–4417.
- Dranitsaris, G., Beegle, N., Ravelo, A., Kalberer, T., Yu, E., and Thomas, S. Evaluating the Impact of Bevacizumab Maintenance Therapy on Overall Survival in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*.
- Dranoff, G. (2011). Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology? *Nat Rev Immunol advance online publication*.
- Drobits, B., Holcman, M., Amberg, N., Swiecki, M., Grundtner, R., Hammer, M., Colonna, M., and Sibilio, M. (2012). Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *Journal of Clinical Investigation*.



- Droemann, daniel, Albrecht, D., Gerdes, J., Ulmer, A.J., Branscheid, D., Dalhoff, K., Zabel, P., and Goldmann, T. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respiratory Research* 6,.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 3, 991–998.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360.
- DuPage, M., Dooley, A.L., and Jacks, T. (2009). Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nature Protocols* 4, 1064–1072.
- DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L.M., Cheung, A.F., and Jacks, T. (2012). Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature* 482, 405–409.
- Earl, T.M., PhD, I.B.N., Ba, J.M.P., Wright, J.P., Ba, N.E.M., Ba, J.E.R., Md, K.P.P., Md, D.L.G., and R. S. Chari MD, M.B.A. (2009). Silencing of TLR4 Decreases Liver Tumor Burden in a Murine Model of Colorectal Metastasis and Hepatic Steatosis. *Ann Surg Oncol* 16, 1043–1050.
- Fávaro, W.J., Nunes, O.S., Seiva, F.R., Nunes, I.S., Woolhiser, L.K., Durán, N., and Lenaerts, A.J. (2012). Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. *Infectious Agents and Cancer* 7, 14.
- Gao, Z., Han, B., Shen, J., Gu, A., Qi, D., Huang, J., Shi, C., Xiong, L., Zhao, Y., Jiang, L., et al. (2011). ERCC1 protein as a guide for individualized therapy of late-stage advanced non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med* 2, 811–815.
- Godin-Heymann, N., Bryant, I., Rivera, M.N., Ulkus, L., Bell, D.W., Riese, D.J., 2nd, Settleman, J., and Haber, D.A. (2007). Oncogenic activity of epidermal growth factor receptor kinase mutant alleles is enhanced by the T790M drug resistance mutation. *Cancer Res.* 67, 7319–7326.
- González-Reyes, S., Marín, L., González, L., González, L.O., Del Casar, J.M., Lamelas, M.L., González-Quintana, J.M., and Vizoso, F.J. (2010). Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC Cancer* 10, 665.
- Gregory, A.D., and Houghton, A.M. (2011). Tumor-Associated Neutrophils: New Targets for Cancer Therapy. *Cancer Res* 71, 2411–2416.
- Guiducci, C., Gong, M., Xu, Z., Gill, M., Chaussabel, D., Meeker, T., Chan, J.H., Wright, T., Punaro, M., Bolland, S., et al. (2010a). TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* 465, 937–941.
- Guiducci, C., Tripodo, C., Gong, M., Sangaletti, S., Colombo, M.P., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2010b). Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic



- cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *J Exp Med* 207, 2931–2942.
- Gunzer, M., Riemann, H., Basoglu, Y., Hillmer, A., Weishaupt, C., Balkow, S., Benninghoff, B., Ernst, B., Steinert, M., Scholzen, T., et al. (2005). Systemic administration of a TLR7 ligand leads to transient immune incompetence due to peripheral-blood leukocyte depletion. *Blood* 106, 2424–2432.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Heron, J.F. (2011a). Docétaxel.
- Heron, J.F. (2011b). La Gemcitabine.
- Heron, J.F. (2011c). Le cisplatine.
- Heron, J.F. Vinorelbine.
- Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K.-L., Chen, Y., Mayer, L., Unkeless, J.C., and Xiong, H. (2005). Toll-Like Receptors on Tumor Cells Facilitate Evasion of Immune Surveillance. *Cancer Res* 65, 5009–5014.
- Huang, B., Zhao, J., Shen, S., Li, H., He, K.-L., Shen, G.-X., Mayer, L., Unkeless, J., Li, D., Yuan, Y., et al. (2007). *Listeria monocytogenes* Promotes Tumor Growth via Tumor Cell Toll-Like Receptor 2 Signaling. *Cancer Res* 67, 4346–4352.
- IARC (2010). GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Lung Cancer.
- Jiménez-Baranda, S., Silva, I.P., and Bhardwaj, N. (2012). Plasmacytoid dendritic cells lead the charge against tumors. *J. Clin. Invest.* 122, 481–484.
- Karin, M., Lawrence, T., and Nizet, V. (2006). Innate Immunity Gone Awry: Linking Microbial Infections to Chronic Inflammation and Cancer. *Cell* 124, 823–835.
- Kelly, M.G., Alvero, A.B., Chen, R., Silasi, D.-A., Abrahams, V.M., Chan, S., Visintin, I., Rutherford, T., and Mor, G. (2006). TLR-4 Signaling Promotes Tumor Growth and Paclitaxel Chemoresistance in Ovarian Cancer. *Cancer Res* 66, 3859–3868.
- Lee, J.-R., Shin, J.-H., Park, J.-H., Song, S.-U., and Choi, G.-S. (2007). Combined treatment with intratumoral injection of dendritic cells and topical application of imiquimod for murine melanoma. *Clinical and Experimental Dermatology* 32, 541–549.
- Ma, F., Zhang, J., Zhang, J., and Zhang, C. (2010). The TLR7 agonists imiquimod and gardiquimod improve DC-based immunotherapy for melanoma in mice. *Cellular & Molecular Immunology* 7, 381–388.
- Manegold, C., Gravenor, D., Woytowicz, D., Mezger, J., Hirsh, V., Albert, G., Al-Adhami, M., Readett, D., Krieg, A.M., and Leichman, C.G. (2008). Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 3979–3986.



- Mantovani, A., Romero, P., Palucka, A.K., and Marincola, F.M. (2008). Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 371, 771–783.
- Maráz, A., Furák, J., Pálföldi, R., Eller, J., Szántó, E., Kahán, Z., Thurzó, L., Molnár, J., Tizslavicz, L., and Hideghéty, K. (2011). Roles of BCL-2 and MDR1 expression in the efficacy of paclitaxel-based lung cancer chemoradiation. *Anticancer Res.* 31, 1431–1436.
- Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., and Adjei, A.A. (2008). Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings.* Mayo Clinic 83, 584.
- Ochi, A., Graffeo, C.S., Zambirinis, C.P., Rehman, A., Hackman, M., Fallon, N., Barilla, R.M., Henning, J.R., Jamal, M., Rao, R., et al. (2012). Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation* 122, 4118–4129.
- Olkhanud, P.B., Baatar, D., Bodogai, M., Hakim, F., Gress, R., Anderson, R.L., Deng, J., Xu, M., Briest, S., and Biragyn, A. (2009). Breast Cancer Lung Metastasis Requires Expression of Chemokine Receptor CCR4 and Regulatory T Cells. *Cancer Res* 69, 5996–6004.
- Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer* 9, 265–273.
- Redondo, P., Olmo, J. del, Cerio, A.L.-D. de, Inoges, S., Marquina, M., Melero, I., and Bendandi, M. (2007). Imiquimod Enhances the Systemic Immunity Attained by Local Cryosurgery Destruction of Melanoma Lesions. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 1673–1680.
- Rifkin, I.R., Leadbetter, E.A., Busconi, L., Viglianti, G., and Marshak-Rothstein, A. (2005). Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunological Reviews* 204, 27–42.
- Rodenhuis, S., Slebos, R.J.C., Boot, A.J.M., Evers, S.G., Mooi, W.J., Wagenaar, S.S., Bodegom, P.C. van, and Bos, J.L. (1988). Incidence and Possible Clinical Significance of K-ras Oncogene Activation in Adenocarcinoma of the Human Lung. *Cancer Res* 48, 5738–5741.
- Rosell, R., and Felip, E. (2001). Predicting response to paclitaxel/carboplatin-based therapy in non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* 28, 37–44.
- Rosell, R., Lord, R.V.N., Taron, M., and Reguart, N. (2002). DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 38, 217–227.
- Salaun, B., Coste, I., Rissoan, M.-C., Lebecque, S.J., and Renno, T. (2006). TLR3 Can Directly Trigger Apoptosis in Human Cancer Cells. *J Immunol* 176, 4894–4901.
- Scoazec, J.-Y., and Sabourin, J.-C. (2010). 2010 : septième édition de la classification TNM. *Annales De Pathologie* 30, 2–6.
- Sève, P., and Dumontet, C. (2005). Chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5, 73–88.
- Sheyhidin, I. (2011). Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal



squamous cell carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 17, 3745.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation* 122, 787–795.

Slebos, R.J.C., Kibbelaar, R.E., Dalesio, O., Kooistra, A., Stam, J., Meijer, C.J.L.M., Wagenaar, S.S., Vanderschueren, R.G.J.R.A., Van Zandwijk, N., Mooi, W.J., et al. (1990). K-ras Oncogene Activation as a Prognostic Marker in Adenocarcinoma of the Lung. *New England Journal of Medicine* 323, 561–565.

Stowell, N.C., Seideman, J., Raymond, H.A., Smalley, K.A., Lamb, R.J., Egenolf, D.D., Bugelski, P.J., Murray, L.A., Marsters, P.A., Bunting, R.A., et al. (2009). Long-term activation of TLR3 by poly(I:C) induces inflammation and impairs lung function in mice. *Respir. Res.* 10, 43.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139, 871–890.

Thomas, A., and Hassan, R. (2012). Immunotherapies for non-small-cell lung cancer and mesothelioma. *The Lancet Oncology* 13, e301–e310.

Ushida, Kazunari, Inoue, Ryo, Watanabe, and Takumi (2012). Patent Application: 0120220760.

Wang, G., Reed, E., and Li, Q.Q. (2004). Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol. Rep.* 12, 955–965.

Yang, H., Zhou, H., Feng, P., Zhou, X., Wen, H., Xie, X., Shen, H., and Zhu, X. (2010). Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29, 92.



# ANNEXES

## ANNEXE 1 : Evaluation du cout financier

### 1- Culture cellulaire

Produit	Quantité utilisée	Prix	Total
DMEM-F12	10	6,1€	61€
DMEM	10	4,4€	44€
HEPES	1	2€	2€
Sodium pyruvate	1	4€	4€
L-glutamine	1	9€	9€
Trypsine	5	5€	25€
Peniciline/streptomycine	2	7,5€	15€
SVF	2	52€	104€
<b>TOTAL</b>			<b>264€</b>

Le prix des agonistes de TLR7 et les quantités de ces agonistes utilisées pour les expériences in vitro ne sont pas reportées ici. Les quantités utilisées in vitro sont négligeables par rapport à ce qui a été utilisé in vivo.

Le bleu trypan utilisé pour les comptages n'est pas reporté dans ce tableau car l'utilisation qui en a été faite pour ce projet est négligeable par rapport à l'utilisation faite dans le reste du laboratoire.

### 2- Utilisation des modèles murins

Souris NOD/SCID : Les souris NOD/SCID sont des souris immunodéficientes génétiquement modifiées. Leur prix est donc plus élevé que celui de souris C57Bl/6. Pour réduire ce coût, nous avons lancé au centre d'exploration fonctionnelle un élevage de cette lignée murine à partir de couples achetés chez Charles River.



Pour tous les animaux, l'hébergement dans le centre d'exploration fonctionnelle est de 3€ par semaine et par cage.

Les anticorps utilisés dans le marquage des populations immunitaires après stimulation par les agonistes de TLR7 chez les souris immunocompétentes, sont des anticorps commun du laboratoire. Ils ont été achetés pour d'autres projets. Je n'ai donc pas reporté leur prix ici. Cependant, les prix sont donnés à titre indicatif dans l'annexe 5 qui regroupe tous les anticorps utilisés lors de ce projet. Il en va de même pour la DNase et la libérase utilisées.

<b>Détail des souris Hébergées</b>	<b>Détail du prix</b>	<b>Total</b>
Achat des couples	80€ x 6 souris	480€
Hébergement des cages de l'élevage		972€
Commandes de souris C57Bl/6	185 souris x 10€	1850€
Expériences de résistance aux chimiothérapies (figures 11A, B ; 14C, D ; 14E, F)	4 cages x 3€ x 5 semaines x 10 expériences	600€
Expérience de survie (figure 11C)	4 cages x 3€ x 9 semaines x 2 expériences	216€
Expériences avec l'antagoniste de TLR7 (figure 12)	7 cages x 3€ x 5 semaines	105€
Expériences sur les différents agonistes de TLR7 (figure 13)	5 cages x 3€ x 5 semaines x 3 expériences	225€
Expériences sur la réponse immunitaire après stimulation par les agonistes de TLR7 (figure 15)	3 cages x 3€ x 2 semaine x 2 expériences	36€
Expériences sur les effets des différentes doses de CL264 (figure 14A, B)	4 cages x 3€ x 5 semaines x 2 expériences	120€
<b>TOTAL</b>		<b>4604€</b>



### 3- Utilisation des agonistes et antagonistes de TLR7

Les agonistes de TLR7 utilisés sont sensibles aux cycles de congélation et décongélation. Pour la loxoribine, qui n'est vendue que par aliquots de 50mg, après resuspension, elle est aliquotée. Les aliquots une fois congelés peuvent être conservés 6 mois. Pour le CL264, la congélation ou une conservation à 4°C plus de 2 semaines ne sont pas envisageables. Nous avons donc utilisés de petits aliquots de cette agoniste de TLR7. La conservation des antagonistes de TLR7 n'a pas posé de problème. Ils sont conservés à température ambiante avant utilisation. La fraction non utilisée est aliquotée et conservée à -20°C.

<b>Produit</b>	<b>Quantité utilisée</b>	<b>Prix</b>	<b>Total</b>
Loxoribine - 50mg	2	132€	264€
CL264 - 0,5mg	14	81€	1134€
IRS661 - 1µmol	1	125€	125€
ODN ctrl - 1µmol	1	125€	125€
<b>TOTAL</b>			<b>1523€</b>

### 4- Expérience d'immunohistochimie

<b>Produit</b>	<b>Quantité utilisée</b>	<b>Prix</b>	<b>Total</b>
boite de 72 lames	7	18€	126€
Anticorps anti TLR7	4	350€	1400€
Anticorps secondaire	4	200€	800€
Streptavidine HRP	3	150€	450€
<b>TOTAL</b>			<b>2776€</b>

Les autres réactifs permettant le marquage des lames en immunohistochimie sont communs au laboratoire. Ils n'ont donc pas été comptés dans l'évaluation du cout de ce projet.



## 5- Cout total des expériences réalisées

<b>Expérience</b>	<b>Cout</b>
Culture cellulaire	264€
Utilisation des modèles murins	4604€
Utilisation des agonistes et antagonistes de TLR7	1523€
Expérience d'immunohistochimie	2776€
<b>Total</b>	<b>9167€</b>



## ANNEXE 2 : Marquage en Immunohistochimie de TLR7:

Sécher les lames

→30min à 37°C

Déparaffinage : bains successifs de xylène puis d'éthanol (100%, 90%, 70%, 50%) et enfin d'eau distillée

→5 min à température ambiante chacun.

Démasquage : citrate pH6 (acide citrique 0.1M 4.5mL + citrate 0.1M 20.5mL +225mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ajuster à pH 6)

→30' à 97°C au bain marie

Laisser refroidir 30'

Un lavage en TBS

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (eau oxygénée stabilisée 3%; 10 volumes)

→15min à température ambiante

Un lavage en TBS

Sérum Humain 5%

→30 min à température ambiante

Un lavage en TBS

200µl/lame d'anti TLR7 dilution au 1/50<sup>ème</sup> soit 0,5µg/mL dans la solution verte Dako real, antibody diluent pour les anticorps non couplé

→1h à température ambiante

Lavages en TBS 0,04% tween (2 lavages de 5min)

Anticorps secondaire : 200µL par lame de donkey anti rabbit dilution en TBS1X au 1/200<sup>ème</sup>

→30 min à température ambiante

Lavages en TBS 0,04% tween (2 lavages de 5min)

Streptavidine : 200µl par lame de Streptavidin-HRP dilution en TBS1X au 1/300<sup>ème</sup>

→30 min à température ambiante

Lavages en TBS 0,04% tween (2 lavages de 5min)

1 lavage en TBS. Laisser en TBS

Révélation :

- AEC (pour arrêter la réaction, remettre les lames en TBS)

1 lavage en eau

Contre coloration 10s en hématoxyline

1 lavage en eau

Montage en glycergel (préalablement chauffé à 70°C au bain marie).



### **ANNEXE 3 : Marquage pour la cytométrie en flux des populations immunitaires dans les ganglions drainants et les tumeurs**

Les organes sont récupérés, dilacérés et placés dans 500µL de PBS 1X avec 16µL soit XXXUI de DNase et 5µL soit XXXUI de libérase.

→30 min à 37°C

Passage sur membrane de 70µm et rinçage avec 5mL de PBS-5%SVF-50mM d'EDTA.  
Centrifugation 10min à 1200rpm

Élimination du surnageant.

Pour les ganglions, les cellules du culot sont directement déposées en plaques 96 puits à fonds conique pour faire le marquage.

Pour les cellules de la tumeur :

Resuspension des cellules dans 6mL de PBS 1X et dépôt sur 3mL de FICOLL.

Centrifugation 20min à 2000rpm avec accélérateur et frein au minimum

Récupération de l'anneau de cellules mononuclées, lavage dans 40mL de PBS et centrifugation 10min à 1200rpm.

Élimination du surnageant.

Les cellules mononuclées sont déposées en plaques 96 puits à fonds conique pour faire le marquage.

Pour tous les types de cellules :

Saturation :

Centrifugation de la plaque 2min à 1600rpm, élimination du surnageant.

Incubation 20min dans 50µL de 2.4G2 (voir annexe 5 sur les anticorps) à 1µg/mL, dilué dans du PBS-5%SVF-50mM d'EDTA, à 4°C.

Anticorps :

Centrifugation de la plaque 2min à 1600rpm, élimination du surnageant.

Les mix d'anticorps sont ajoutés à raison de 50µL par puits d'anticorps dilués dans du PBS-5%SVF-50mM d'EDTA (voir annexe 5 sur les anticorps pour les dilutions et mix d'anticorps utilisés)

Ajout de 100µL de PBS-5%SVF-50mM d'EDTA pour le lavage.

Centrifugation de la plaque 2min à 1600rpm, élimination du surnageant.

Ajout de 100µL de PBS-5%SVF-50mM d'EDTA pour le lavage.

Centrifugation de la plaque 2min à 1600rpm, élimination du surnageant.

Reprise du culot dans 100µL de PBS 1X-0,5% PFA

Passage dans des tubes de 5mL à hémolyse

Ajout de 300µL de PBS 1X-0,5% PFA pour passage au FACS, LSR Fortessa



## ANNEXE 4 : Anticorps et enzymes utilisées

### 1- Anticorps

Antigène reconnu	Couplage	Clone	Dilution	Isotype	Fournisseur	Référence	Prix (€)
<b>Anticorps pour marquage par immunohistochimie</b>							
TLR7	non couplé	/	1/100	polyclonal de lapin	Enzo lifescience	ALX-210-874	350
Ane anti lapin (anti-TLR7)	biotine	/	1/200	Polyclonal d'âne	Jackson Immuno Research	711-066-152	200
Streptavidin	HRP	/	1/300	/	Dako	P0397	200
<b>Anticorps utilisés en cytométrie en flux</b>							
<b>MIX 1 : populations myeloïdes</b>							
CD45	PECy7	30-F11	1/100	rat IgG2bκ	ebioscience	24-0451-82	151
CD11b	eFluor450	M1/70	1/100	rat IgG2b	ebioscience	48-0112-83	194
CD11c	PE	N418	1/100	hamster IgG	ebioscience	12-0114-83	160
F4/80	AlexaFluor 700	A1-3	1/100	rat IgG2	Abd Serotec	MCA497A70 0T	100
CMH II	FITC	M5/114.1 5.2	1/100	rat IgG2bκ	Biolegend	107606	274
CD86	APC	B7-2	1/100	rat IgG2a	ebioscience	17-0862-82	228
Gr1	PerCP Cy5.5	RB6-8C5	1/100	rat IgG2b	ebioscience	45-5931-82	253
<b>MIX 2 : populations lymphoïdes</b>							
CD45	PE	30-F11	1/100	rat IgG2bκ	ebioscience	12-0451-83	150
CD19	APC	1D3	1/100	rat IgG2a	ebioscience	17-0193-83	245
CD3	APC eFluor 780	17A2	1/100	rat IgG2bκ	ebioscience	47-0032-82	202
CD4	PE Texas Red	RM4-5	1/100	rat IgG2a	Caltag	MCD0417	450
CD8	Alexa Fluor700	53-6.7	1/100	rat IgG2aκ	ebioscience	56-0081-82	185
CD69	PE Cy7	H1.2F3	1/100	hamster IgG	ebioscience	25-0691-82	151
<b>Anticorps de saturation</b>							
CD16/CD32	non couplé	2.4G2	1/100	rat IgG2bκ	Production au laboratoire par culture de l'hybridome		/

### 2- Enzymes

Nom	N° EC	Quantité, en mg	Concentration finale (Wunch U/mL)	Dilution	Fournisseur	Référence	Prix
DNase I	3.1.21.1	100mg	20	1/100	Roche diagnostics	112849320 001	74,2
Libérase TM research grade	3.4.24.3	10mg	16,7	1/100	Roche diagnostics	054011190 01	69,4



## **ANNEXE 5 : Milieux de culture utilisés et culture des lignées cellulaires**

Pour les cellules LL/2 : passage au 1/10 deux fois par semaine, cellules adhérentes.

Pour une flasque T125, le milieu est aspiré, le tapis cellulaire est rincé avec 10mL de PBS 1X. Les cellules sont décollées avec 2mL de trypsine laissée 3min à 37°C. 8mL de milieu complet de culture sont ajoutés pour arrêter l'action de la trypsine. 1,5mL de cette suspension est reprise dans 13,5mL de milieu complet et ajouter à une nouvelle flasque de 125mL.

Milieu de culture : DMEM (Gibco) + 10% SVF + 1% pénicilline streptomycine

Pour les cellules A549 : passage au 1/10 deux fois par semaine, cellules adhérentes.

Pour une flasque T125, le milieu est aspiré, le tapis cellulaire est rincé avec 10mL de PBS 1X. Les cellules sont décollées avec 2mL de trypsine laissée 3min à 37°C. 8mL de milieu complet de culture sont ajoutés pour arrêter l'action de la trypsine. 1,5mL de cette suspension est reprise dans 13,5mL de milieu complet et ajouter à une nouvelle flasque de 125mL.

Milieu de culture : DMEM-F12 + 10% SVF + 1% pénicilline streptomycine + 1% glutamine + 1% HEPES + 1% pyruvate + 1% acides aminés non essentiels



## **Progression tumorale et résistance à la chimiothérapie induites par la stimulation de TLR7 dans le cancer du poumon non à petites cellules.**

---

### **RESUME**

70% des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules présentent sur leurs cellules tumorales une expression de TLR7, un récepteur de l'immunité innée. Sur des lignées cellulaires in vitro, la stimulation de TLR7 induit une augmentation de la croissance tumorales et une résistance à la chimiothérapie. Nous avons étudié in vivo les effets de la stimulation de TLR7 sur des lignées de cellules tumorales ainsi que l'expression de TLR7 sur une cohorte de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules.

Dans deux modèles murins immunodéficients, la stimulation de TLR7 induit une augmentation de la croissance tumorale et une résistance à la chimiothérapie. Dans un modèle murin immunocompétent la stimulation de TLR7 peut soit entraîner une diminution de la croissance tumorale via l'activation des cellules du système immunitaire soit entraîner une augmentation de la croissance tumorale et une résistance à la chimiothérapie, selon la dose d'agoniste de TLR7 utilisée. Sur la cohorte de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules, une forte expression de TLR7 est corrélée avec un mauvais pronostic vital pour les patients.

Ces résultats montrent l'utilisation possible de TLR7 comme marqueur pronostic de la réponse au traitement des patients et d'autres études doivent être menées pour voir si une adaptation des traitements est envisageable en fonction du statut des patients pour TLR7.

Mots clés : TLR7, cancer, système immunitaire, résistance à la chimiothérapie, modèle murin.

## **Tumoral progression and resistance to chemotherapy induced by TLR7 stimulation in non small cell lung carcinoma**

---

### **SUMMARY**

70% of non-small cell lung carcinoma patients have tumoral cells positive for TLR7, a receptor in innate immunity. On in vitro experiments with cell lines, TLR7 induces an increase in tumor cell growth and resistance to chemotherapy. We studied in vivo the effects of TLR7 stimulation on tumor cell lines and the expression of TLR7 on a non-small cell lung carcinoma cohort of patients.

In two immunodeficients murine models, TLR7 stimulation induces an increase in tumor cell growth and resistance to chemotherapy. In an immunocompetent murine model, TLR7 stimulation can lead both to tumor decrease through immune cells stimulation or to an increase in tumor cell growth and resistance to chemotherapy, depending on TLR7 agonist dose. In the non-small cell lung carcinoma cohort of patients, a strong expression of TLR7 on tumor cells is correlated to a bad prognosis survival.

These results show that TLR7 can possibly be used as a predictive marker of patient's response to treatment and other studies might be conduct to study the possible adaptation of treatment according to TLR7 status.

Key words: TLR7, cancer, immune system, resistance to chemotherapy, murine model