

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON I
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE LYON
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2014

THÈSE n° 01-2014

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Travail effectué dans le laboratoire « Anticorps Anticancer »
du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052 – CNRS 5286
Sous la direction de M. Lars Petter JORDHEIM

Soutenu devant le jury interrégional le lundi 20 janvier 2014
Par M^{lle} Cécile BOSSARD
Née le 26 août 1986 à CAEN

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de thèse

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Effet des adipocytes sur la progression tumorale de cellules cancéreuses
d'origine hématopoïétique et rôle de l'adénosine.

JURY

PRESIDENT : M^{me} Christine VINCIGUERRA, PU-PH

MEMBRES : M. Charles DUMONTET, PU-PH
M^{me} Danielle TREILLE RITOUET, MCU-PH
M. Lars Petter JORDHEIM, MCU

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université	M. François-Noël GILLY
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. Germain GILLET
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe LALLE

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTÉ

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Jérôme ETIENNE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : Mme Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
Institut des Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Yves MATILLON
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon
Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA
Directeurs Adjoint : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD

Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA

LISTE DES DÉPARTEMENTS PÉDAGOGIQUES

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALÉNIQUE

· **CHIMIE ANALYTIQUE, GÉNÉRALE, PHYSIQUE ET MINÉRALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr – HDR)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars Petter JORDHEIM (MCU)
Madame Christelle MACHON (AHU)

· **PHARMACIE GALÉNIQUE -COSMÉTOLOGIE**

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

· **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTÉ PUBLIQUE

· **DROIT DE LA SANTÉ**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

· **ÉCONOMIE DE LA SANTÉ**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

· **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

· **HYGIÈNE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

· **DISPOSITIFS MÉDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

· **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITÉ**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)

Monsieur François COMET (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

· **MATHÉMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE SCIENCES DU MÉDICAMENT

· **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

· **CHIMIE THÉRAPEUTIQUE**

Monsieur Roland BARRET (Pr)

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

· **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

· **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINÉTIQUE ET ÉVALUATION DU MÉDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Catherine RIOUFOL (MCU - PH)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

• TOXICOLOGIE

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU – PH)
Madame Léa PAYEN (MCU -HDR)

• PHYSIOLOGIE

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

• PHARMACOLOGIE

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU PAST)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMÉDICALES A

• IMMUNOLOGIE

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU – PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

• HÉMATOLOGIE ET CYTOLOGIE

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

• MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)

· **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MÉDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr - HDR)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMÉDICALES B

· **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLÉCULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Monsieur Benoit DUMONT (AHU)

· **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

· **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr - HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

· **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Emilie BLOND
Madame Christelle MOUCHOUX
Madame Florence RANCHON

· **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Monsieur Eyad AL MOUAZEN 85^{ème} section
Monsieur Boyan GRIGOROV 87^{ème} section
Madame Mylène HONORAT 85^{ème} section
Monsieur Abdalah LAOUINI 85^{ème} section
Madame Marine CROZE 86^{ème} section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Christine VINCIGUERRA,

Vous me faites l'honneur d'assurer la présidence de ce jury de thèse. Recevez l'expression de ma profonde gratitude et soyez assurée de ma sincère considération.

A Monsieur le Professeur Charles DUMONTET,

Vous me faites le grand plaisir d'accepter de juger mon travail. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir permis de travailler dans votre équipe de recherche. Je vous remercie de votre gentillesse et de vos conseils avisés tout au long de mon stage. Recevez l'expression de mon profond respect.

A Madame le Docteur Danielle TREILLE RITOUET,

Je suis ravie de vous compter parmi les membres du jury. Je suis très sensible au fait que vous m'avez transmis votre savoir lors de mon premier stage d'internat et apporté votre soutien par la suite. Veuillez recevoir mes sentiments les meilleurs.

A Monsieur le Docteur Lars Petter JORDHEIM,

Je te remercie de m'avoir proposé ce travail, de m'avoir encadré et de t'être impliqué durant toute cette année, tu as su te rendre extrêmement disponible et tu m'as fait découvrir le domaine de la recherche à ses différents stades, que ce soit la mise en place d'un projet, son application et la réflexion face aux résultats obtenus. Je t'exprime ma profonde considération et ma sympathie.

A mes parents,

Merci de m'avoir toujours soutenue dans ce que j'ai entrepris et de m'avoir donné la confiance dont j'avais besoin pour le réaliser. Je pourrai toujours compter sur vous, merci pour tout.

A mon frère,

Pierre, tu as toujours cru en mon potentiel de biologiste, notamment pour une certaine spécialité qui t'a particulièrement marquée... Ici est écrit ce que j'ai trouvé en cherchant. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite.

A Jérémy,

Je te dédie cette thèse. Tu me connais depuis près de 4 ans et m'apportes toujours ton soutien, ton amour et ton humour. Je t'aime et je suis heureuse de continuer ma vie avec toi.

Au reste de ma famille,

Mamie Jane, tu as toujours cru en tes petits enfants.

Je pense aussi profondément à mon papi Gaston et ma mamie Ray.

Je salue toute la Urli's family : Hélène, Jean-Christophe, Morgane et Simon.

A Marie-Line et Jean-Pierre, merci pour votre gentillesse.

A mes amis de lycée et de fac,

Méli, nous avons partagés d'excellents moments pendant notre adolescence, concerts, road trips, dessins... Bon courage pour la suite, j'attends de voir ton film sur écran!

Anaïs et David, j'ai plein de bons souvenirs avec vous, les voyages au Vietnam et en Bretagne, les fous rires. J'ai hâte de vous revoir enfin.

Mélanie et Hantz, à nos longues conversations et nos nombreuses séances ciné. Vous formez une belle famille. J'ai hâte de vous voir tous les 4.

Agnès, tu me manques beaucoup. Nous avons tellement ri chère binôme. Je te souhaite tout le bonheur du monde.

Je pense aussi à Aurélie et Mathias, Anne-So, Maryse, Emmanuelle, Popo, aux petits rigolos de P1 (Flo, Gaetano, Xav, Alex, Hichem et Marine et Amel), à Camille et ses mangas, Aurélie et Marine, Aurélie, Henri, Marce et Momo.

Aux internes des HCL,

Raphaëlle, toujours le mot pour rire (je regrette de n'avoir pu te côtoyer en stage !) - La 1^{ère} team d'hémato : Cécile, Sabine, Lila, Alex, Benoît et Benjamin, pour l'excellente ambiance en stage - Oriane (nous avons été bébés internes toutes les deux) - Charlotte, Anne-Gaëlle, Juliette, Véronique et Judith, de bons moments en bactério - Julie, Astrid et Julien et l'équipe d'immuno où on rigole bien (avec Pat et Claude !) - Emilie qui nous faisait tant rire en parasito, Lorna, l'équipe du 4^e : Laetitia, Emilie, Vecheak - La nouvelle team d'hémato : Anaëlle, Béa, Vincent et Sofien et bientôt Fanélie - Faten, Zhor et Claire-Lise qui nous ont fait découvrir ce monde - et Tiffanie, Corina, Aristide, Antho, Charlotte.

Aux apprentis chercheurs,

Amélie, ma co-master de l'année, nous avons ouvert pour chercher (et trouver) ensemble au labo. Merci pour ton aide répétée et de m'avoir supportée tout simplement. Je suis fière de ton accomplissement cette année.

A Taghreed, so cute, à Gwen et Stéphanie pour les conversations de filles, Ivana et Juliette les thésardes.

A l'équipe *Anticorps Anticancer* du CRCL,

J'ai fait partie de l'équipe pendant un an et j'ai découvert parmi vous les joies de la recherche. Nous avons passé de très bons moments, merci pour votre aide si précieuse. Merci à Florence et Sébastien les cytométristes, Minh le pro de l'adipo et Kamel. Merci à Anne, Aurore, Doriane, Eva et Emeline pour vos conseils utiles, votre bonne humeur et votre inspiration aux mots croisés !

Au personnel des HCL qui m'a formé durant mon internat : biologistes, techniciens, OP et secrétaires.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTES DES ABRÉVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	8
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	10
1. Adipocytes et cancer	10
1.1. Tissu adipeux.....	10
1.2. Obésité et cancer	11
1.3. Cellules adipeuses et progression tumorale.....	12
1.4. Interactions entre adipocytes associés au cancer et cellules tumorales	17
2. Système adénoenergique et cancer	22
2.1. Généralités sur les nucléosides et les nucléotides.....	22
2.2. Métabolisme de l'adénosine	23
2.3. Concentrations physiologiques de l'adénosine.....	27
2.4. Récepteurs de l'adénosine	27
2.5. Système adénoenergique et progression tumorale	30
PROJET DE RECHERCHE	44
MATÉRIEL ET MÉTHODES	45
1. Réactifs.....	45
2. Conditions de culture cellulaire	45
3. Détection de la prolifération cellulaire par marquage au CFSE.....	46
3.1. Principe.....	46
3.2. Protocole.....	46
3.3. Mise au point et exploitation des données.....	47
4. Détection de la mort cellulaire par marquage au DAPI	49
4.1. Principe.....	49
4.2. Protocole.....	49
4.3. Exploitation des données.....	50
5. Expression génique par extraction d'ARN et RT-PCR quantitative	50
5.1. Principe.....	50
5.2. Protocole.....	50
5.3. Exploitation des données.....	51

6. Expression protéique par cytométrie en flux.....	53
6.1. Principe.....	53
6.2. Protocole.....	53
6.3. Exploitation des données.....	54
7. Activité enzymatique de CD73	54
7.1. Principe.....	54
7.2. Protocole.....	54
7.3. Exploitations des données	55
8. Détection de la phosphorylation d'ERK-1/2 par cytométrie en flux.....	55
8.1. Principe.....	55
8.2. Protocole.....	55
8.3. Exploitation des données.....	56
9. Traitement des données et analyses statistiques.....	56
RÉSULTATS	57
1. Effet des adipocytes sur la progression des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.....	57
1.1. Effet des pré-adipocytes hMAD	57
1.2. Effet des pré-adipocytes ASC.....	61
1.3. Effet des cellules hMAD différenciées en adipocytes	63
1.4. Effet du milieu conditionné des pré-adipocytes hMAD	65
2. Expression des molécules CD39, CD73, ADK, AdoR et ENT1	66
2.1. Expressions génique et protéique	66
2.2. Activité enzymatique de CD73.....	68
3. Evaluation du rôle de l'adénosine dans l'interaction entre pré-adipocytes et cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique	69
3.1. Prolifération cellulaire.....	69
3.2. Mort cellulaire	71
3.3. Activation des récepteurs de l'adénosine	72
4. Effet de l'adénosine sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.....	73
4.1. Prolifération cellulaire.....	73
4.2. Mort cellulaire	75
4.3. Approche du mécanisme cytotatique de l'adénosine	76
DISCUSSION.....	79
1. Les adipocytes favorisent la prolifération et la survie des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.....	79

2. Expression des molécules de la voie adénoenergique	80
3. Rôle de l'adénosine dans l'effet prolifératif et protecteur des pré-adipocytes.....	82
3.1. La modulation de l'activité CD73 des pré-adipocytes modifie la prolifération et la mort des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.....	82
3.2. Les pré-adipocytes n'activent pas les récepteurs de l'adénosine dans nos conditions.	83
4. L'adénosine ralentit la prolifération et induit la mort des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.....	84
5. Conclusion de la discussion	87
CONCLUSIONS	89
BIBLIOGRAPHIE.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Interaction entre un stroma médullaire reconstitué et des cellules leucémiques, observée par microscopie électronique à balayage.....	15
Figure 2.	Interactions potentielles entre AAC et cellules cancéreuses favorisant la progression tumorale.....	18
Figure 3.	Structure générale des nucléosides et nucléotides (exemple de l'adénosine). ..	22
Figure 4.	Métabolisme de l'adénosine.....	23
Figure 5.	Structures conformationnelles de l'enzyme ecto-5'-nucléotidase humaine obtenues par cristallographie.	24
Figure 6.	Système adénosinergique.	29
Figure 7.	Voies de signalisation des récepteurs de l'adénosine.	29
Figure 8.	Effet de l'hypoxie sur le métabolisme de l'adénosine.	31
Figure 9.	Rôle de l'adénosine dans la progression tumorale des cancers solides..	36
Figure 10.	Structure de l'APCP.....	40
Figure 11.	Structure générique des dérivés de l'antraquinone.....	41
Figure 12.	Structure sulfonamide.....	41
Figure 13.	Schéma de la co-culture des cellules onco-hématologiques et des adipocytes dans un puits.....	46
Figure 14.	Exemple d'analyse CFSE.....	47
Figure 15.	Exemple d'histogramme de CFSE à plusieurs pics.....	48
Figure 16.	Superpositions de plusieurs histogrammes de CFSE.....	48
Figure 17.	Exemple d'analyse DAPI.....	49
Figure 18.	Courbes de fusion et courbes de dérivées primaires d'un couple d'amorces pour différents échantillons (exemple de CD73).....	52
Figure 19.	Effet des pré-adipocytes hMAD sur la prolifération cellulaire en présence de 10 % de SVF.	58
Figure 20.	Effet des pré-adipocytes hMAD sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF.	59
Figure 21.	Effet des pré-adipocytes hMAD sur la mort cellulaire en présence de 10 % de SVF.	60
Figure 22.	Effet des pré-adipocytes hMAD sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF.....	60
Figure 23.	Effet des pré-adipocytes ASC sur la prolifération cellulaire dans un milieu enrichi.....	61

Figure 24. Effet des pré-adipocytes ASC sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF.....	62
Figure 25. Effet des pré-adipocytes ASC sur la mort cellulaire dans un milieu enrichi. ...	62
Figure 26. Effet des pré-adipocytes ASC sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF.	63
Figure 27. Effet des adipocytes hMAD différenciées sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF.	64
Figure 28. Effet des adipocytes hMAD différenciés sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF.	64
Figure 29. Effet du milieu conditionné de pré-adipocytes hMAD sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF.....	65
Figure 30. Effet du milieu conditionné de pré-adipocytes hMAD sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF.	65
Figure 31. Expression protéique de CD39, CD73 et des récepteurs de l'adénosine.	67
Figure 32. Activité enzymatique de CD73.	69
Figure 33. Effet de l'inhibition de l'activité CD73 sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF.	70
Figure 34. Effet de la stimulation de l'activité CD73 sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF.	71
Figure 35. Effet de la stimulation de l'activité CD73 sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF.	72
Figure 36. Effet du milieu conditionné des cellules hMAD sur la phosphorylation d'ERK-1/2.	73
Figure 37. Effet de l'adénosine sur la prolifération cellulaire.	74
Figure 38. Effet de l'adénosine en présence de DCF sur la prolifération cellulaire.	75
Figure 39. Effet de l'adénosine sur la mort cellulaire.	76
Figure 40. Effet du dipyridamole sur la prolifération cellulaire.	77
Figure 41. Effet de l'adénosine en présence de dipyridamole sur la prolifération cellulaire.	78
Figure 42. Schéma du modèle d'étude in vitro de l'effet cellulaire de l'adénosine.	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Publications scientifiques étudiant l'effet des adipocytes sur la progression tumorale du cancer du sein.....	13
Tableau 2. Publications scientifiques étudiant l'effet des adipocytes sur la progression tumorale de cancers d'origine hématopoïétique.....	16
Tableau 3. Distribution tissulaire des récepteurs de l'adénosine.....	28
Tableau 4. Origines et milieux de culture des lignées cellulaires.....	45
Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative des gènes cibles....	51
Tableau 6. Anticorps et conditions utilisés pour l'étude par cytométrie en flux.	53
Tableau 7. Niveaux d'expression relatifs des gènes des enzymes CD39, CD73 et ADK, des récepteurs de l'adénosine et de ENT1.	66

LISTES DES ABRÉVIATIONS

AAC	Adipocytes associés au cancer
ADA	Adénosine désaminase
ADK	Adénosine kinase
AdoR	Récepteur de l'adénosine
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
AMP	Adénosine-5'-monophosphate
AMPC	Adénosine-5'-diphosphate cyclique
APCP	α,β -méthylène adénosine-5'-diphosphate
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CM	<i>Conditioned medium</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DCF	2'-désoxycoformycine
ENT	<i>Equilibrative nucleoside transporter</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
LAL	Leucémie aigüe lymphoblastique
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

INTRODUCTION

Les tumeurs cancéreuses sont composées du parenchyme tumoral et du stroma tumoral. Les cellules parenchymateuses représentent la fraction proliférative alors que le stroma se compose de cellules conjonctives telles que les fibroblastes, macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques et adipocytes ainsi que d'une matrice extracellulaire, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de nerfs.

Les altérations génétiques oncogéniques des cellules néoplasiques sont nécessaires au processus de tumorigenèse mais ne sont pas suffisantes. En effet, le microenvironnement tumoral possède des rôles de nutrition et de soutien essentiels à l'extension tumorale (1). Il existe ainsi une interaction complexe entre les cellules cancéreuses, les cellules saines et la matrice extracellulaire. Une meilleure compréhension de cet écosystème est utile à l'élaboration de stratégies thérapeutiques complétant la chimiothérapie classique.

L'étude du microenvironnement tumoral a beaucoup progressé au cours de la dernière décennie. Plusieurs recherches ont notamment souligné l'importance des adipocytes péri-tumoraux qui représentent le composant majoritaire du microenvironnement de certaines tumeurs (2). Ces adipocytes produisent des molécules agissant sur la progression tumorale, cependant la nature des échanges métaboliques entre les adipocytes et les cellules tumorales n'est pas bien caractérisée (2).

Par ailleurs, l'adénosine est une molécule abondante dans le microenvironnement tumoral qui est profusément étudiée au niveau cellulaire. Elle possède une action pro-tumorale et immunosuppressive sur plusieurs cancers solides (3), mais son rôle dans un milieu plus complexe tel que le microenvironnement tumoral reste mal connu.

Dans le cadre d'un Master 2 Recherche et d'études complémentaires lors de mon « année-recherche », nous avons émis l'hypothèse que l'adénosine pouvait être un médiateur de l'interaction hétérotypique entre les adipocytes et les cellules cancéreuses puisque les adipocytes en produisent par leur enzyme ecto-5'-nucléotidase (4). Nous avons travaillé sur des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique sachant que les adipocytes sont le principal constituant de la moelle osseuse où prolifèrent nombre de ces cancers.

Ainsi, sur la base des données présentées dans le rappel bibliographique et des axes de recherche développés dans le laboratoire d'accueil, le projet de ce mémoire de diplôme d'études spécialisées en biologie médicale correspond à l'étude *in vitro* de l'effet des adipocytes sur la prolifération et la survie de cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique et à l'évaluation du rôle de l'adénosine dans ces phénomènes.

D'abord, la synthèse bibliographique traitera du rôle des adipocytes et de l'adénosine dans le cancer et sera suivie de la présentation du projet de recherche. Ensuite, les matériels et méthodes utilisés et les résultats obtenus seront décrits et mèneront à une discussion sur le travail effectué et une conclusion générale.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

En premier lieu, un rappel succinct sur le tissu adipeux sera énoncé, auquel fera suite un état des lieux des études de l'interaction entre les adipocytes et les cellules cancéreuses. Nous aborderons ensuite la thématique de l'adénosine et son implication dans la progression tumorale. Cette synthèse bibliographique se limitera à l'effet direct de ces deux éléments sur les cellules cancéreuses ; leur rôle dans l'immunité anti-tumorale n'étant volontairement pas développé.

1. Adipocytes et cancer

1.1. Tissu adipeux

Il existe deux types de tissus adipeux qui diffèrent par leur constitution cellulaire.

1.1.1. Tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est majoritaire chez l'adulte et représente 15 à 20 % du poids. Il se compose d'adipocytes blancs entourés de leurs précurseurs nommés pré-adipocytes, de cellules immunitaires, de fibroblastes et de cellules endothéliales. Les adipocytes blancs sont sphériques et présentent un diamètre d'une centaine de micromètres. Ils renferment une vésicule lipidique volumineuse composée de triglycérides et comportent une mince couronne cytoplasmique. Ces cellules sont groupées en polyèdres dans le tissu adipeux blanc ou bien isolées au sein du tissu conjonctif lâche et de la moelle osseuse.

Le tissu adipeux blanc se localise principalement au niveau sous-cutané chez le nouveau-né, des épaules et de la nuque chez l'homme, et de la poitrine, des hanches, des cuisses et des fesses chez la femme. Il y joue un rôle de réserve énergétique par sa capacité à synthétiser, stocker et libérer des lipides et joue un rôle de soutien et de protection mécanique au niveau des paumes de mains, des orbites et de la plante des pieds. Enfin, ce tissu présente une fonction endocrine par sécrétion de diverses molécules.

1.1.2. Tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun existe en grande quantité chez les mammifères hibernants. Chez l'homme, il est abondant chez le nouveau-né et disparaît ensuite au cours de la vie. Il est constitué d'adipocytes bruns qui présentent un noyau central et un cytoplasme rempli de petites vacuoles lipidiques et de mitochondries d'où provient leur coloration brune.

Ce tissu est situé aux abords des vaisseaux sanguins où il libère la chaleur produite par thermogenèse, après oxydation mitochondriale des acides gras, à travers tout l'organisme.

1.1.3. Tissu adipeux médullaire

Les cavités médullaires des nouveau-nés sont essentiellement constituées d'éléments hématopoïétiques assurant l'hématopoïèse néonatale et dénuées de graisse. Le nombre d'adipocytes intra-médullaires augmente ensuite au cours de la vie jusqu'à occuper environ 70 % de la cavité chez les personnes âgées. Le rôle des adipocytes médullaires n'est pas complètement défini. Pour certains auteurs, leur activité endocrine est impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse et de l'ostéogenèse (5). Les pré-adipocytes sécrèteraient des facteurs de croissance et des cytokines régulant la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques et produiraient des composés de la matrice extracellulaire nécessaires à l'adhésion cellulaire. Les adipocytes matures joueraient quant à eux un rôle dans la différenciation terminale des cellules hématopoïétiques (5).

1.2. Obésité et cancer

L'obésité est définie comme l'état d'un individu présentant un excès de tissu adipeux au niveau de l'organisme avec un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg/m².

Les prévalences de l'obésité et du cancer ont augmenté de manière importante dans les dernières décennies et il est maintenant établi que l'obésité est un facteur de risque de cancers solides et hématopoïétiques (6, 7). Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié en 2002 un rapport indiquant que l'excès de poids et l'inactivité physique sont des facteurs de risque de différents cancers et que le contrôle de la prise de poids est une mesure de prévention incontestable (8). L'obésité est également un facteur de mauvais pronostic dans le cancer, étant corrélée au risque de progression tumorale, de mortalité par cancer et de résistance aux traitements (9, 10, 11). Une importante étude prospective américaine a montré que l'obésité serait la cause d'environ 14 % des décès par cancer chez l'homme et 20 % chez la femme de plus de 50 ans (9).

Ainsi, le tissu adipeux paraît impliqué dans la carcinogenèse, la progression tumorale et la réponse aux traitements. Dans le cadre de mon travail, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'effet des adipocytes sur la progression tumorale.

1.3. Cellules adipeuses et progression tumorale

Au niveau cellulaire, les adipocytes représentent une population importante du microenvironnement tumoral de plusieurs cancers comme le cancer du sein, le mélanome et les cancers d'origine hématopoïétique. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* récentes ont abordé le rôle des adipocytes dans la progression tumorale.

Le cancer du sein est le plus fréquemment étudié (Tableau 1, pages suivantes). Il a été démontré dans un modèle murin que des pré-adipocytes fluorescents injectés par voie sous-cutanée migrent au niveau de la tumeur mammaire et s'y greffent (12). Les cellules adipeuses, après interaction avec les cellules tumorales, favorisent la survie, la croissance et la migration de celles-ci (13, 14).

La croissance d'autres cancers solides est également influencée par les cellules adipeuses. En effet, la prolifération *in vitro* de cellules de cancer du colon (CACO-2, T84 et HT29) est favorisée par différentes cellules adipeuses (tissu adipeux, pré-adipocytes et adipocytes murins) dans un système de co-culture 3D (22). Par ailleurs, l'injection quotidienne pendant 6 semaines de pré-adipocytes (ASC) chez la souris favorisent la croissance tumorale du sarcome de Kaposi (KS1767) et du cancer de la prostate (DU145) (12). Les pré-adipocytes favorisent également la croissance et la survie de cellules de cancer du poumon (H460) et de glioblastome (U87MG) *in vivo* chez la souris et *in vitro* en co-culture (23).

Tableau 1. Publications scientifiques étudiant l'effet des adipocytes sur la progression tumorale du cancer du sein.

Etude	Type	Objectif	Méthode	Résultats et conclusion
Yamaguchi <i>et al.</i> , 2008 (15)	Histologie	Evaluation de l'impact pronostic de l'invasion tumorale du tissu adipeux (ATI)	- Analyse rétrospective : 310 patients à carcinome canalaire infiltrant (237 ATI +, 64 ATI -) - Corrélation entre histologie (ATI) et survie sans progression à 5 ou 10 ans	- Survie sans progression à 10 ans : 76 % ATI +, 94 % ATI - → Invasion tumorale du tissu adipeux de mauvais pronostic.
Elliott <i>et al.</i> , 1992 (16)	<i>In vivo</i>	Evaluation de la capacité du tissu adipeux à favoriser la croissance tumorale	- Co-injection sous-cutanée chez la souris de cellules murines de cancer du sein (SPI) et de graisse d'origine mammaire ou ovarienne - Mesure de la taille de la tumeur	→ Stimulation de la croissance tumorale par un environnement riche en adipocytes
Iyengar <i>et al.</i> , 2003 (17)		Evaluation de la capacité des adipocytes à favoriser la croissance et l'invasivité tumorale	- Co-injection chez la souris de cellules humaines de cancer du sein invasif (SUM159PT) fluorescentes et d'adipocytes murins (3T3L1) - Mesure de la taille de la tumeur	- Tumeur plus grosse en présence d'adipocytes par rapport aux contrôles (fibroblastes, aucunes cellules) - Présence de cellules tumorales dans les poumons avec les adipocytes → Stimulation de la croissance et de l'invasivité tumorale par les adipocytes
Manabe <i>et al.</i> , 2003 (18)	<i>In vitro</i>	Evaluation de la capacité des adipocytes à favoriser la croissance tumorale	- Co-culture 3D en gel de collagène de cellules de cancer du sein (MCF-7, ZR75-1, T-47D) et d'adipocytes ou de pré-adipocytes murins pendant 7 jours - Mesure de la prolifération tumorale : incorporation de bromodésoxyuridine dans l'ADN (immunohistochimie) - Mesure de l'apoptose : corps apoptotiques (histochimie), ADN fragmenté (méthode TUNEL) - Mesure de l'adhésion : expression d'E-cadhérine (immunomarquage)	→ Stimulation de la croissance tumorale par les adipocytes matures - Absence d'effet sur l'apoptose → Stimulation de l'adhésion des cellules tumorales par les pré-adipocytes

Etude	Type	Objectif	Méthode	Résultats et conclusion
Trivanovic <i>et al.</i> , 2013 (19)	<i>In vitro</i>	Evaluation de la capacité des pré-adipocytes à favoriser la croissance tumorale	- Co-culture directe et en système Transwell® de cellules de cancer du sein (MCF-7) et de pré-adipocytes humains	→ Stimulation de la croissance tumorale par les pré-adipocytes
Dirat <i>et al.</i> , 2011 (20)		Evaluation de la capacité des adipocytes à favoriser l'apparition de métastases pulmonaires	- Injection intraveineuse chez la souris de cellules de cancer du sein (4T1) préalablement co-cultivées avec des adipocytes matures pendant 4 jours	- Augmentation du nombre de nodules pulmonaires quand il y a eu co-culture préalable → Stimulation de l'invasivité tumorale par l'interaction entre les adipocytes et les cellules cancéreuses
		Evaluation de la capacité des adipocytes à favoriser l'invasivité tumorale	- Co-culture en système Transwell® de cellules de cancer du sein (ZR 75-1, SUM159PT, 67NR, 4T1) et d'adipocytes matures, de pré-adipocytes murins ou humains, de milieu conditionné d'adipocytes seuls ou d'adipocytes associés au cancer pendant 3 jours - Test d'invasivité en chambre Matrigel®	- Augmentation de l'invasion tumorale en présence d'adipocytes matures et de milieu conditionné d'adipocytes associés au cancer - Modification de la morphologie des adipocytes (délipidation) en co-culture → Stimulation de l'invasivité tumorale par l'interaction entre les adipocytes et les cellules cancéreuses via des molécules solubles
		Iyengar <i>et al.</i> , 2003 (17)	Evaluation de l'activation de programmes transcriptionnels de cellules tumorales par les adipocytes	- Analyse de l'expression génique de cellules de cancer du sein (MCF-7) en présence de milieu conditionné d'adipocytes par microarray puis test luciférase sur une sélection de gènes
Zhao <i>et al.</i> , 2010 (21)		Evaluation du profil d'expression génique des pré-adipocytes mammaires	- Analyse de l'expression génique par hybridation	→ Surexpression de gènes impliqués dans la croissance, le remodelage matriciel et l'angiogenèse dans les pré-adipocytes mammaires par rapport aux cellules souches de la moelle osseuse

Un rôle pro-tumoral des adipocytes ou de leurs précurseurs dans différents types de cancers est donc décrit depuis plusieurs années. Ce phénomène ne se limiterait pas seulement aux tumeurs solides, mais pourrait concerner aussi les cancers hématopoïétiques. Or, le rôle des adipocytes dans leur développement est peu étudié alors que le risque de cancer augmente avec l'âge conjointement au nombre d'adipocytes dans la moelle osseuse où se développent notamment les leucémies (5). Les lymphomes peuvent aussi envahir la moelle osseuse lors d'atteintes secondaires et interagir avec les adipocytes médullaires, ou bien interagir avec les adipocytes du tissu conjonctif de ganglions lymphatiques. Il a été démontré par microscopie électronique, après reconstitution d'un stroma médullaire, que des cellules de leucémie aigüe lymphoïde B (LAL-B) interagissent avec les cellules stromales et s'y relient par des fibres (24). Ce stroma, indispensable à la survie en culture primaire des lymphoblastes B, comporte particulièrement des adipocytes et des macrophages (Figure 1) (24).

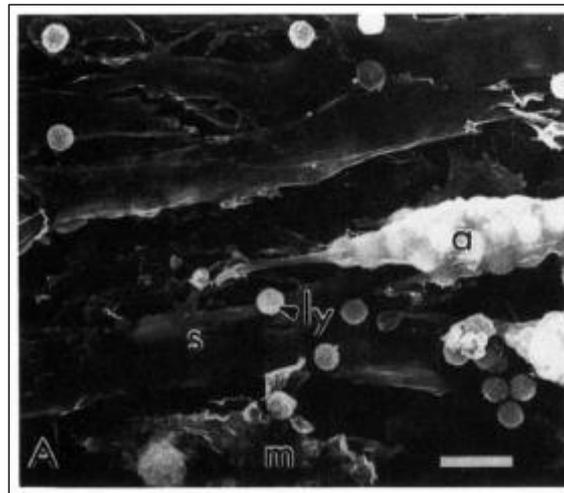


Figure 1. Interaction entre un stroma médullaire reconstitué et des cellules leucémiques, observée par microscopie électronique à balayage. D'après Manabe *et al.*, 1994 (24). a : adipocytes; s : cellules stromales; m : macrophages; ly : lymphoblastes.

L'effet des adipocytes sur la progression tumorale de cancers d'origine hématopoïétique a été étudié par plusieurs équipes de recherche (Tableau 2).

Tableau 2. Publications scientifiques étudiant l'effet des adipocytes sur la progression tumorale de cancers d'origine hématopoïétique.

Etude	Type	Objectif	Méthode	Résultats
Pramanik <i>et al.</i> , 2012 (25)	<i>In vivo</i>	Evaluation de la migration de cellules leucémiques au niveau du tissu adipeux	<ul style="list-style-type: none"> - Injection chez la souris obèse de cellules de LAL pré-B GFP+ (8093) - Analyse par cytométrie en flux des cellules cancéreuses dans différents tissus (moelle osseuse, rate, foie, tissus adipeux) 	<ul style="list-style-type: none"> - Les cellules leucémiques migrent sous 10 jours dans les tissus adipeux - Mise en évidence de ce phénomène de migration <i>in vitro</i>
		Evaluation de la capacité des adipocytes à favoriser la migration de cellules leucémiques	- Test de migration en système Transwell® de cellules de LAL pré-B GFP+ (8093) vers des adipocytes, des pré-adipocytes (3T3-L1, OP-9) ou leurs milieux conditionnés respectifs	<ul style="list-style-type: none"> - Mise en évidence du rôle de CXCL12 → Stimulation de la migration tumorale par les adipocytes
Caers <i>et al.</i> , 2007 (26)	<i>In vitro</i>	Evaluation de la capacité des adipocytes médullaires à favoriser la croissance et la migration de cellules myélomateuses	<ul style="list-style-type: none"> - Co-culture de cellules myélomateuses (5T33MMvv, MMS-1) et d'adipocytes médullaires murins (14F1.1) ou humains primaires - Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN (radioactivité) - Mesure de l'apoptose par détection de la caspase 3 (cytométrie en flux) - Test de migration en système Transwell® 	→ Stimulation de la croissance et de la migration tumorale et protection contre l'apoptose par les adipocytes au stade initial du myélome multiple
Behan <i>et al.</i> , 2009 (27)		Evaluation de la capacité des adipocytes à favoriser la résistance au traitement des cellules leucémiques	<ul style="list-style-type: none"> - Co-culture en système Transwell® de cellules leucémiques (8093, SD1, RS411, BV173) et d'adipocytes (3T3-L1, OP-9) - Mesure de la viabilité après 72h de traitement par vincristine, dexaméthasone, daunorubicine ou nilotinib 	→ Augmentation de la résistance aux traitements des cellules leucémiques en présence d'adipocytes

1.4. Interactions entre adipocytes associés au cancer et cellules tumorales

1.4.1. Adipocytes associés au cancer

L'expansion pathologique de tissu adipeux modifie les fonctions énergétiques et endocrines des adipocytes, limite l'angiogenèse et favorise l'hypoxie et la fibrose. Dans ces conditions, les adipocytes secrètent notamment des facteurs mitogènes et pro-inflammatoires intervenant dans la tumorigenèse, permettant d'expliquer le lien entre obésité et cancer (28, 2).

Quel que soit le statut pondéral d'un individu atteint de cancer, une fois la tumeur développée, les cellules tumorales sont entourées d'un microenvironnement tumoral pouvant être composé notamment d'adipocytes. Ces adipocytes sont usuellement nommés « adipocytes associés au cancer » (AAC) et subissent des modifications phénotypiques et fonctionnelles au contact des cellules tumorales. La principale modification phénotypique correspond à une diminution de l'expression de marqueurs de différenciation tels que la lipase hormono-sensible HSL, la résistine et la protéine liant les acides gras aP2. De plus, les AAC subissent une transformation morphologique de type « fibroblastique » par diminution de leur taille et de leur contenu lipidique (13, 14, 20). Les modifications fonctionnelles des AAC peuvent favoriser leur propre capacité invasive ainsi que celle de la tumeur (29).

Plusieurs études *in vitro* démontrent qu'il existe une interaction hétérotypique bidirectionnelle entre les adipocytes et les cellules cancéreuses via des facteurs solubles au niveau du microenvironnement tumoral ; et plusieurs procédés biologiques ont été proposés (Figure 2). Il peut s'agir de facteurs de croissance, de chimiokines, de cytokines, d'adipokines ou d'autres molécules.

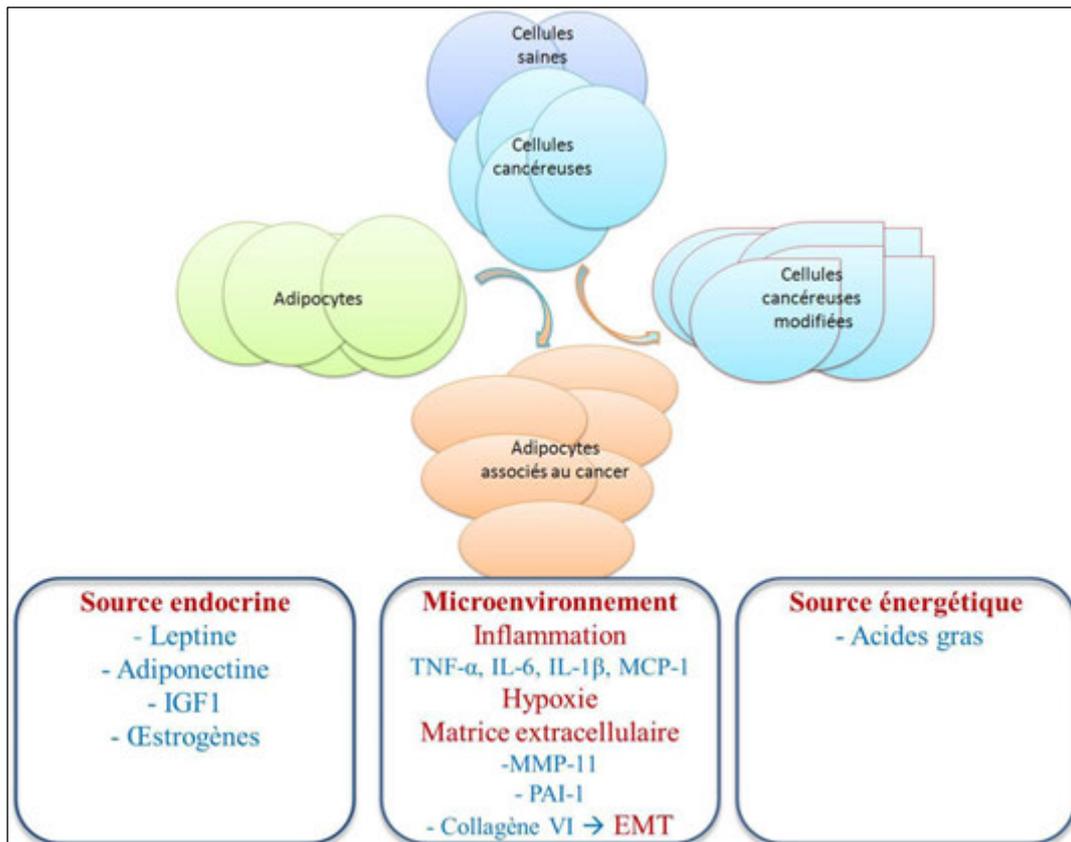


Figure 2. Interactions potentielles entre AAC et cellules cancéreuses favorisant la progression tumorale.

1.4.2. Source endocrine

1.4.2.1. Adipokines

Le tissu adipeux blanc présente une fonction endocrine par synthèse et sécrétion d'une cinquantaine d'hormones polypeptidiques nommées adipokines, la leptine et l'adiponectine étant les plus étudiées (30).

1.4.2.1.1. Leptine

La leptine, codée par le gène *OB*, régule l'appétit en contrôlant les sensations de satiété et de faim au niveau du système nerveux central. Elle agit comme un agent lipostatique en réponse à une augmentation des réserves de matières grasses. Ainsi, sa concentration sérique est directement proportionnelle à la masse adipeuse de l'organisme. Elle influe aussi sur plusieurs axes endocriniens en inhibant la sécrétion du neuropeptide Y.

De nombreuses cellules tumorales surexpriment le récepteur de la leptine OB-R, telles que les cellules de cancer du sein, du pancréas, de l'estomac, du poumon et les cellules leucémiques (2). La leptine présente des propriétés mitogènes, anti-apoptotiques, pro-angiogéniques via le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), et pro-métastatiques dans divers cancers, notamment le cancer du sein (2, 31). Ainsi, des souris

obèses transgéniques n'exprimant pas la leptine ou son récepteur sont résistantes au développement de tumeurs mammaires (32).

En ce qui concerne les cancers hématopoïétiques, les blastes de leucémies aigües myéloïdes et lymphoïdes ainsi que de leucémie myéloïde chronique en acutisation expriment à leur surface le récepteur de la leptine (33), tout comme les cellules myélomateuses (26). Il a été démontré que lorsque ces dernières expriment faiblement plutôt que fortement ce récepteur, le temps de survie sans progression d'un patient est augmenté et la réponse au traitement est meilleure (26). De plus, la leptine protège *in vitro* les blastes de leucémie aigüe promyélocytaire de l'apoptose induite par la chimiothérapie via le récepteur OB-R et favorise la prolifération de leucémies aigües myéloblastiques (34, 35). Par conséquent, la leptine présente probablement un rôle dans la progression tumorale (36).

1.4.2.1.2. Adiponectine

L'adiponectine est l'adipokine la plus abondante et présente des propriétés anti-diabétiques, anti-athérogènes et anti-inflammatoires. Sa concentration sérique est inversement proportionnelle à la masse adipeuse de l'organisme. Elle est proportionnelle aux taux d'incidence de cancers de l'endomètre, du sein, du colon, de l'estomac, du rein et de leucémies, indépendamment de la masse adipeuse (2). Malgré cette corrélation, l'adiponectine peut présenter des effets anti-tumoraux ; par exemple, elle est impliquée dans la réduction tumorale de certains modèles *in vivo* et présente des propriétés cytostatiques et pro-apoptotiques dans le cancer du sein *in vitro* (31). Elle présente parfois un effet pro-tumoral dans d'autres circonstances (2, 37)

Le ratio des concentrations sériques de l'adiponectine et de la leptine pourrait être potentiellement utilisé comme outil pronostic ou de décision thérapeutique dans le cancer du sein (31). Ces données incitent à poursuivre l'étude du rôle de ces hormones dans la progression tumorale.

1.4.2.2. Axe insulinique

Les adipocytes secrètent de l'IGF1 (facteur de croissance insulinique de type 1) qui présente des activités mitogènes, anti-apoptotiques et pro-angiogéniques par modulation du VEGF (38). Le récepteur de l'IGF1 est surexprimé dans les cancers du sein, de la prostate, du colon, du rein, des ovaires, dans le rhabdomyosarcome et dans les cancers hématopoïétiques (39).

1.4.2.3. Hormones stéroïdes

Le tissu adipeux est un site de production d'œstrogènes important chez les femmes ménopausées. En effet, il exprime l'enzyme aromatasase qui convertit les hormones androgènes en œstrogènes impliqués dans les cancers du sein hormono-dépendants. L'activité de l'aromatase est stimulée par la leptine et les cytokines IL-6 et TNF- α produites par les AAC (40). De plus, l'hypersécrétion d'IGF1 inhibe la synthèse de la globuline se liant aux hormones sexuelles (SHBG) ce qui augmente la disponibilité d'œstrogènes libres (2).

1.4.3. Source énergétique

La source bioénergétique la plus importante pour les cellules cancéreuses est la glycolyse (41), et l'oxydation des acides gras libres est une alternative. L'activité lipolytique totale des lipases est plus importante dans le tissu adipeux de patients cancéreux que dans celui de patients sains (2). Cette augmentation de la libération d'acides gras libres par les AAC favorise la croissance de tumeurs ovariennes qui les consomment par β -oxydation mitochondriale (42). Par ailleurs, les acides gras libres sont également pro-inflammatoires (28).

1.4.4. Modulation du microenvironnement tumoral

1.4.4.1. Inflammation et hypoxie

L'inflammation est reconnue comme une caractéristique décisive dans l'initiation et la progression tumorale et dans l'échappement thérapeutique. Elle est favorisée par plusieurs facteurs du microenvironnement tumoral tels que l'hypertrophie cellulaire, l'hypoxie et la fibrose et peut entraîner une dysfonction des adipocytes (2). L'hypoxie elle-même favorise la production de VEGF et de leptine via le facteur HIF1 (facteur induit par l'hypoxie) (28).

Les AAC produisent les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-1 β (20). Ces cytokines permettent le recrutement de cellules immunitaires au niveau de la tumeur et modulent la croissance et l'invasivité tumorale notamment en stimulant la production de VEGF (2). L'IL-6 a un rôle essentiel dans la progression du myélome multiple (7).

Les adipocytes produisent également des chimiokines chimio-attractantes telles que MCP-1 (protéine chimio-attractante des monocytes) qui est impliquée dans le recrutement de macrophages (38) et CXCL-12 qui augmente les capacités migratoires des cellules cancéreuses mammaires et leucémiques en plus de favoriser le recrutement de

macrophages (25, 38, 36). Par ailleurs, la nécrose des AAC active aussi les macrophages (43).

1.4.4.2. Remodelage de la matrice extracellulaire et fibrose

Il existe une dérégulation quantitative et qualitative de la matrice extracellulaire lors de l'expansion ou du dysfonctionnement du tissu adipeux. L'altération de l'organisation structurale de la matrice et l'augmentation de la protéolyse et du turnover de ses composants peuvent favoriser la progression tumorale. Notamment, la migration peut être amorcée par un démasquage de sites cryptiques de molécules pouvant modifier l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (44).

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des enzymes spécialisées dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Elles sont impliquées dans la tumorigenèse et leur surexpression est de mauvais pronostic dans certains cancers (44). Les AAC expriment la MMP-11 qui joue un rôle dans leur dédifférenciation et dans l'acquisition de leur phénotype « fibroblastique » (14). La MMP-11 possède également une activité collagénolytique, particulièrement du collagène de type VI surexprimé par les adipocytes lors de la tumorigenèse (17). Le collagène de type VI clivé agit comme une molécule de signalisation et favorise l'angiogenèse, la fibrose, la prolifération et la survie tumorale (2). Le phénomène de desmoplasie, correspondant à une fibrose péri-tumorale, accompagne certaines tumeurs épithéliales malignes (44).

Les AAC surexpriment également le PAI-1 (inhibiteur de type 1 de l'activateur du plasminogène) qui inhibe l'urokinase. L'urokinase catalyse la conversion du plasminogène en plasmine, qui elle-même dégrade de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire comme la fibrine et les laminines. Ainsi, la présence de PAI-1 augmente la quantité de fibrine qui joue un rôle dans la fibrose. Cependant, le rôle de PAI-1 dans la progression tumorale est assez controversé car il dépend de son niveau d'expression et du type de cancer (20). Il s'agit d'un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (38).

D'autre part, les AAC modifient la conformation de la fibronectine qui joue un rôle clé dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (45).

1.4.5. Rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) nécessaire à la migration intra-tissulaire des cellules cancéreuses peut être favorisée par les AAC. L'expression du marqueur épithélial E-cadhérine par des cellules mélanomateuses co-cultivées avec des

adipocytes est diminuée alors que celle de marqueurs mésenchymateux augmente (46) (20). Ce phénomène est de plus favorisé par le collagène de type VI (2).

En tenant compte de toutes ces informations, il semble que les adipocytes soient capables de sécréter un large éventail de molécules pouvant influencer le comportement des cellules tumorales. Notre hypothèse de travail repose sur l'effet potentiel de l'adénosine produite par les adipocytes sur la progression tumorale. De ce fait, un rappel sur l'adénosine et un exposé de son rôle dans la progression tumorale à l'heure actuelle est nécessaire.

2. Système adénoenergique et cancer

2.1. Généralités sur les nucléosides et les nucléotides

Un nucléoside est une petite molécule organique formée de la combinaison d'un sucre pentose, ribose ou 2'-désoxyribose, avec une base azotée purique ou pyrimidique. Un nucléotide est un nucléoside auquel est fixé un à trois groupements phosphate (Figure 3). Il existe deux nucléobases puriques, l'adénine et la guanine, et trois nucléobases pyrimidiques, la thymine, l'uracile et la cytosine.

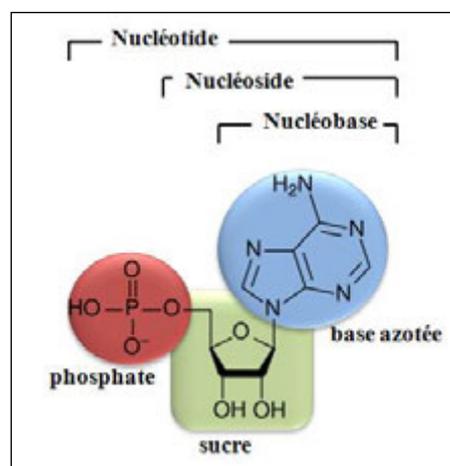


Figure 3. Structure générale des nucléosides et nucléotides (exemple de l'adénosine). D'après Jordheim *et al.*, 2013 (47)

Les nucléosides et les nucléotides sont des constituants essentiels des cellules eucaryotes et procaryotes. Au niveau intracellulaire, ce sont des précurseurs des acides nucléiques entrant dans la composition de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN). Ils présentent aussi un rôle dans la machinerie énergétique et sont des constituants de cofacteurs enzymatiques et de médiateurs métaboliques. Au niveau extracellulaire, le système purinergique correspond à une voie de signalisation de l'ATP

(adénosine-5'-triphosphate) et l'adénosine via leurs récepteurs membranaires (48). Ce rappel bibliographique concerne le système adénoenergique et n'aborde pas le système ATPergique.

2.2. Métabolisme de l'adénosine

L'adénosine est un nucléoside purique endogène ubiquitaire.

2.2.1. Synthèse

La production intracellulaire d'adénosine provient soit de la déphosphorylation de l'AMP (adénosine-5'-monophosphate) par la 5'-nucléotidase cytosolique cN-I, soit du clivage de la S-adénylhomocystéine intracellulaire par la S-adénylhomocystéine hydrolase (SAHH) du cycle de la méthionine.

La production extracellulaire d'adénosine provient de la déphosphorylation de l'AMP par l'ecto-5'-nucléotidase (5'e-NT ou CD73). L'AMP provient quant à elle de l'hydrolyse de l'ATP et de l'ADP (adénosine-5'-diphosphate) par les ecto-nucléotide triphosphate diphosphorylases (ENTPDases), principalement ENTPD1 ou CD39, et les ecto-nucléotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (ENPP). Cette cascade de réactions catalytiques se produit en quelques centaines de millisecondes (Figure 4) (49).

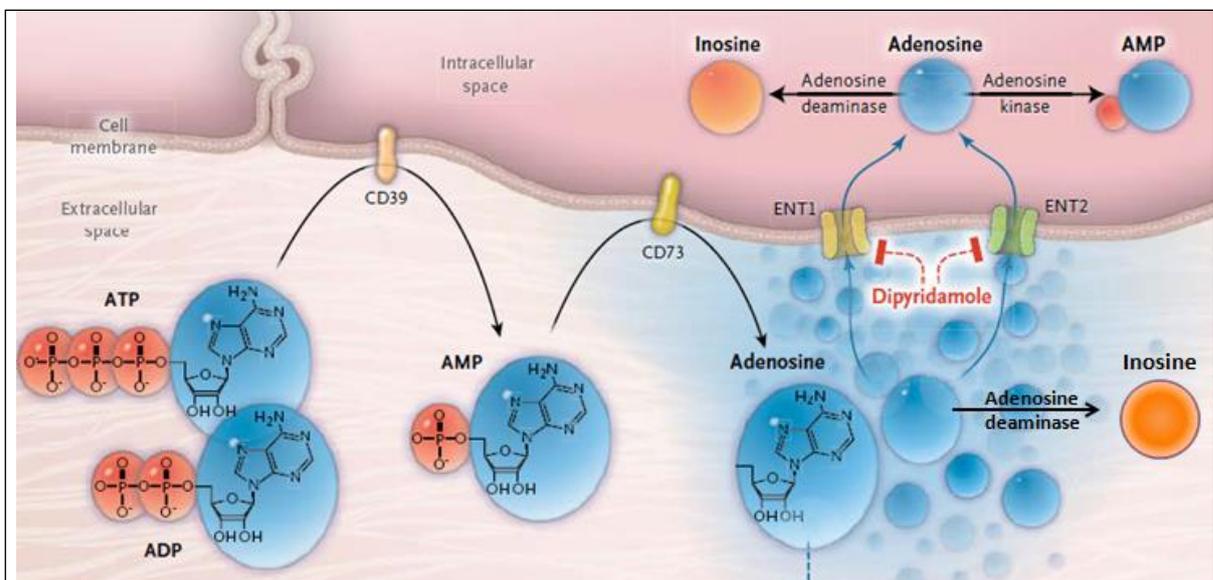


Figure 4. Métabolisme de l'adénosine. D'après Eltzhig *et al.*, 2012 (50)

2.2.1.1. Ecto-nucléotide triphosphate diphosphorylase 1

Les ecto-nucléotide triphosphate diphosphorylases (ENTPDases) correspondent à des enzymes extracellulaires capables d'hydrolyser des nucléotides tri- ou di-phosphatés.

L'enzyme CD39 (ENTPD1), codée par le gène *ENTPD1* et de masse moléculaire d'environ 60 kDa, comporte deux domaines transmembranaires. Le domaine cytoplasmique comporte les extrémités N- et C-terminales de la protéine et le domaine extracellulaire hydrophobe contient le site catalytique de l'enzyme. Le CD39 est constitutivement exprimé dans la rate, le thymus, le poumon, le pancréas, le placenta, par les cellules endothéliales et par certaines cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T régulateurs (51).

Cette enzyme présente un rôle immunosuppresseur par métabolisation de l'ATP pro-inflammatoire et par génération d'adénosine immunosuppressive en cas de co-expression avec l'enzyme CD73. Cette enzyme a également un effet anti-thrombotique par métabolisation de l'ADP plaquettaire et contrôle la migration leucocytaire à travers l'endothélium vers les tissus ischémiques (52).

2.2.1.2. Ecto-5'-nucléotidase

L'ecto-5'-nucléotidase (CD73) est une enzyme extracellulaire qui hydrolyse l'AMP en adénosine de manière irréversible et ne présente pas d'activité envers les nucléosides 2'- et 3'-monophosphates. Il s'agit de l'enzyme limitante de la cascade métabolique extracellulaire ATP – AMP – adénosine.

Cette enzyme, codée par le gène *NT5E*, et de masse moléculaire d'environ 60 kDa, comporte deux sous-unités protéiques liant des cations divalents à leur extrémité N-terminale et se liant à la membrane plasmique à leur extrémité C-terminale par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). La partie C-terminale comporte également la poche de liaison au substrat AMP (53). Cette enzyme présente deux conformations, une ouverte et une fermée dans laquelle le site actif de l'enzyme est fonctionnel (Figure 5).

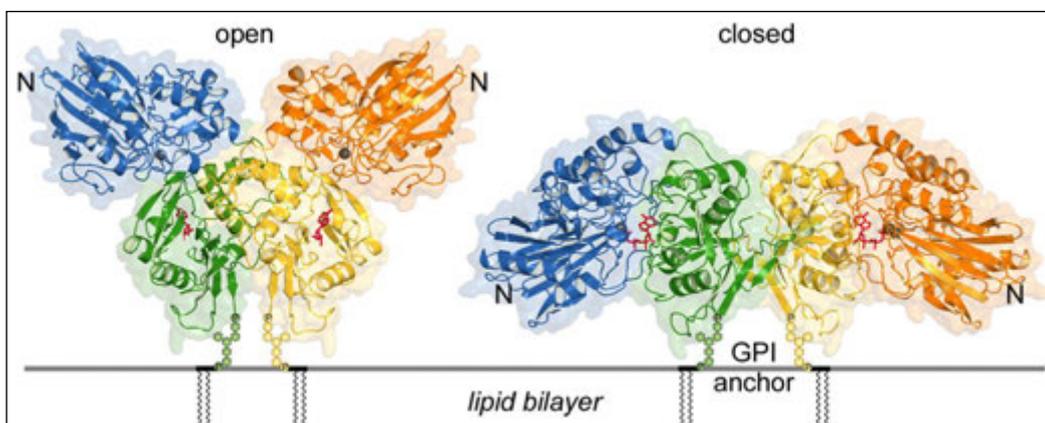


Figure 5. Structures conformationnelles de l'enzyme ecto-5'-nucléotidase humaine obtenues par cristallographie. D'après Knapp *et al.*, 2012 (54). Conformation ouverte (à gauche) et fermée (à droite). N : partie N-terminale. Les cations métalliques sont représentés en gris et les substrats en rouge.

L'enzyme CD73 est exprimée dans de nombreux organes, et notamment à un niveau élevé dans le colon, le cerveau, les reins, le foie, les poumons et le cœur. Elle est également exprimée par les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins de gros calibre, les adipocytes et certains leucocytes (4). Parmi ces derniers, le CD73 est co-exprimé avec le CD39 sur les lymphocytes T régulateurs naturels qui contribuent à la tolérance immunitaire, partiellement grâce à la libération d'adénosine immunosuppressive. Le CD73 est un marqueur de différenciation lymphocytaire (55). Les neutrophiles, érythrocytes et plaquettes expriment faiblement ou n'expriment pas cette molécule (56).

Le principal rôle de CD73 est lié à son activité enzymatique menant à la production d'adénosine, dont les fonctions seront présentées dans les paragraphes suivants. En dehors de cette propriété, la molécule CD73 module le transport ionique intracellulaire et est impliquée dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium en modulant l'expression de VCAM-1 (molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1) et en interagissant avec des molécules de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine et la ténascine C (52, 57).

Cette enzyme existe également sous forme soluble dans le sérum, après clivage de l'ancre GPI. Les caractéristiques de la forme soluble sont identiques à celle de la forme membranaire (58, 59).

2.2.2. Catabolisme

Pendant le développement embryonnaire, l'adénosine est essentiellement métabolisée en inosine par l'adénosine désaminase (60). Après la naissance, la principale voie catabolique de l'adénosine correspond à sa phosphorylation en AMP par l'adénosine kinase au niveau intracellulaire. Secondairement, l'adénosine peut-être désaminée en inosine par l'adénosine désaminase (Figure 4) (3).

2.2.2.1. Adénosine kinase

L'adénosine kinase (ADK) est une enzyme ATP-dépendante qui catalyse la phosphorylation de l'adénosine en AMP. Cette enzyme ubiquitaire est limitante dans le métabolisme intracellulaire de l'adénosine (3). C'est une protéine monomérique codée par le gène *ADK* et de masse moléculaire de 40 kDa.

Le déficit en ADK est une maladie métabolique congénitale découverte en 2011 dû à une mutation faux-sens dans le gène *ADK*. Cette pathologie est caractérisée par une hyperméthioninémie causant une encéphalopathie progressive, une épilepsie, une macrocéphalie et une atteinte hépatique. On retrouve une hyper-excrétion d'adénosine au

niveau urinaire et l'augmentation de la concentration d'adénosine augmente le taux d'adénylosylhomocystéine, perturbant le cycle de la méthionine. L'atteinte hépatique postnatale s'explique par un faible taux d'adénosine désaminase dans le foie (60).

2.2.2.2. Adénosine désaminase

L'adénosine désaminase (ADA) catalyse la désamination irréversible de l'adénosine et de la 2'-désoxyadénosine en inosine et en 2'-désoxyinosine respectivement. Cette protéine, codée par le gène *ADA*, existe sous forme monomérique de masse moléculaire d'environ 40 kDa ou dimérique, et possède un site actif avec un ion zinc. La désoxycoformycine est un inhibiteur d'ADA.

L'ADA est principalement exprimée dans l'intestin, le thymus et la rate. Elle existe sous 2 isoformes, l'ADA1 et l'ADA2. L'ADA1 se trouve dans la plupart des cellules de l'organisme. En plus de sa localisation cytosolique, l'ADA1 peut être exprimée à la surface des lymphocytes, des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques (ecto-ADA). L'ecto-ADA forme un complexe avec la dipeptidyl peptidase IV (CD26) ou avec les récepteurs de l'adénosine A1 ou A2B. L'ADA2, uniquement monomérique, est quant à elle retrouvée dans le foie, la rate, sur les monocytes/macrophages et dans le sérum. Elle présente une affinité plus faible pour l'adénosine (56).

La combinaison d'une expression relativement faible de CD73 et d'une expression importante d'ADA sur les cellules hématopoïétiques limite la concentration d'adénosine ce qui protège les cellules de ses effets immunosuppresseurs.

Certaines mutations dans le gène *ADA* causent un déficit immunitaire combiné sévère (DICS) humain. Cette pathologie se traduit par une absence de cellules B, T et NK affectant l'immunité innée et adaptative et par une atteinte notable d'autres organes comme les poumons, les os, le foie, les reins et le système nerveux central. Le déficit en ADA cause l'accumulation des substrats lymphotoxiques adénosine et 2'-désoxyadénosine dans le plasma et les cellules. Le 2'-désoxyadénosine triphosphate (dATP), métabolite de la 2'-désoxyadénosine, inhibe la ribonucléotide réductase qui catalyse la formation des désoxynucléotides composant l'ADN. Le dATP induit également la libération mitochondriale du cytochrome C dans les thymocytes et déclenche leur apoptose. Par ailleurs, l'AMP obtenu à partir de l'adénosine inhibe la synthèse pyrimidique ce qui interfère dans la synthèse d'ADN et d'ARN. De plus, l'accumulation d'adénosine au niveau extracellulaire active le récepteur de l'adénosine A2A sur les lymphocytes T qui déclenche l'apoptose de ces cellules (61). Enfin, l'adénosine et la 2'-désoxyadénosine inhibent aussi la SAHH et interfèrent avec les réactions de méthylations requises pour la

viabilité cellulaire (61, 62). L'effet de ce déficit sur le développement tumoral est inconnu puisque cette pathologie est létale en absence de traitement substitutif, de transplantation de moelle osseuse ou de thérapie génique.

2.2.3. Transport de l'adénosine

La concentration d'adénosine est régulée par un système de transporteurs nucléosidiques équilibratifs (ENT) responsables des flux bidirectionnels des nucléosides, nucléobases et analogues nucléosidiques. Il existe également des transporteurs nucléosidiques concentratifs (CNT) capables de maintenir une concentration de nucléoside intracellulaire contre un gradient de sodium, de lithium ou de protons (3). Certaines cellules peuvent synthétiser les purines *de novo* alors que d'autres emploient la voie de recyclage des bases libres qui est facilitée par l'entrée dans la cellule des nucléosides extracellulaires par ces transporteurs.

Les transporteurs ENT1 et CNT2 sont les principaux transporteurs de l'adénosine. ENT1, codé par le gène *SLC29A1*, est exprimé dans la plupart des tissus. La concentration extracellulaire d'adénosine augmente quand l'activité de ces transporteurs est inhibée par des drogues ou par un changement de température (49, 63). Le dipyridamole est un inhibiteur des transporteurs ENT1 et ENT2.

2.3. Concentrations physiologiques de l'adénosine

La concentration basale de l'adénosine dans le liquide interstitiel est comprise entre 20 et 200 nM, et peut atteindre jusqu'à 30 μ M dans des conditions métaboliques défavorables comme l'hypoxie ou l'inflammation. A des doses supérieures, autour du millimolaire, l'adénosine est toxique, probablement en interférant avec l'homéostasie intracellulaire des pools nucléotidiques (65). Il a été démontré que la principale source d'adénosine lorsqu'elle est présente à une concentration extracellulaire supérieure à 200 nM provient de la libération et de la métabolisation extracellulaire de l'ATP (64). La concentration basale de l'adénosine intracellulaire n'a pas pu être déterminée. Sa concentration est mesurée par des techniques hautement sensibles comme l'ampérométrie ou la chromatographie.

2.4. Récepteurs de l'adénosine

L'adénosine présente une demi-vie très courte puisqu'elle est métabolisée rapidement et agit ainsi comme une molécule de signalisation extracellulaire uniquement à proximité de la cellule productrice. Elle se fixe à ses récepteurs purinergiques de type P1 autrement nommés récepteurs de l'adénosine (AdoR), au nombre de quatre (A1, A2A, A2B et A3),

de masse moléculaire comprise entre 35 et 70 kDa. La 2'-désoxyadénosine n'interagit pas avec ces récepteurs. Le récepteur A2A est le plus affiné pour l'adénosine, suivi des récepteurs A1 et A3 (liaison de l'adénosine à des concentrations de plusieurs nanomolaires) et enfin du récepteur A2B (liaison à des concentrations de l'ordre du micromolaire).

2.4.1. Distribution tissulaire

Les récepteurs de l'adénosine sont ubiquitaires. Leur niveau d'expression est variable selon le type de cellule. Une étude des transcrits de ces récepteurs a permis d'obtenir un aperçu de leur distribution tissulaire (Tableau 3).

Tableau 3. Distribution tissulaire des récepteurs de l'adénosine. D'après Fredholm *et al.*, 2001 (49)

Expression	Forte	Intermédiaire	Faible
Récepteur A1	- Cerveau (cortex, cérébellum, hippocampe), moelle épinière - Cœur , yeux, surrénales	- Autres régions cérébrales - Rein , muscles, foie, tissu adipeux, glandes salivaires, œsophage, estomac, colon, testicules	- Poumons, pancréas
Récepteur A2A	- Neurones GABAergiques striatopallidaux - Rate, thymus - Leucocytes , plaquettes	- Cœur , poumons - Vaisseaux sanguins	- Autres régions cérébrales
Récepteur A2B	- Colon, vessie	- Hypothalamus - Poumons, yeux - Vaisseaux sanguins, mastocytes	- Cerveau, hypophyse - Tissu adipeux, surrénales, reins, foie, ovaires
Récepteur A3	- Testicules (rat) - Mastocytes (rat)	- Cerveau (cérébellum, hippocampe) (homme), épiphyse - Poumons, rate (mouton)	- Cerveau - Thyroïde, surrénales, rate, foie, reins, cœur, intestin

2.4.2. Voies de signalisation

La réponse d'une cellule à l'adénosine dépend de l'expression de ses récepteurs qui modulent la transduction du signal intracellulaire. Les récepteurs de l'adénosine sont couplés aux protéines G et se caractérisent alors par une structure commune de sept hélices hydrophobes transmembranaires connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Le domaine N-terminal extracellulaire est opposé au domaine C-terminal intra-cytoplasmique. Les récepteurs A2A et A2B sont couplés à une protéine G activatrice de l'adénylate cyclase alors que les récepteurs A1 et A3 sont couplés à une protéine G inhibitrice (Figure 6). L'adénylate cyclase produit l'adénosine-3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) qui est un second messager intracellulaire.

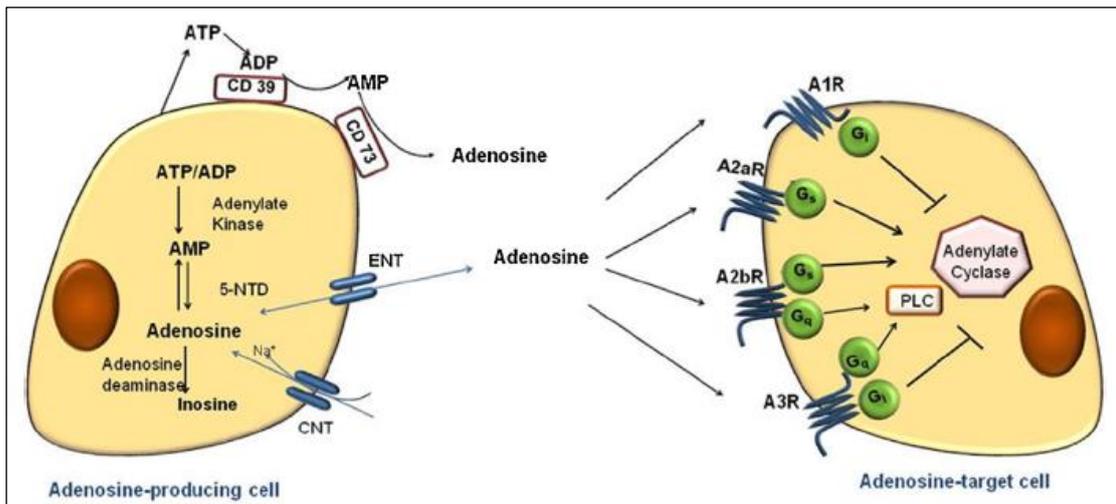


Figure 6. Système adénoenergique. D'après Montinaro *et al.*, 2006 (66)

D'autres voies de signalisation sont mises en jeu lors de la stimulation de ces récepteurs comme l'activation de la phospholipase C (PLC), de protéines kinases activées par des mitogènes (MAPKs) ou dépendantes du calcium (CDPKs) et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Figure 7) (67, 64). Les quatre récepteurs de l'adénosine activent la phosphorylation des MAPKs ERK-1/2 sur des cellules d'ovaires de hamster chinois à des concentrations endogènes d'agoniste des récepteurs de l'adénosine (68).

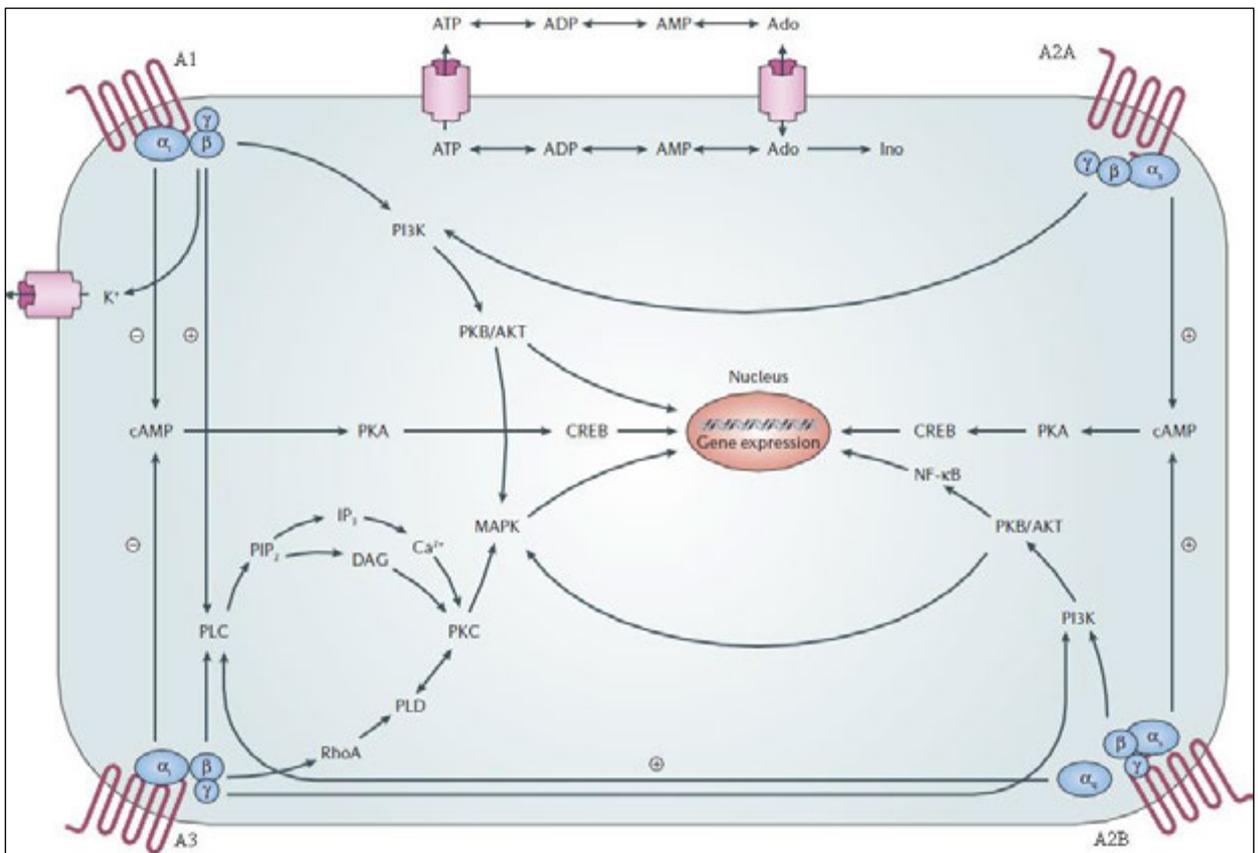


Figure 7. Voies de signalisation des récepteurs de l'adénosine. D'après Jacobson *et al.*, 2006 (67)

2.4.3. Fonctions

Les effets du système adénoenergique sont multiples puisqu'ils dépendent de l'activation de quatre récepteurs différents induisant des cascades signalétiques variées dans divers organes. Ils ont été définis notamment à partir de modèles murins invalidés pour le gène de chaque récepteur de l'adénosine. La présentation exhaustive de l'effet de chaque récepteur dans chaque organe est hors du propos de ce mémoire, le tableau 3 indique en caractères gras les organes pour lesquels les récepteurs de l'adénosine jouent un rôle important.

Globalement, la principale fonction de l'adénosine est de favoriser la réparation d'un organe atteint de lésion ischémique et hypoxique, particulièrement le cœur et le cerveau. Différents moyens sont mis en œuvre tels que l'augmentation de l'apport en oxygène, le pré-conditionnement ischémique, l'augmentation de l'angiogenèse et la diminution de la réponse inflammatoire (69). L'adénosine induit une vasodilatation, principalement via les récepteurs A2A et A2B, et présente des effets directs chronotrope, dromotrope et inotrope négatifs, principalement via le récepteur A1. L'angiogenèse est essentiellement médiée par les récepteurs A2A et A2B et l'immunosuppression par le récepteur A2A présent à la surface de la plupart des cellules immunitaires. Spécifiquement, l'activation du récepteur A2A inhibe les fonctions des lymphocytes T comme la libération de cytokines en bloquant les voies de signalisation en aval du récepteur des cellules T (TCR). De plus, l'adénosine favorise l'accumulation de lymphocytes T régulateurs qui induisent l'anergie. L'activation du récepteur A2A inhibe également la phagocytose des neutrophiles et des macrophages ainsi que certaines voies de signalisation en aval du récepteur des cellules B (BCR) (52). Des souris déficientes en récepteur A2A sont d'ailleurs incapables de contrôler une inflammation induite par un stimulus modéré et meurent suite à une réponse immunitaire excessive (70). Le récepteur A2A est donc engagé dans la protection tissulaire lors d'une inflammation locale.

L'adénosine est également impliquée au niveau du système nerveux central dans la médiation de la douleur, la mémoire, l'apprentissage et le sommeil en modulant la neurotransmission (49, 64).

2.5. Système adénoenergique et progression tumorale

Il est raisonnable de penser que l'adénosine puisse être impliquée dans la progression tumorale puisque certaines de ses fonctions sont liées à la maintenance énergétique, l'angiogenèse et l'immunosuppression et d'autant que les cellules cancéreuses présentent

généralement un métabolisme modifié. Il existe d'ailleurs une augmentation de la concentration extracellulaire d'adénosine dans le cancer (69).

2.5.1. Adénosine et microenvironnement tumoral

L'ATP est quasiment indétectable dans les tissus sains alors que sa concentration est de l'ordre de la centaine de micromolaires dans le microenvironnement tumoral (71). Cela s'explique par la présence d'une inflammation chronique locale et de foyers nécrotiques diffus au niveau de la tumeur qui libèrent de l'ATP, alors reconnue comme un signal de danger et favorisant l'inflammation (52). Les cytokines pro-inflammatoires IFN de type I, TNF- α et IL-1 augmentent l'expression de CD73 ce qui accroît la concentration extracellulaire de l'adénosine (52). De plus, une hypoxie est retrouvée dans le microenvironnement des cancers métaboliquement actifs. Dans ce cas, l'activation du facteur de transcription SP1 induit par l'hypoxie augmente l'expression de CD39 et réprime celles de l'ADK et des transporteurs ENT1 et ENT2, et l'activation du facteur de transcription HIF1 α induit l'expression de CD73. Cela a pour conséquence d'augmenter davantage la production d'adénosine extracellulaire à partir de l'ATP excédentaire (Figure 8) (51).

En outre, les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 induisent l'expression du récepteur de l'adénosine A2A (52) et les facteurs de transcription HIF2 α et HIF1 α modulent l'expression des récepteurs A2A et A2B respectivement (Figure 8) (64). L'activation de ces récepteurs par l'adénosine a un effet immunosuppresseur pouvant faciliter l'échappement tumoral (50).

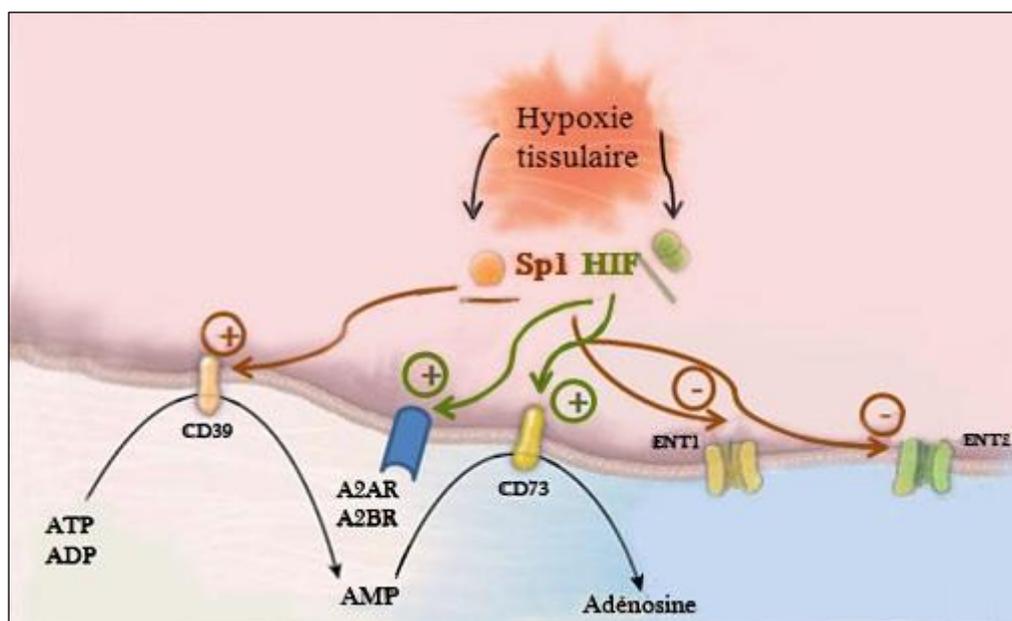


Figure 8. Effet de l'hypoxie sur le métabolisme de l'adénosine.

Ainsi, l'adénosine est une molécule abondante dans le microenvironnement tumoral et peut agir sur ses récepteurs présents à la surface des cellules cancéreuses et des cellules saines.

2.5.2. Système adénoenergique et progression tumorale des cancers solides

2.5.2.1. Rôle global de l'adénosine

L'adénosine est associée à la progression tumorale de certains cancers solides (52). Une étude a évalué sa capacité à favoriser la prolifération de cellules de cancer du sein (MCF-7, T-47D) par mesure de la synthèse de l'ADN après incorporation de thymidine tritiée, par étude du cycle cellulaire et par comptage cellulaire après ajout d'adénosine exogène (0-600 μM). Un effet prolifératif de l'adénosine a été retrouvé à des concentrations pouvant correspondre à celles dans le microenvironnement tumoral (effet maximal autour de 30 μM) (72). Cet effet, toujours notable en présence d'inhibiteurs de transporteurs nucléosidiques, passerait par un mécanisme extracellulaire. Aucun effet apoptotique de l'adénosine n'a été retrouvé sur ces cellules (72). Le même effet prolifératif de l'adénosine a été retrouvé sur des cellules de cancer du colon (HT-29, T84, HRT-18, Colo320HSR, Caco-2 et MCA-38) pour les mêmes concentrations. Dans ces expériences, un effet cytotoxique de l'adénosine a été observé à la concentration supraphysiologique de 1 mM (73). De même, l'adénosine favorise la prolifération de cellules de mélanome par activation des récepteurs de l'adénosine (65), et cela n'est plus observé à la concentration supraphysiologique d'adénosine de 1 mM (65). L'action de l'adénosine sur la migration des cancers solides a également été étudié, particulièrement dans le cancer du colon (74), cependant la plupart des études portent sur le CD73 et seront présentées dans un paragraphe ultérieur.

Ainsi, on constate que l'adénosine favorise la prolifération de plusieurs cancers solides. D'autres études soulignent cependant un effet cytostatique de l'adénosine sur d'autres cancers (75). En raison de sa demi-vie très courte, l'étude de l'adénosine *in vitro* est difficile. Il faut en outre remarquer que les conditions expérimentales varient selon les études. Certains auteurs utilisent en particulier des analogues de l'adénosine non hydrolysables qui présentent une affinité différente pour ses récepteurs, et ont une action intracellulaire différente sur l'homéostasie du pool de nucléotides (76). Un effet cytostatique ou cytotoxique des analogues 2-et 8-chloroadénosine est retrouvé dans les cancers de la prostate, du colon, de la thyroïde et dans le gliome (77, 78, 79, 80). L'effet cytotoxique serait dû à une inhibition intracellulaire de certaines enzymes nécessaires à la synthèse d'ADN. Une autre étude retrouve un effet cytostatique de la 2'-désoxyadénosine

en présence d'inhibiteur d'ADA sur des astrocytomes (81). Ces résultats concernent peu le système adénoenergique.

Un effet cytostatique de l'adénosine sur des cellules gliomateuses (C6) a été retrouvé à des concentrations comprises entre 100 et 300 μM (82). Cet effet, annulé par un inhibiteur de transporteur nucléosidique, nécessite l'entrée de l'adénosine dans la cellule qui est alors transformée en AMP par l'ADK, ce qui modifie le pool intracellulaire de nucléotides et inhibe la réplication de l'ADN. Une autre étude retrouve un effet prolifératif de l'adénosine à 100 μM sur les mêmes lignées cellulaires gliomateuses (C6 et U138MG), augmentant lors du blocage des transporteurs nucléosidiques, ce qui indique dans ce cas une action extracellulaire de l'adénosine (83). Enfin, l'adénosine induit l'apoptose de cellules d'hépatome à des concentrations supraphysiologiques de 10 mM (43). Il faut donc bien noter à quelle concentration d'adénosine un effet est observé. Soulignons également l'importance de la concentration en sérum de veau fœtal dans les milieux de culture puisque le sérum contient l'isoforme ADA2 pouvant métaboliser l'adénosine exogène (72). L'utilisation d'un inhibiteur d'ADA, comme la 2'-désoxycoformycine, permet d'augmenter la demi-vie de l'adénosine (73).

Ainsi, l'extrapolation des conclusions issues de la littérature scientifique doit être prudente car l'adénosine est instable et peut présenter des effets différents selon sa concentration. L'étude de la littérature scientifique relève, de ce fait, des désaccords sur l'effet cette molécule dans le cancer et peu d'études *in vivo* ont été effectuées à l'heure actuelle de par ces difficultés.

2.5.2.2. Rôle des récepteurs de l'adénosine

L'effet de l'adénosine sur la croissance tumorale et l'apoptose est controversé. Une explication plausible, après avoir pris en compte la difficulté de comparer plusieurs études *in vitro* entre elles, est que l'effet de l'adénosine dépend de l'expression de ses différents récepteurs à la surface des cellules cancéreuses et des différents signaux pouvant être transduits après leur activation. Ce paragraphe présente de manière synthétique les connaissances actuelles du rôle de chaque récepteur sur la progression tumorale de cancers solides.

2.5.2.2.1. Récepteur A1

Le récepteur A1 serait impliqué dans la prolifération de cellules de cancer du sein mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN et par l'étude du cycle cellulaire. En effet, ces cellules prolifèrent moins lors de l'inhibition de l'ARN messager du récepteur A1 par un ARN interférent (siRNA) (84). Par ailleurs, ce récepteur augmente

la chimiotaxie des cellules de mélanome (85). A l'inverse, ce récepteur présente une action anti-tumorale *in vitro* sur des glioblastomes et diminue la prolifération d'autres cancers du sein (85). Ainsi, le rôle de ce récepteur dans la progression tumorale n'est pas vraiment établi et semble dépendre du type de cellules qui l'expriment.

2.5.2.2.2. Récepteur A2A

L'activation du récepteur A2A induit la mort de cellules de mélanome (85) mais est impliqué dans la prolifération de cancers du sein hormono-dépendants ou de tumeurs neuroendocrines (86, 87).

Le rôle majoritaire du récepteur A2A est l'immunosuppression, comme nous l'avons vu dans les conditions physiologiques. En effet, des souris déficientes en récepteur A2A ou dont le récepteur A2A est inhibé pharmacologiquement rejettent des tumeurs immunogènes de mélanome via une réponse immunitaire T (89). Ainsi, le récepteur A2A pourrait être impliqué dans l'échappement tumoral. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, ce récepteur est surexprimé dans les tumeurs hypoxiques et inflammatoires. Des souris invalidées pour le gène *Adora2a* sont protégées contre l'apparition de métastases de cancer du sein (4T1.2) et de mélanome (B16F10), probablement par rétablissement de l'immunité anti-tumorale des cellules NK (88). Le blocage des récepteurs A2A par un antagoniste sélectif diminue le nombre de métastases dans les mêmes modèles de cancers solides (88).

Le récepteur A2A est également impliqué dans la néoangiogenèse de certains cancers par promotion de la prolifération des cellules endothéliales et de la production de VEGF (85).

2.5.2.2.3. Récepteur A2B

Le récepteur A2B est activé uniquement à de fortes concentrations d'adénosine. Il est impliqué dans la néovascularisation de micro-vaisseaux périphériques et favorise l'expression de facteurs de croissance angiogéniques. Il est aussi surexprimé dans les tumeurs hypoxiques et inflammatoires. Son blocage par un antagoniste sélectif diminue l'invasivité tumorale de cellules de cancer du sein (4T1.2) et de mélanome (BF16F10) (88).

Il présente également un rôle cytotatique sur les cellules de cancer du sein triple négatives, probablement par modulation de la phosphorylation d'ERK-1/2 (85).

2.5.2.2.4. Récepteur A3

Le rôle du récepteur A3, surexprimé dans plusieurs cancers solides, est lui aussi difficile à définir (85). Il régule le cycle cellulaire et l'activité télomérase, et présente des effets à la fois pro- et anti-apoptotiques selon la quantité d'agoniste s'y fixant et selon l'état d'oxygénation. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* indiquent que l'utilisation d'un agoniste du récepteur A3 à des doses nanomolaires présente un effet trophique sur plusieurs cancers solides. A l'inverse, à des doses micromolaires, l'agoniste présente un effet cytostatique potentiellement par l'internalisation du récepteur (90).

2.5.2.3. Rôle de CD73

Comme nous l'avons déjà décrit, le contexte inflammatoire et hypoxique du microenvironnement tumoral favorise l'expression de l'enzyme CD73 sur les tumeurs. En effet, le CD73 est surexprimé dans des cancers du sein, mélanomes, gliomes, glioblastomes, cancers ovariens, gastriques, œsophagiens, thyroïdiens, prostatiques, coliques, vésicaux et de la tête et du cou et est associé à un phénotype métastatique dans le cancer du sein et le mélanome (52). Une surexpression concomitante des deux enzymes CD39 et CD73 a été observée dans plusieurs cancers solides incluant les cancers ovariens et coliques, les mélanomes et les cancers de la tête et du cou. Le CD39 seul est surexprimé dans le cancer du pancréas (91, 51, 92).

La surexpression de CD73 par les cellules tumorales semble liée à leur survie et à leur croissance. Pour ce qui concerne le cancer du sein, l'expression de CD73 est constitutivement régulée par les récepteurs des œstrogènes (ER). En effet, le CD73 est surexprimé dans les cancers ER négatifs plus agressifs. Le CD73 est également associé à une résistance au traitement par la doxorubicine (93, 94, 95). De plus, le CD73 facilite l'adhésion, la migration et l'invasion de cellules cancer du sein via la génération d'adénosine (96, 97, 98). Une étude *in vitro* a retrouvé un effet pro-tumoral de CD73, confirmé par l'utilisation d'APCP (α,β -méthylène adénosine-5'-diphosphate), un inhibiteur de cette enzyme. En effet, l'APCP diminue la viabilité des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 de manière dose-dépendante et diminue le pourcentage de ces cellules en phases S et G₂/M du cycle cellulaire. L'inhibition de CD73 *in vivo* par l'APCP est associée à un retard de croissance tumorale chez la souris (99). Le CD73 présenterait des effets pro-angiogéniques dépendant de fonctions à la fois enzymatiques et non enzymatiques. Le blocage de CD73 par un anticorps monoclonal diminue la concentration de VEGF et supprime la néoangiogenèse *in vivo* (43). Un autre anticorps monoclonal (AD2) est capable de décroître le nombre de métastases spontanées, mais ne peut ralentir la croissance de la

tumeur primaire, dans un modèle de cancer du sein chez la souris immunodéficiente, par un mécanisme ne modulant pas l'activité catalytique de CD73. Cet anticorps monoclonal modifie la distribution de CD73 et induit son internalisation (100).

La valeur pronostique de l'expression de CD73 a été recherchée à partir de biopsies de cancer du sein. Sur 15 échantillons de patients ayant rechuté, 10 d'entre eux expriment le CD73, contre 3 sur 15 échantillons de patients n'ayant pas rechuté (43). L'expression de CD73 est aussi associée à la probabilité de métastaser (14 échantillons sur 21) (43). À côté du cancer du sein, l'expression de CD73 est corrélée à un mauvais pronostic dans l'évolution du cancer colorectal (91, 101). Une étude sur un modèle de mélanome a démontré que la croissance et la formation de métastases sont significativement atténuées chez des souris déficientes en CD73 ou lors de l'utilisation d'APCP (102). Enfin, une étude indique que le CD73 favorise la prolifération et l'adhésion des cellules gliomateuses (83).

De plus en plus de données infèrent un effet pro-tumoral de l'adénosine et de CD73 à la fois par l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale et par l'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses (Figure 9). La connaissance du système adénosinergique dans les cancers solides peut potentiellement permettre la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

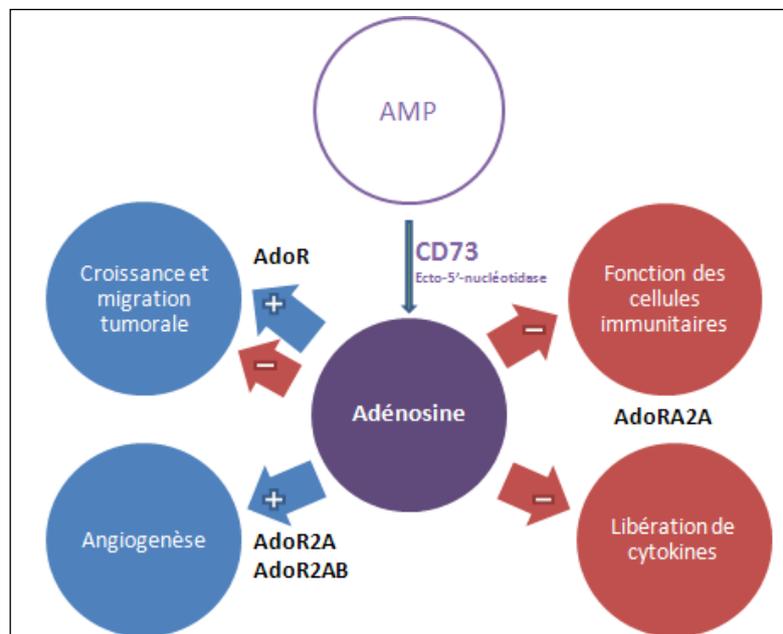


Figure 9. Rôle de l'adénosine dans la progression tumorale des cancers solides. D'après Sychala *et al.*, 2000 (3).

2.5.3. Système adénoenergique et progression tumorale des cancers hématopoïétiques

2.5.3.1. Rôle global de l'adénosine

Nous avons décrit l'effet toxique de l'adénosine à forte concentration sur les cellules immunitaires dans le déficit en ADA. Ainsi, en absence de phénomène malin, l'adénosine présente plutôt un effet cytotoxique sur les lymphocytes. Cependant, la question reste entière concernant les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique qui présentent un phénotype tumoral. En effet, on peut supposer que l'effet prolifératif de l'adénosine observé dans plusieurs cancers solides existe également dans les cancers d'origine hématopoïétique, sachant que certains d'entre eux expriment CD73 et/ou des récepteurs de l'adénosine et sont donc enclins à produire de l'adénosine et à y répondre.

A l'heure actuelle, l'effet de l'adénosine sur les cancers hématopoïétique n'est pas consensuel. Des effets aussi bien délétères que protecteurs ont été décrits.

2.5.3.2. Effets délétères de l'adénosine

Un effet cytostatique dose-dépendant de l'adénosine (5-25 μM) a été démontré sur un lymphome murin (Nb2-11c) après activation des récepteurs de l'adénosine A2 et A3. Les cellules se retrouvent alors en arrêt du cycle cellulaire en G_0/G_1 . De plus, un effet apoptotique de l'adénosine a été observé à des concentrations supérieures (100-200 μM) après entrée de l'adénosine dans la cellule par un ENT (103). De fortes doses d'adénosine induisent également l'apoptose des cellules lymphomateuses U-937, de cellules de leucémie lymphoïde chronique et de la lignée leucémique promyélocytaire HL60 (104, 105). Enfin, l'adénosine inhibe la croissance *in vitro* de lymphoblastes T humains MOLT-4 par augmentation du temps de génération du cycle cellulaire et induit leur apoptose à de plus fortes concentrations (106). Pour les cellules HL60 et MOLT-4, l'effet serait principalement intracellulaire car le dipyridamole, inhibiteur d'ENT1 et ENT2, reverse celui-ci (105, 106).

Plusieurs publications décrivent donc un effet cytotoxique de l'adénosine à de fortes concentrations par un mécanisme intracellulaire et une publication évoque l'action cytostatique de certains récepteurs de l'adénosine.

2.5.3.3. Effets protecteurs de l'adénosine

Le CD73 est particulièrement exprimé par les cellules de leucémie lymphoïde chronique (LLC) au niveau des centres de prolifération de ganglions lymphatiques envahis (107). Il a

été prouvé que la production d'adénosine était restreinte aux cellules de LLC exprimant le CD73 par mesure de l'adénosine par chromatographie liquide haute performance (107). Ces données suggèrent que l'axe adénoenergique est particulièrement actif dans les niches où la quantité de nucléotides extracellulaire est importante à la suite d'un important turnover cellulaire. En effet, l'enzyme CD39 est également surexprimée dans ces cellules de LLC, favorisant la production d'adénosine par la cascade métabolique ATP – AMP – adénosine (92). Les mêmes auteurs ont démontré que l'adénosine exogène (50 µM) protège les cellules de LLC de l'apoptose spontanée ou induite par l'étoposide, alors que l'APCP provoque une apoptose spontanée. Cette concentration d'adénosine est compatible avec celle mesurée par chromatographie. Un agoniste du récepteur A2A exprimé par ces cellules cancéreuses a de plus le même effet protecteur contre l'apoptose (107). Cette étude exhaustive indique que l'axe adénoenergique est une cible thérapeutique potentielle dans cette pathologie.

Il a également été démontré que le récepteur A2A était impliqué dans l'inhibition de la réponse immunitaire contre le lymphome folliculaire (119).

2.5.3.4. Rôle de CD73

L'expression de CD73 sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique dépend du type de pathologie. En ce qui concerne les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), l'expression de CD73 est élevée dans les LAL communes et pré-B et très faible dans les LAL pro-B et matures et dans les LAL T (108). Le CD73 est surexprimé dans 54,5 % de LAL (42 sur 77) (109). Environ 30 % des LLC expriment fortement le CD73 de manière associée aux marqueurs de mauvais pronostic CD38 et ZAP-70 et au marqueur de prolifération Ki-67 (110).

La transfection d'un plasmide codant CD73 dans des cellules de LAL-T humaine (Jurkat) induit un phénotype de résistance à l'apoptose. Ce rôle protecteur a été confirmé par des expériences employant un ARN interférent (siRNA) ciblant le CD73 qui a restauré la sensibilité des cellules Jurkat à l'apoptose (111). Ce rôle anti-apoptique ne proviendrait pas de l'activité enzymatique de CD73 mais d'une interaction moléculaire entre le CD73 et un récepteur de mort cellulaire DR (111). Par ailleurs, des cellules de lymphome T murin (EL4) exprimant le CD73 présentent un phénotype de résistance multiple aux agents thérapeutiques, dont la doxorubicine pour laquelle la résistance peut être annulée par l'ajout d'APCP (94).

L'expression de CD73 pourrait donc être un marqueur de mauvais pronostic des cancers hématopoïétiques. Deux études rétrospectives sur de petites cohortes ont trouvé une

tendance à ce que l'expression de CD73 par des cellules de LAL pré-B et communes soit de mauvais pronostic, cependant une étude prospective plus importante a démenti cette corrélation (108, 112, 113).

Ainsi donc, l'adénosine joue potentiellement un rôle dans la chimio-sensibilité des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique, et elle peut être, selon les cellules étudiées, pro- ou anti-apoptotique. Son rôle dans la progression tumorale de cancers d'origine hématopoïétique reste donc largement méconnu, à la différence des cancers solides pour lesquels un effet pro-tumoral semble se confirmer à mesure des nombreuses études scientifiques effectuées.

2.5.4. Potentiel thérapeutique du système adénoenergique

La notion de traitement anticancéreux a évolué et, à l'heure actuelle, nous sommes entrés dans l'ère de la multi-thérapie qui a pour objectif de cibler plusieurs molécules et voies de signalisation. Comme nous l'avons exposé, les effets immunosuppresseurs et pro-tumoraux de l'adénosine commencent à être démontrés. On devine alors le potentiel thérapeutique que représente le système adénoenergique, ubiquitaire et crucial.

Jusqu'à présent, l'adénosine est utilisée en thérapeutique dans les pathologies cardiaques que sont la tachycardie supraventriculaire paroxystique et le syndrome de Wolff-Parkinson-White (Adenocard[®] en voie intraveineuse, approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis). Elle est également utilisée en voie intraveineuse comme adjuvant du thallium-201 pour l'imagerie cardiaque dans l'évaluation des maladies coronariennes (Adenoscan[®], approuvée par la FDA aux Etats-Unis). Elle favorise la vasodilatation coronarienne des artères normales par rapport aux artères sténosées.

L'adénosine ayant une demi-vie très courte, il est impératif pour élaborer une stratégie thérapeutique au long terme de moduler son métabolisme ou de mimer ou d'antagoniser ses effets avec des analogues pharmacologiques plus stables. Les études sur des souris invalidées pour les gènes codant pour les récepteurs de l'adénosine et pour le CD73 indiquent que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de l'adénosine et d'inhibiteurs de CD73 peut être bien tolérée cliniquement (64).

Il n'existe pas d'essai clinique en cours sur un inhibiteur de l'enzyme CD73 mais il en existe sur des agonistes et des antagonistes des récepteurs de l'adénosine.

2.5.4.1 Inhibition de l'enzyme CD73

L'inhibition de CD73 semble être une idée cohérente puisque cette enzyme est surexprimée dans de nombreux cancers et que les concentrations d'adénosine trouvées dans le microenvironnement tumoral sont fortement immunosuppressives (114). Ainsi, l'inhibition de CD73, par adressage d'un anticorps vers la tumeur par exemple, aurait pour objectif de réduire la concentration d'adénosine au niveau d'un site précis. L'immunité anti-tumorale étant généralement insuffisante et transitoire, l'inhibition de CD73 pourrait être combinée à d'autres immunothérapies afin d'obtenir un effet synergique, ou à une chimiothérapie induisant la libération d'ATP comme les anthracyclines ou l'oxaliplatine pour activer le système immunitaire (91). Une étude chez la souris a d'ailleurs démontré que le blocage de CD73 par un anticorps monoclonal augmente l'activité thérapeutique des immunothérapies anti-PD1 (nivolumab) et anti-CTLA-4 (ipilimumab, Yervoy[®]) contre des cancers du colon, de la prostate et du sein (115).

Peu d'inhibiteurs de CD73 existent actuellement. L'ATP et l'ADP inhibent cette enzyme mais sont rapidement métabolisés. Il existe un analogue de l'ADP plus stable, l'APCP (Figure 10). Cette molécule est beaucoup utilisée en recherche préclinique car il s'agit d'un inhibiteur efficace *in vitro* (116). Cependant, ses paramètres pharmacocinétiques comme la demi-vie et la biodisponibilité ne sont pas définis et l'APCP induit des effets indésirables lors d'une utilisation fréquente à haute dose dans des modèles animaux. Cette molécule ne paraît donc pas compatible avec une utilisation clinique. Le développement d'inhibiteurs dérivés de l'antraquinone a été réalisé (Figure 11) (43), mais ces composés ne présentent pas les propriétés pharmacocinétiques requises pour une utilisation médicamenteuse. Un criblage virtuel par modélisation moléculaire à partir de la structure de l'ecto-5'-nucléotidase de rat a identifié des inhibiteurs de CD73 avec une structure sulfonamide mimant le groupement phosphate (Figure 12) (117). Ces deux études ont utilisé une protéine de rat présentant seulement 80 % d'identité avec la protéine humaine. La structure de la protéine CD73 humaine étant maintenant connue, il sera possible d'effectuer le même type de recherches par modélisation moléculaire (54).

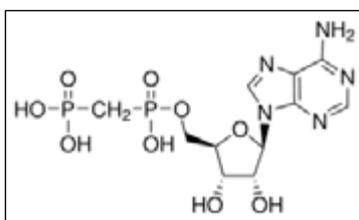


Figure 10. Structure de l'APCP.

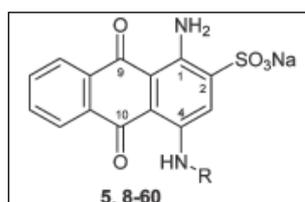


Figure 11. Structure générique des dérivés de l'antraquinone. D'après Ripphausen *et al.*, 2012 (117)

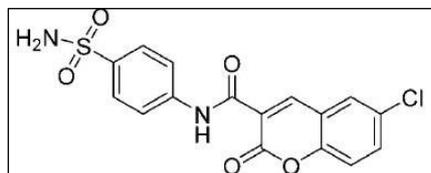


Figure 12. Structure sulfonamide. D'après Ripphausen *et al.*, 2012 (117)

Par ailleurs, il existe des clones d'anticorps monoclonaux anti-CD73 (AD2, TY/23) dont les effets sont décrits dans des modèles murins de cancer du sein (118). L'anticorps TY/23 induit une diminution de la taille de la tumeur, ainsi qu'une diminution du nombre de métastases pulmonaires, cependant, l'activité inhibitrice de cet outil est inférieure à celle de l'APCP (114).

Pour ce qui concerne le cas spécifique de la LLC, cibler l'enzyme CD73 semble être une piste thérapeutique intéressante. Il faut savoir que ce pourrait être préjudiciable en combinaison avec la fludarabine, largement utilisée dans cette pathologie, sachant que la forme soluble de CD73 peut transformer la prodrogue fludarabine phosphate en sa forme active (107).

2.5.4.2. Action sur les récepteurs de l'adénosine

Relativement peu de ligands des récepteurs de l'adénosine ont atteints le niveau des essais cliniques chez l'homme.

2.5.4.2.1. Antagonisme du récepteur A2A

Des stratégies d'immunothérapie peuvent se baser sur l'utilisation d'antagonistes d'A2A qui interfèrent avec l'action immunosuppressive de l'adénosine au niveau tumoral. L'implication du récepteur dans l'échappement tumoral des cancers solides a été démontrée.

L'inactivation génique d'*Adora2a* chez la souris augmente la réponse immunitaire anti-tumorale des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de la tumeur exprimant le récepteur A2A. L'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur A2A, ZM2413856, présente le même effet de rejet immunologique de la tumeur (89), d'autant que cet antagoniste inhibe directement la prolifération de cellules de cancer du poumon exprimant ce récepteur (120).

Des molécules antagonistes de récepteur A2A ont été développées comme de potentiels traitements de la maladie de Parkinson. En effet, le récepteur A2A est surexprimé dans le striatum dorsal, une structure critique dans le contrôle moteur, où il est colocalisé avec les récepteurs dopaminergiques D2. Les antagonistes du récepteur A2A agiraient comme des agonistes dopaminergiques D2, d'où leur implication dans le traitement de cette pathologie (64). Le preladenant (SCH-420814), le tozadenant (SYN-115) et l'istradefylline (KW-6002) ont ainsi été développés et ont passé la phase II des essais cliniques, indiquant une bonne tolérance et une efficacité du médicament en lui-même. Cependant, l'étude de phase III n'a pas retrouvé d'efficacité du preladenant et de l'istradefylline par rapport à un placebo dans la maladie de Parkinson. Le tozadenant est en cours de phase III (121). Aucune étude préclinique de ces molécules dans le cancer n'a été débutée.

Une autre approche dans l'élaboration d'une immunothérapie via le récepteur A2A consiste à diminuer l'expression de ce récepteur sur les lymphocytes T *in vitro* puis de les transfuser au patient, afin que l'immunité anti-tumorale soit plus efficace (122).

2.5.4.2.2. Antagonisme du récepteur A2B

Un antagoniste du récepteur A2B, le CVT-6883, a passé l'essai clinique de phase I dans le but d'être utilisé comme agent anti-inflammatoire et anti-angiogénique (123).

2.5.4.2.3. Agonisme du récepteur A3

De nombreuses études expérimentales *in vitro* ont rapporté que l'activation du récepteur A3 était impliquée dans une diminution de la prolifération ou une augmentation de la mort des cellules de cancers du sein, de la prostate, du pancréas, de mélanome, de cellules de leucémie aigüe promyélocytaire et de lymphome murin (90). Des études *in vivo* d'expérimentation animale ont rapporté que l'agoniste du récepteur A3 CF101 (IB-MECA) administré par voie orale inhibe la croissance des cancers du colon, de la prostate, du pancréas, du foie et du mélanome (124). Après des études précliniques et des études phase I concernant la pharmacologie et la tolérance de l'agoniste du récepteur A3 CF101, cette molécule a été testée dans un essai clinique multicentrique de phase II chez des patients présentant un cancer colorectal métastatique réfractaire afin de déterminer sa dose optimale. Cet essai montre que cette molécule est bien tolérée chez l'homme et qu'elle stabilise la tumeur pendant plus de 2 mois chez 35 % des patients. Ceux-ci présentant une médiane de survie plus élevée, cette étude indique que le CF101 pourrait être co-administré avec une chimiothérapie (124). Un autre essai clinique de phases I et II montre qu'un autre agoniste du récepteur A3, le CF102 (CI-IB-MECA), est sûr, présente des données

pharmacocinétiques correctes et améliore la durée de survie de patients présentant un carcinome hépatocellulaire (125).

Devant ces résultats encourageants, des études cliniques plus poussées sont en cours de réalisation.

PROJET DE RECHERCHE

L'obésité est un facteur de risque et de mauvais pronostic dans le cancer. Nombre d'études s'intéressent à l'interaction entre les AAC et les cellules cancéreuses et ont identifié un rôle des AAC dans la progression tumorale, aussi bien sur la croissance que sur la migration tumorale et la résistance aux traitements. Les adipocytes médullaires étant le constituant majoritaire du microenvironnement des cellules leucémiques et des cellules lymphomateuses ayant envahi la moelle osseuse, nous avons voulu étudier l'effet des adipocytes sur la progression tumorale de cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique. Plusieurs mécanismes métaboliques ont été évoqués quant à l'interaction hétérotypique entre les cellules adipeuses et les cellules cancéreuses, et nous avons émis l'hypothèse que l'adénosine pouvait en faire partie intégrante. En effet, ce nucléoside est produit par l'enzyme CD73 fortement exprimée par les cellules adipeuses. L'adénosine est abondante dans le microenvironnement tumoral et présente un effet pro-tumoral de plus en plus établi dans les cancers solides, comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique. Des stratégies thérapeutiques ciblant le système adénosinergique sont d'ailleurs en cours de développement. Néanmoins, le rôle de ce métabolite sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique est peu exploré, c'est pourquoi nous nous y sommes intéressés.

Mon projet, dans le cadre d'un Master 2 Recherche et d'une année-recherche, a consisté plus précisément à étudier l'effet des adipocytes sur la prolifération et la survie de cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique *in vitro*, et à évaluer la position de l'adénosine dans cette interaction. Cette thématique appartient aux domaines de recherche de l'équipe *Anticorps Anticancer* du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL) dirigée par le Pr. Charles Dumontet (INSERM U1052/CNRS UMR 5286) qui m'a accueillie.

A cet effet, nous avons sélectionné divers cancers hématopoïétiques. Nous avons travaillé d'une part avec les lignées cellulaires humaines Jurkat, issue d'une LAL-T, RL, issue d'un lymphome folliculaire, DoHH-2, issue d'un lymphome diffus à grandes cellules B, et HDLM-2, issue d'un lymphome de Hodgkin ; et d'autre part avec les cellules hMAD, cellules souches dérivées du tissu adipeux multipotent humain, indifférenciées et différenciées en adipocytes, exprimant le CD73 à leur surface (4).

Nous avons d'abord étudié l'influence des adipocytes sur la prolifération et la mort des lignées cellulaires onco-hématologiques. Puis, après caractérisation de l'expression génique et protéique des molécules de la voie de signalisation adénosinergique par les cellules, nous avons exploré le rôle potentiel de l'adénosine dans différentes conditions expérimentales modulant sa métabolisation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Réactifs

Les composés utilisés pour ce travail proviennent des fournisseurs Sigma-Aldrich (Adénosine A4036, AMP A1752, APCP M3763, dipyridamole D9766) et Lederle (2'-désoxycoformycine ou pentostatine, Nipent[®]).

2. Conditions de culture cellulaire

Les cellules sont cultivées en phase exponentielle de croissance à 37 °C dans une étuve à 5 % de CO₂ dans les milieux adéquats (Tableau 4).

Tableau 4. Origines et milieux de culture des lignées cellulaires.

SVF = sérum de veau fœtal, PS = 10 000 unités/mL pénicilline + 10 000 µg/mL streptomycine, L-glu = L-glutamine 2 mM, FGF2 = facteur de croissance fibroblastique 2.

Origine	Lignée cellulaire	Milieu de culture
Pré-adipocytes	hMAD	DMEM + 10 % SVF + 1 % PS + 1 % L-glu + 2,5 ng/mL FGF2
	ASC	DMEM F12 + 10% SVF + 1 % PS + 1 % L-glu + 10 ng/mL FGF2
Adipocytes	hMAD différenciées	Milieu de culture des hMAD + milieu de différenciation comprenant dexaméthasone, isobutylméthylxanthine, insuline
Leucémie	Jurkat	RPMI + 10 % SVF + PS
Lymphome	HDLM-2	RPMI + 20 % SVF + PS
	DoHH-2	RPMI + 10 % SVF + PS
	RL	RPMI + 10 % SVF + PS + L-glu
Cancer du sein	MDA-MB-231	DMEM + 10 % SVF + PS + L-glu

L'étude de l'interaction entre les cellules adipeuses et les cellules cancéreuses est effectuée par co-culture (Figure 13). Les pré-adipocytes ou les adipocytes matures sont ensemencés en plaque de 6 ou 12 puits avec 3×10^5 ou $1,2 \times 10^5$ cellules dans un volume total de milieu de 4 ou 2 mL respectivement. Les pré-adipocytes adhèrent aux puits lors d'une incubation de 24 heures à 37 °C, puis 10^6 ou 4×10^5 cellules cancéreuses en suspension sont ajoutées dans chaque puits après retrait du milieu de culture initial. La co-culture s'effectue

dans le milieu DMEM ou DMEM F12 supplémenté en antibiotiques, L-glutamine, 10 ou 1 % de SVF, avec ou sans molécules supplémentaires pendant 3 jours à 37 °C dans une étuve à 5 % de CO₂.

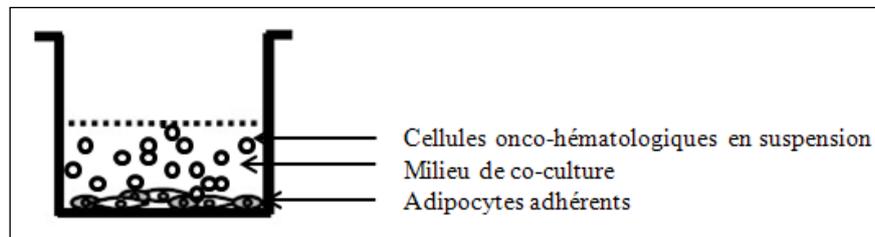


Figure 13. Schéma de la co-culture des cellules onco-hématologiques et des adipocytes dans un puits

L'étude de l'interaction entre le milieu conditionné (CM) des pré-adipocytes et les cellules cancéreuses est effectuée par prélèvement de 2 mL du surnageant de culture de pré-adipocytes ensemencés dans les mêmes conditions que précédemment en plaque de 6 puits. La culture s'effectue avec 10⁶ cellules cancéreuses en plaque de 6 puits avec un volume total de 4 mL comportant 2 mL de milieu conditionné et 2 mL de milieu DMEM supplémenté en antibiotiques, L-glutamine et 10 ou 1 % de SVF pendant 3 jours à 37 °C dans une étuve à 5 % de CO₂.

3. Détection de la prolifération cellulaire par marquage au CFSE

3.1. Principe

La prolifération des cellules cancéreuses est déterminée à l'aide de l'ester de succinimidyl diacétate carboxyfluorescéine (CFDA-SE ou CFSE) par cytométrie en flux. Ce composé lipophile traverse la membrane plasmique cellulaire, puis est métabolisé par les estérases intracellulaires en ester de succinimidyl carboxyfluorescéine fluorescent. Ce produit moins lipophile reste dans la cellule où il interagit fortement avec les groupements amines de molécules intracellulaires. Lors la division d'une cellule mère marquée par le CFSE, le signal d'intensité de fluorescence se répartit entre les deux cellules filles.

3.2. Protocole

Les cellules (10⁷ par tube) sont centrifugées 8 minutes à 405 g puis reprises dans 500 µL de PBS (tampon phosphate salin) avec 0,1 % d'albumine de sérum bovin et marquées par du CFSE à 20 µM (C34554, Invitrogen) volume à volume pendant 10 minutes à 37 °C. Le marquage est arrêté par ajout de 5 volumes de milieu de culture froid et une incubation

de 5 minutes dans la glace. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du milieu de culture par centrifugation 8 minutes à 405 g.

Les cellules marquées sont ensemencées en plaque de 24 puits (5×10^5 par puits) dans un volume final de 500 μL de RPMI supplémenté en antibiotiques et 1 % de SVF, ou bien en plaque de 6 puits en cas de co-culture et sont cultivées pendant 3 jours à 37 °C dans une étuve à 5 % de CO_2 . Les composés sont ajoutés dans le milieu de culture toutes les 24 heures.

L'intensité de fluorescence du CFSE est mesurée sur le cytomètre en flux LSR II (BD) à partir de 250 μL de suspension cellulaire prélevés 24, 48 et 72 heures après le marquage. À l'aide du logiciel BD FACS Diva 7.0, les cellules vivantes sont sélectionnées par fenêtrage sur le graphe FSC/SSC (Figure 14) et jusqu'à 10 000 cellules vivantes sont analysées.

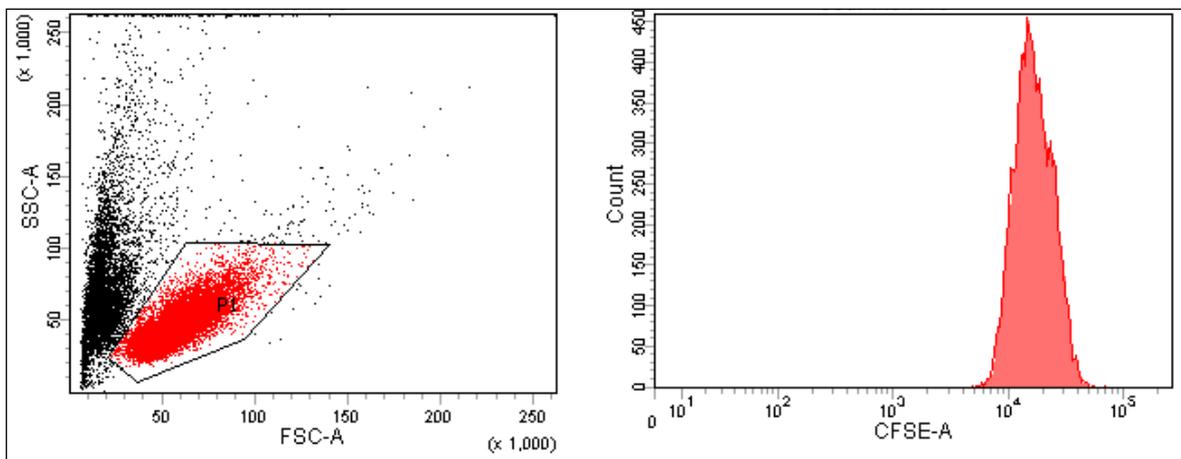


Figure 14. Exemple d'analyse CFSE. La population cellulaire d'intérêt (P1 en rouge) est sélectionnée sur le graphe FSC/SSC. L'histogramme représente l'intensité de fluorescence du CFSE en fonction du nombre de cellules de la population P1.

3.3. Mise au point et exploitation des données

Lors de nos expériences, nous avons obtenu plusieurs fois un seul pic sur l'histogramme représentant l'intensité de fluorescence du CFSE en fonction du nombre de cellules sélectionnées (Figure 14), ce qui signifie que les cellules se divisent probablement toutes à la même vitesse. Lorsque nous avons plusieurs pics sur l'histogramme, le rapport de l'intensité de fluorescence entre 2 pics a paru correspondre à un facteur 2, sachant que l'acquisition logarithmique du signal CFSE rend difficile l'évaluation précise de ce rapport (Figure 15). Ainsi, nous avons établi que chaque pic représente une division cellulaire.

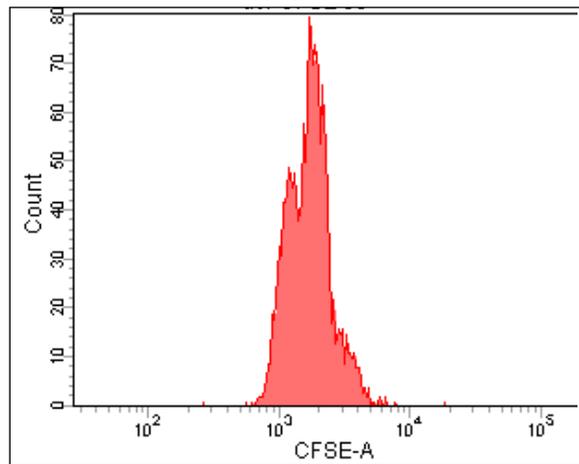


Figure 15. Exemple d'histogramme de CFSE à plusieurs pics.

Nous avons effectué des superpositions d'histogrammes de CFSE pour vérifier la décroissance de l'intensité de fluorescence du CFSE au cours du temps (Figure 16).

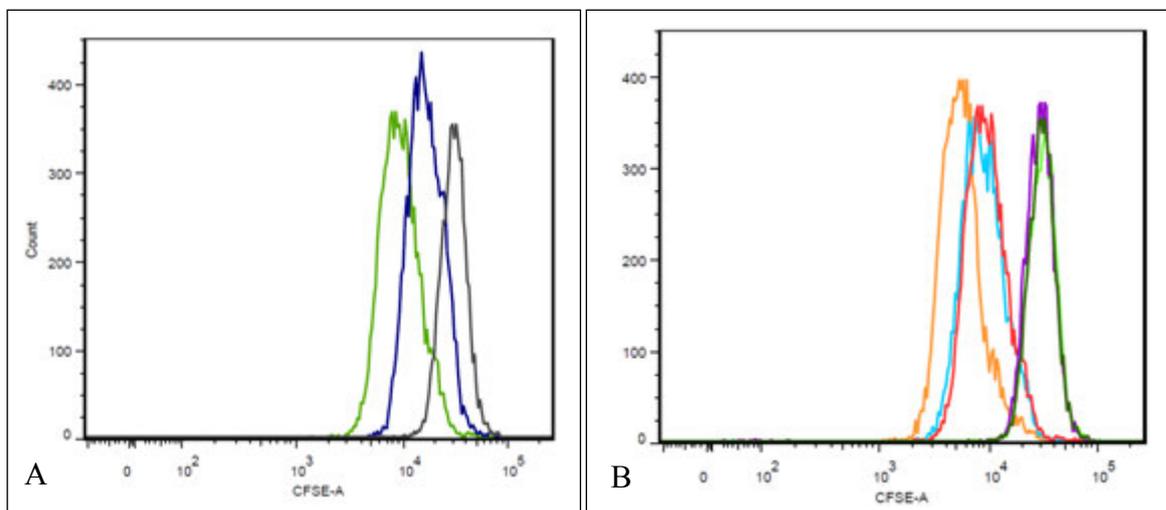


Figure 16. Superpositions de plusieurs histogrammes de CFSE. (logiciel Flow Jo[®]) Le graphe A représente la superposition des histogrammes de CFSE des cellules Jurkat 24 (gris), 48 (bleu) et 72 heures (vert) après le marquage. Le graphe B représente la superposition des histogrammes de CFSE des cellules Jurkat 72 heures après le marquage seules (rouge), en présence de hMAD (bleu), en présence de hMAD différenciées (orange) et 24 heures après le marquage pour ces 3 conditions (violet et verts).

On constate qu'il est difficile de quantifier le passage d'une division à une autre comme les histogrammes se chevauchent. C'est pour cette raison que nous avons interprété les résultats à l'aide de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) qui est influencée par la répartition des cellules d'un pic à l'autre selon leur nombre de divisions cellulaires. Ainsi, une diminution de la MFI correspond à une accélération de la division cellulaire c'est-à-dire une prolifération cellulaire, alors qu'une augmentation de la MFI correspond à un retard de division c'est-à-dire un effet cytostatique. Afin de comparer plusieurs expériences entre elles, les résultats sont rapportés à une « MFI standardisée du CFSE » correspondant

au ratio de la MFI du CFSE d'une condition expérimentale donnée par rapport à la MFI du CFSE des mêmes cellules 24 heures après le marquage CFSE en absence de traitement.

$$\text{MFI standardisée du CFSE} = \frac{\text{MFI}_{\text{condition testée}}}{\text{MFI}_{\text{à J1 condition basale}}} \times 100 \%$$

Les résultats sont présentés sous forme de graphiques présentant la MFI standardisée du CFSE en fonction du temps après marquage par le CFSE.

4. Détection de la mort cellulaire par marquage au DAPI

4.1. Principe

La mort des cellules cancéreuses est établie à l'aide du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) par cytométrie en flux. Il s'agit d'une molécule fluorescente capable de se lier à l'ADN et qui entre davantage dans les cellules mortes présentant des membranes plus perméables que les cellules vivantes.

4.2. Protocole

La détection de la mort cellulaire s'effectue en même temps que celle de la prolifération cellulaire. L'intensité de fluorescence du DAPI est mesurée sur le cytomètre en flux LSR II (BD) à partir de 250 μL de suspension cellulaire prélevés 24, 48 et 72 heures après le marquage CFSE et dilués dans une solution de DAPI à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1050, Euromedex). A l'aide du logiciel BD FACS Diva 7.0, la population d'intérêt comprenant les cellules vivantes et les cellules mortes est sélectionnée par fenêtrage sur le graphe FSC/SSC (Figure 17) et jusqu'à 10 000 cellules sont analysées.

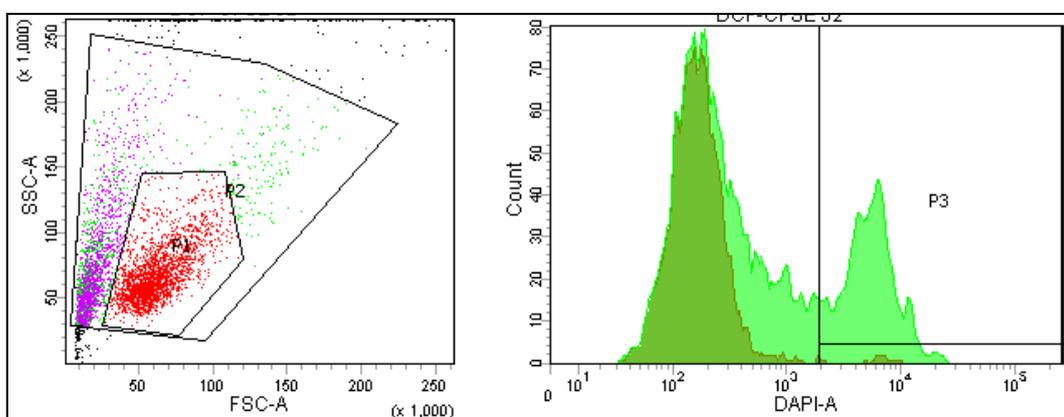


Figure 17. Exemple d'analyse DAPI. La population cellulaire totale (P2 en vert) est sélectionnée sur le graphe FSC/SSC. L'histogramme représente l'intensité de fluorescence du DAPI en fonction du nombre de cellules de la population P2. Les cellules vivantes (P1 en rouge) présentent une intensité de fluorescence faible pour le DAPI, alors que les cellules mortes (P3 en rose sur le graphe FSC/SSC) présentent une intensité de fluorescence forte.

4.3. Exploitation des données

Les cellules mortes ont une intensité de fluorescence forte pour le DAPI et le pourcentage de cellules mortes est obtenu par rapport au nombre total de cellules (Figure 17). Les résultats sont présentés sous forme de graphiques présentant le pourcentage de cellules mortes en fonction du temps après marquage par le CFSE.

5. Expression génique par extraction d'ARN et RT-PCR quantitative

5.1. Principe

L'étude de l'expression des gènes est effectuée par RT-PCR (transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne) après extraction de l'ARN total du culot cellulaire. Plus précisément, l'ARN messager (ARNm) est transformé en ADN complémentaire (ADNc) plus stable par l'enzyme transcriptase inverse. Cet ADNc est ensuite amplifié et quantifié par une PCR quantitative spécifique de chaque gène d'intérêt. Le contrôle endogène utilisé est le gène de l'ARN ribosomal 18S. Son expression génique est supposée être la même pour tous les échantillons.

5.2. Protocole

L'ARN total est extrait à partir des culots cellulaires à l'aide du kit RNEasy Minikit (Qiagen). L'ADNc est obtenu par action de la reverse-transcriptase M-MLV à 200 U/ μ L (Invitrogen) pendant 1 heure à 37 °C à partir d'un maximum de 4 μ g d'ARN. Le mix comprend 0,6 μ g d'amorces Random primers (Invitrogen), du Tampon 5X (Invitrogen), 10 mM d'un mélange des 4 désoxyribonucléotides dNTP (Invitrogen), 10 mM de dithiothreitol (Invitrogen) et de l'eau traitée par du diéthyl-pyrocabonate (Euromedex) dans un volume final de 20 μ L par réaction.

La réaction de PCR quantitative a lieu sur l'appareil LightCycler 2.0 (Roche) en utilisant 1,67 μ L d'ADNc obtenu dans un volume final de 6,67 μ L de tampon réactionnel. Le tampon réactionnel de la PCR de l'ARN ribosomal 18S comporte 0,37 μ L du mélange des amorces sens et anti-sens de l'ARN ribosomal 18S et de la sonde d'hybridation (Applied Biosystems), du Tampon 10X (Invitrogen), 19,5 μ M d'un mélange des 4 dNTP (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen) et 1,27 μ L de Taq polymérase produite dans notre laboratoire. Le tampon réactionnel de la PCR des gènes d'intérêt comporte 255 nM d'amorce sens et 255 nM d'amorce anti-sens (Tableau 5), 20 mM de MgCl₂ (Roche), 100

nM de sonde Taqman (Invitrogen) et 0,67 μ L de LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche).

Le programme de PCR correspond à 8 minutes de dénaturation initiale à 95 °C, suivies de 50 cycles de PCR (15 secondes de dénaturation à 95 °C, 5 secondes d'hybridation à 58 °C et 10 secondes de polymérisation à 72 °C). Les courbes de fusion sont obtenues en passant de 65 °C à 95 °C par palier de 0,1 °C et en faisant l'acquisition de l'intensité de fluorescence en continu.

Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative des gènes cibles.

Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')	Taille de l'amplicon
<i>ADORA1</i>	GAGCCGGAGGACTATGAGC	CCTGGAAAGCTGAGATGGAG	216 pb
<i>ADORA2A</i>	TCTTCAGTCTCCTGGCCATC	TCCAACCTAGCATGGGAGTC	156 pb
<i>ADORA2B</i>	CTCCATCTTCAGCCTTCTGG	CATGCACAGGTAACCAGCAC	244 pb
<i>ADORA3</i>	TTTCATGTTCCAGCCAAACA	GGGCATCACAATCCACTTCT	233 pb
<i>NT5E</i>	CGCAACAATGGCACAATTAC	CTCGACACTTGGTGCAAAGA	240 pb
<i>ENTPD1</i>	CGCAACAATGGCACAATTAC	TTGCAGAAGGAGGGAGAGAA	250 pb
<i>ADK</i>	TCACCCAAGGGAGAGATGAC	ATAGTGGCCAGCACGGATAC	185 pb
<i>SLC29A1</i>	GCTGGGTCTGACCGTCGTAT	CGTTACAGGGTGCATGATGG	131 pb

5.3. Exploitation des données

La présence d'ADNc des gènes cibles pour chaque échantillon est déterminée par l'analyse des courbes de fusion représentant l'intensité de fluorescence en fonction de la température. Si la courbe de fusion est unimodale, celle de la dérivée primaire réalisée par le logiciel LightCycler (Roche) est en forme de cloche et l'abscisse du maximum correspond à la température de fusion (T_m) spécifique de l'amplicon d'un couple d'amorces (Figure 18).

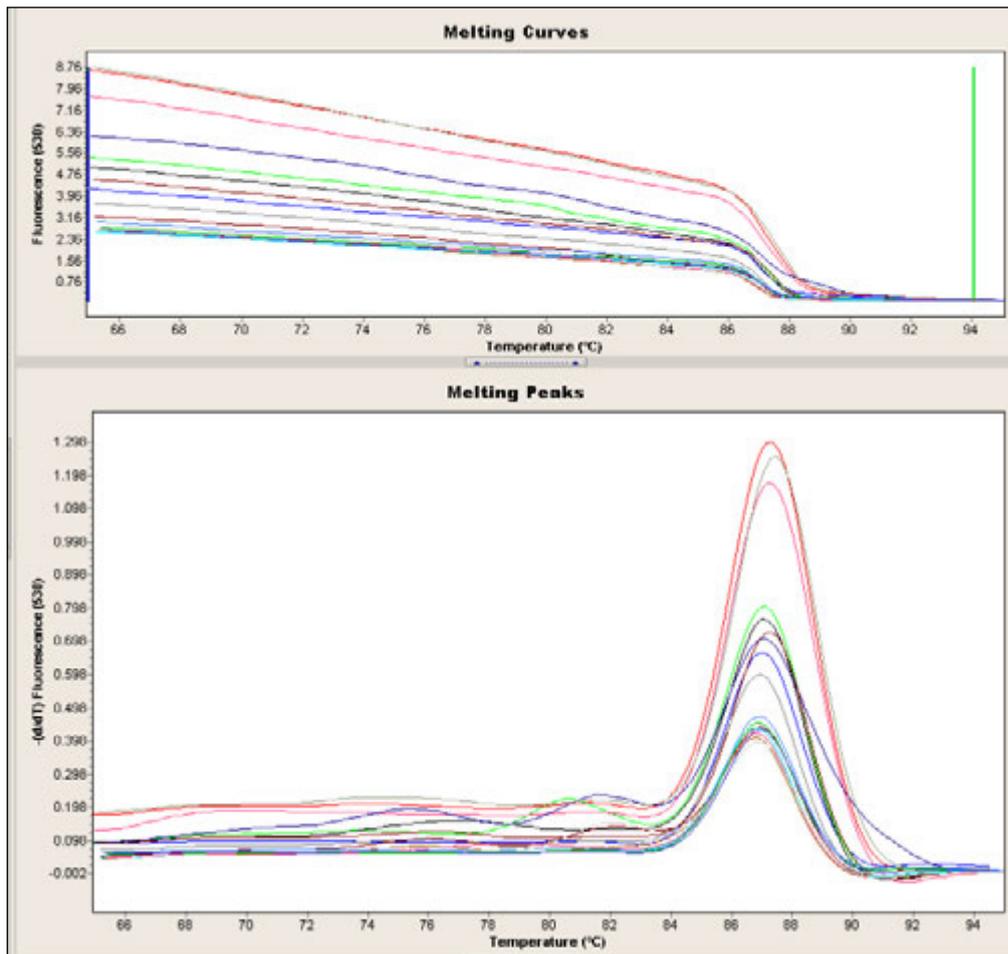


Figure 18. Courbes de fusion et courbes de dérivées primaires d'un couple d'amorces pour différents échantillons (exemple de CD73).

Le niveau d'expression relatif du gène d'intérêt par rapport au gène endogène est calculé par la méthode « $\Delta\Delta C_t$ » à partir des cycles seuil (C_t) obtenus. Le C_t correspond au cycle de PCR auquel l'amplification de fluorescence est détectée. Plus le C_t est élevé, moins il y a d'ADNc dans l'échantillon. Une lignée cellulaire de référence, ou calibrateur, est choisie arbitrairement. Il lui est accordé un niveau de quantification relative (RQ) de 1.

$$\Delta C_t = C_t_{\text{gène}} - C_t_{\text{contrôle endogène}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{échantillon}} - \Delta C_t_{\text{calibrateur}}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Ce calcul revient à la formule suivante, que nous avons employée :

$$RQ = \frac{0,5^{(C_t \text{ échantillon} - C_t \text{ calibrateur}) \text{ gène d'intérêt}}}{0,5^{(C_t \text{ échantillon} - C_t \text{ calibrateur}) \text{ contrôle endogène}}}$$

6. Expression protéique par cytométrie en flux

6.1. Principe

L'expression des protéines d'intérêt est obtenue par utilisation d'anticorps spécifiques marqués à un fluorochrome pouvant être détectés par cytométrie en flux.

La spécificité des anticorps anti-AdoR est contrôlée par l'isotype IgG_{2a} pour l'anticorps anti-AdoRA2A, IgG_{1κ} pour les anticorps anti-AdoRA1/A2B/A3 et IgG_{2b} pour l'anticorps anti-CD39. La spécificité des anticorps anti-CD73, déjà établie au laboratoire, n'a pas été contrôlée de nouveau.

6.2. Protocole

Les cellules (5×10^5 par tube) sont lavées 2 fois avec du PBS et reprises dans 100 µL de PBS. Les anticorps anti-CD73 et anti-CD39 sont préalablement marqués par un fluorochrome par le fabricant et les anticorps anti-AdoR (40 µg) sont marqués à l'aide du kit AbD Serotec (FITC LNK061F, APC LNK032APC) (Tableau 6).

Les cellules sont incubées avec les anticorps pendant 30 minutes à 4 °C, lavées avec du PBS puis l'intensité de fluorescence est mesurée sur le cytomètre en flux LSRII (BD). A l'aide du logiciel BD FACS Diva 7.0, les cellules vivantes sont sélectionnées par fenêtrage sur le graphe FSC/SSC et jusqu'à 10 000 cellules vivantes sont analysées.

Tableau 6. Anticorps et conditions utilisés pour l'étude par cytométrie en flux.

	Anticorps	Quantité	Fluorochrome
Anti-AdoRA1	Lapin polyclonal (Santa cruz biotechnology, H-40)	0,83 µg	APC
Anti-AdoRA2A	Souris IgG _{2a} (Santa cruz biotechnology, 7F6-G5-A2)	3,32 µg	FITC
Anti-AdoRA2B	Lapin polyclonal (Santa cruz biotechnology, H-40)	0,83 µg	APC
Anti-AdoRA3	Lapin polyclonal (Santa cruz biotechnology, H-40)	0,83 µg	APC
Anti-CD73	Souris IgG ₁ (BD, 561254)	5 µL par test	FITC
Anti-CD39	Souris IgG _{2b} (BD, 560239)	20 µL par test	APC
Isotypes	IgG _{2a} (BD, 349041)	0,5 µg	FITC
	IgG _{1κ} (BD, 555751)	10 µL par test	APC

6.3. Exploitation des données

A chaque analyse, l'histogramme de fluorescence de la population cellulaire d'intérêt présente un seul pic de fluorescence homogène. De ce fait, les MFI ont été considérées comme représentatives du niveau d'expression protéique. Les MFI en présence d'anticorps spécifiques sont comparées à celles en présence d'isotypes ou à l'auto-fluorescence des cellules.

7. Activité enzymatique de CD73

7.1. Principe

La détermination de l'activité enzymatique de l'enzyme CD73 est basée sur la mesure de la quantité de phosphate inorganique produit par la réaction de déphosphorylation de son substrat AMP par méthode colorimétrique au vert de malachite.

7.2. Protocole

Les cellules sontensemencées en plaque de 24 puits (5×10^4 par puits) et adhèrent aux puits lors d'une incubation de 24 heures à 37 °C dans un étuve à 5 % de CO₂. Elles sont ensuite lavées deux fois avec du tampon CD73 (2 mM de MgCl₂, 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM de dextrose, 20 mM d'Hepes pH 7,4) et sont incubées 30 minutes à 37 °C avec 250 µL de tampon CD73 contenant 1 mM d'AMP. Le surnageant du milieu réactionnel (80 µL) est déposé en duplicat en plaque de 96 puits puis le phosphate inorganique (Pi) libéré au cours de la réaction enzymatique de 30 minutes à température ambiante est quantifié par colorimétrie avec le réactif révélateur du Malachite green Phosphate Assay Kit (Bioassay). La densité optique est déterminée à 595 nm avec le lecteur Multiskan Ex (Thermo Electron Corporation).

Le contrôle négatif correspond à un puits sans AMP. Une gamme d'étalonnage de phosphate est effectuée en utilisant un sel de phosphate.

Le nombre de cellules vivantes par puits est estimé en incubant les cellules pendant 2 heures à 37 °C avec 5 mg/mL de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT). Les cristaux de formazan formés par action de la succinate déshydrogénase mitochondriale sont dissociés dans de l'isopropanol/eau/HCl (v/v/v 90/9/1) et sont quantifiés par colorimétrie. La densité optique, proportionnelle à la quantité de cellules vivantes impliquées dans l'activité CD73, est déterminée à 540 nm avec le lecteur Multiskan Ex.

7.3. Exploitations des données

L'activité enzymatique de CD73 est calculée avec la formule suivante :

$$\text{Activité CD73} = \frac{\text{quantité de Pi formé (nmol)}}{\text{temps (minutes)} \times \text{nombre relatif de cellules vivantes dans le puits (DO MTT)}}$$

8. Détection de la phosphorylation d'ERK-1/2 par cytométrie en flux

8.1. Principe

L'activation des récepteurs de l'adénosine peut induire en aval la cascade de phosphorylation des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPKs) (Figure 7), dont les MAPKs ERK-1/2. Nous avons utilisé un anticorps spécifique de la forme phosphorylée des ERK-1/2 (p-ERK) marqué par un fluorochrome afin de détecter de l'activation des récepteurs de l'adénosine par cytométrie en flux.

8.2. Protocole

Les cellules sont incubées ($6,6 \times 10^6$ dans 10 mL) dans un milieu de privation nutritionnelle (milieu RPMI supplémenté en antibiotiques et 1 % de SVF) pendant une nuit à 37 °C dans une étuve à 5 % de CO₂. Ensuite, les cellules sontensemencées dans une plaque de 96 puits (10^4 par puits) et incubées 1 heure à 37 °C. Les cellules sont alors exposées au potentiel activateur des récepteurs de l'adénosine à 37 °C pendant un temps déterminé par une cinétique de réponse de l'activation de p-ERK après ajout de l'adénosine (de 0,5, 2, 5, 10 à 20 minutes après addition) à 37 °C. Les cellules sont ensuite fixées par 100 µL de Cytifix Buffer (BD Biosciences), incubées 10 minutes à 37 °C et centrifugées 5 minutes à 300 g. Après retrait du surnageant, les cellules sont perméabilisées par 100 µL de Perm Buffer III (BD Biosciences), incubées 20 minutes à température ambiante et centrifugées 5 minutes à 300 g. Ensuite, les cellules sont lavées par du PBS avec 1 % de SVF et sont incubées avec 50 µL d'une dilution au 1/50^e de l'anticorps marqué au FITC (anticorps phospho-p44/42 MAPK (ERK-1/2) (Thr202/Tyr204) (E10), Cell signaling) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont lavées avec 150 µL de PBS avec 1 % de SVF et l'intensité de fluorescence du FITC est mesurée sur le cytomètre en flux LSRII (BD). A l'aide du logiciel BD FACS Diva 7.0, les cellules vivantes sont sélectionnées par fenêtrage sur le graphe FSC/SSC et jusqu'à 10 000 cellules vivantes sont analysées.

Le contrôle positif est le phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) (Promega) à 10 ng/mL qui active la voie des MAPKs.

8.3. Exploitation des données

A chaque analyse, l'histogramme de fluorescence de la population cellulaire d'intérêt présente un seul pic de fluorescence homogène. De ce fait, les MFI ont été considérées comme représentatives du niveau d'activation de la voie de phosphorylation d'ERK-1/2. La cinétique de réponse à l'adénosine nous a permis de voir que l'activation de cette voie était rapide et maximale 2 minutes après l'ajout d'adénosine.

9. Traitement des données et analyses statistiques

La plupart des graphiques représente la moyenne +/- l'écart type de plusieurs expériences indépendantes (n). Les analyses statistiques sont effectuées avec le test *t* de Student du logiciel Microsoft Excel 2007 pour $n \geq 3$ et les résultats sont considérés comme significatifs pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***)).

RÉSULTATS

1. Effet des adipocytes sur la progression des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique

Nous avons étudié l'effet de différentes cellules adipeuses (pré-adipocytes hMAD et ASC, adipocytes hMAD différenciées) ou du surnageant de culture des hMAD sur la prolifération et la mort de lignées onco-hématologiques.

1.1. Effet des pré-adipocytes hMAD

1.1.1. Prolifération cellulaire

L'effet des pré-adipocytes hMAD sur la prolifération des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique a été évalué en présence de 10 % et 1 % de SVF (Figures 19 et 20).

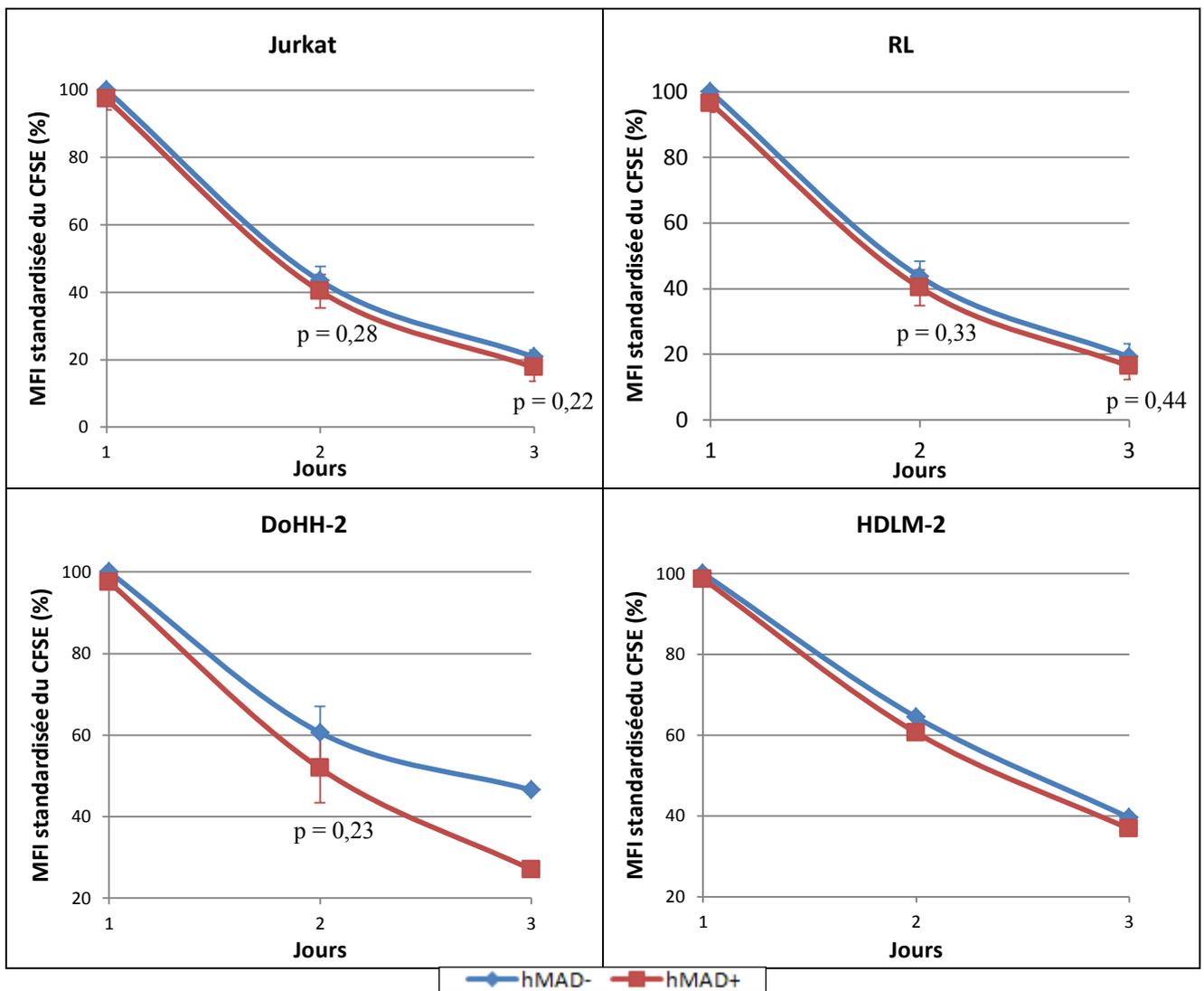


Figure 19. Effet des pré-adipocytes hMAD sur la prolifération cellulaire en présence de 10 % de SVF. (n = 1 à 6)

Dans un milieu de culture avec 10 % de SVF, les cellules Jurkat, RL, DoHH-2 et HDLM-2 prolifèrent davantage en présence de pré-adipocytes qu'en leur absence. L'effet prolifératif des cellules hMAD est très faible sauf pour les cellules DoHH-2. Il est non statistiquement significatif mais néanmoins reproductible.

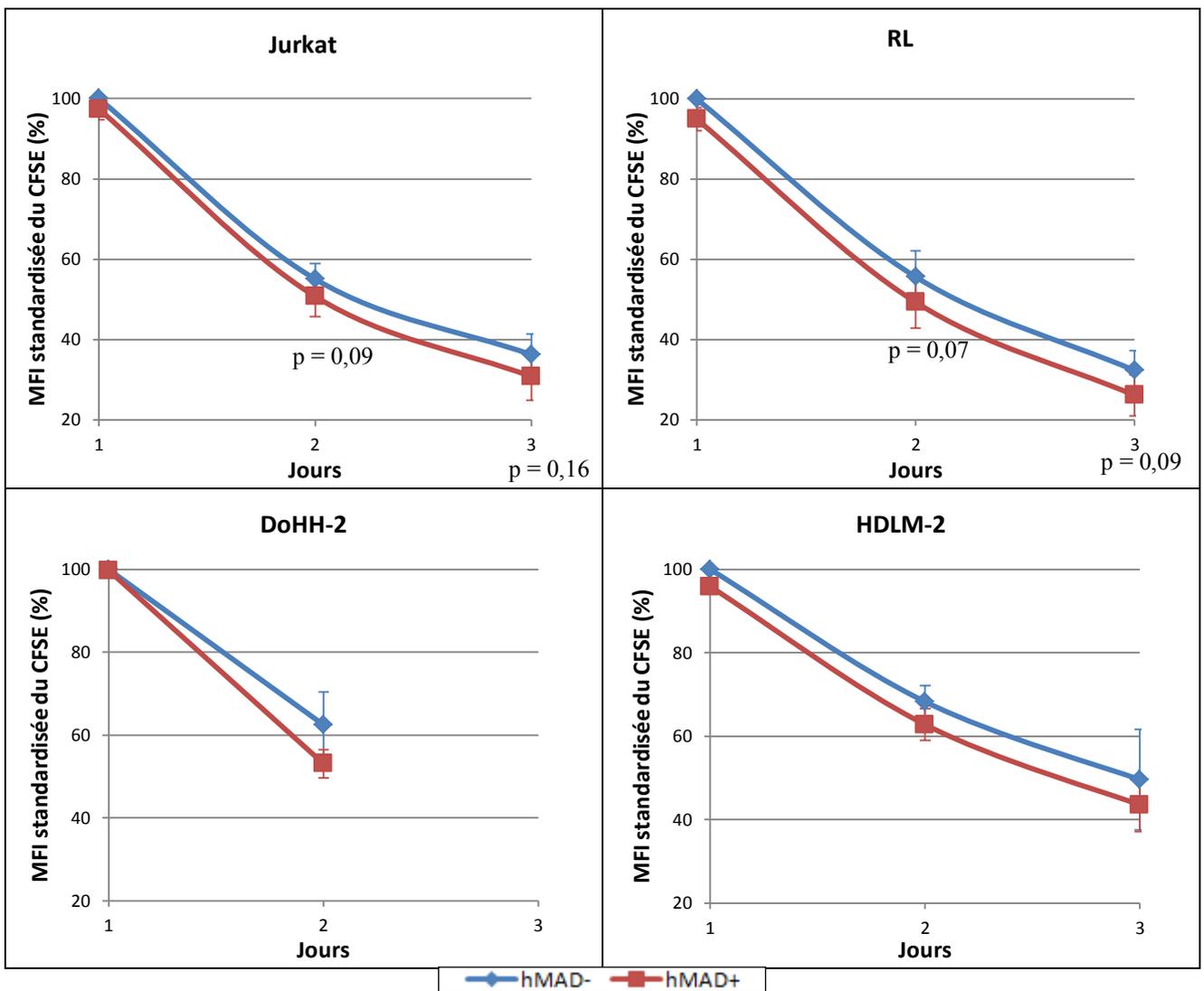


Figure 20. Effet des pré-adipocytes hMAD sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 2 à 8)

La même expérience a été réalisée avec 1 % de SVF pour minimiser l'éventuelle métabolisation de l'adénosine par des enzymes sériques. Dans ces conditions, les cellules prolifèrent moins vite qu'avec 10% de SVF comme l'action nutritive du SVF est limitée. D'autre part, l'effet prolifératif des cellules hMAD est plus marqué avec 1 % de SVF qu'avec 10 % de SVF mais reste non statistiquement significatif.

1.1.2. Mort cellulaire

L'effet des pré-adipocytes hMAD sur la mort des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique a été évalué en présence de 10 % de SVF et de 1 % de SVF (Figures 21 et 22).

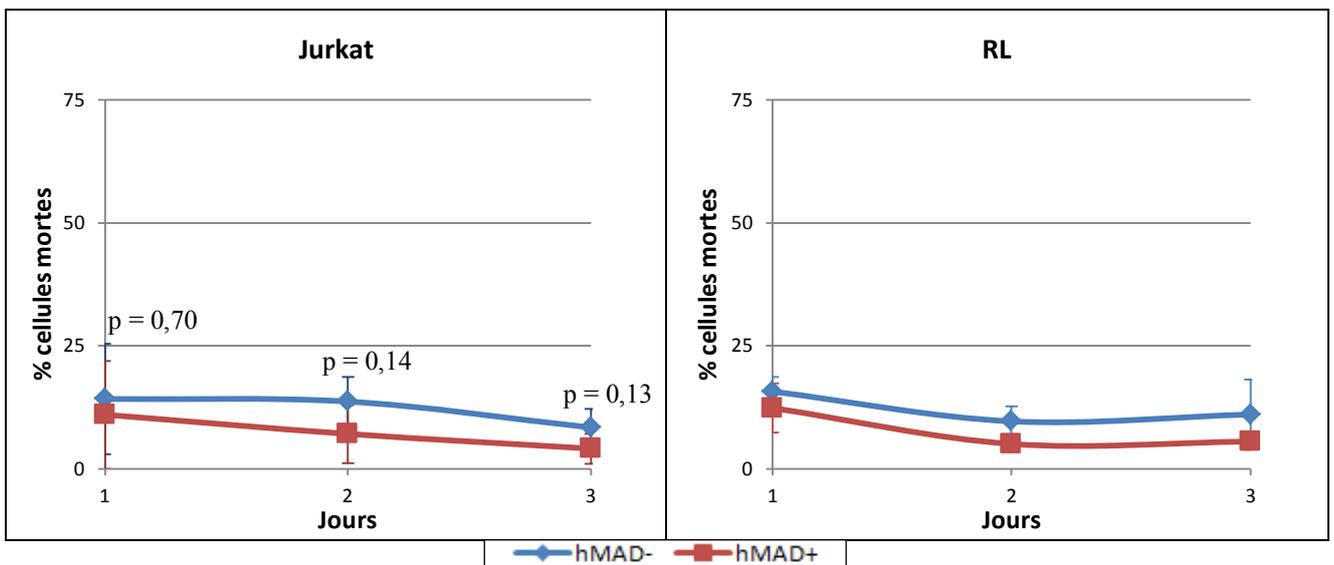


Figure 21. Effet des pré-adipocytes hMAD sur la mort cellulaire en présence de 10 % de SVF. (n = 2 à 4)

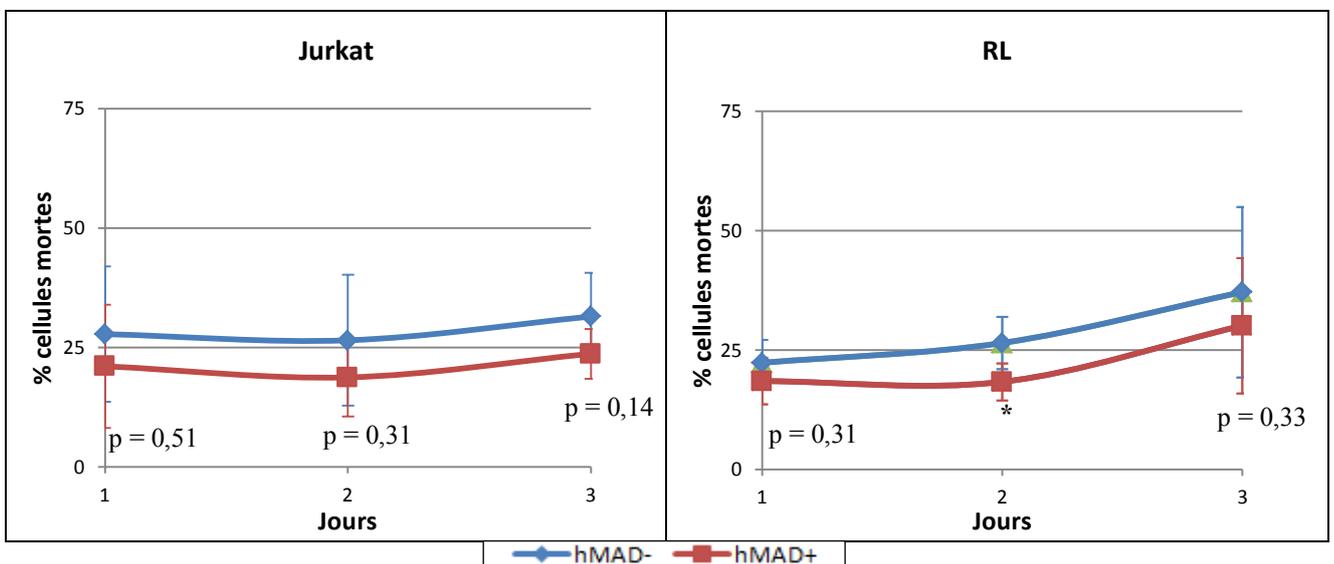


Figure 22. Effet des pré-adipocytes hMAD sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 2 à 5)

On remarque qu'il y a plus de cellules mortes en présence de 1 % de SVF plutôt que de 10 % de SVF pour les cellules Jurkat et RL, ce qui s'explique par l'effet nutritif du SVF. La co-culture des cellules cancéreuses avec les pré-adipocytes hMAD a tendance à diminuer le pourcentage de mortalité spontanée des cellules Jurkat et RL en présence de 10 et de 1 % de SVF. Cet effet protecteur des cellules hMAD n'apparaît pas avec les cellules DoHH-2 en présence de 10 % SVF, ni avec les cellules HDLM-2 en présence de 1 % ou 10 % de SVF (données non présentées).

1.2. Effet des pré-adipocytes ASC

1.2.1. Prolifération cellulaire

L'effet des pré-adipocytes sur la prolifération des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique a été évalué avec une autre lignée pré-adipocytaire, les cellules ASC. Nous avons en premier lieu employé le milieu de culture standard de ces cellules, c'est-à-dire le milieu DMEM F12 qui contient beaucoup d'éléments nutritifs avec 10 % de SVF (Figure 23).

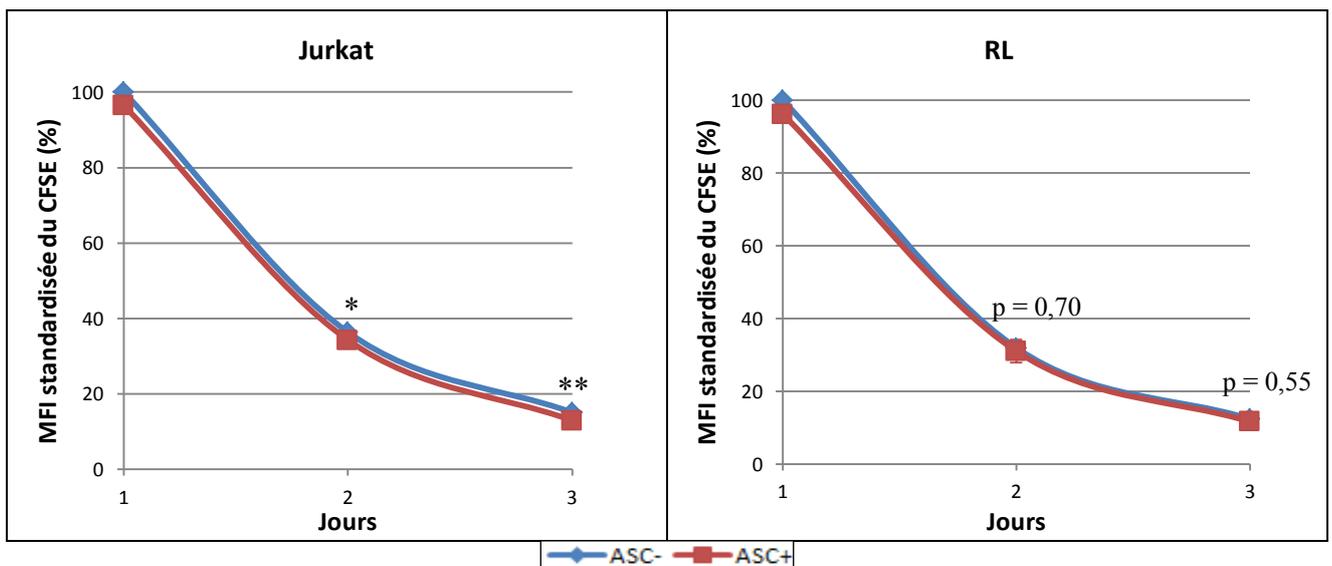


Figure 23. Effet des pré-adipocytes ASC sur la prolifération cellulaire dans un milieu enrichi. (n = 4)

Dans ces conditions, les cellules prolifèrent vite puisque la MFI standardisée du CFSE est autour de 12 % au 3^e jour au lieu de 20 - 25 % dans les résultats précédents. Les cellules ASC n'ont pas d'effet sur les cellules RL et présentent un faible effet prolifératif statistiquement significatif aux 2^e et 3^e jours pour les cellules Jurkat. Nous avons réalisé la même expérience dans des conditions de culture plus restrictives en utilisant le milieu DMEM avec 1 % de SVF (Figure 24).

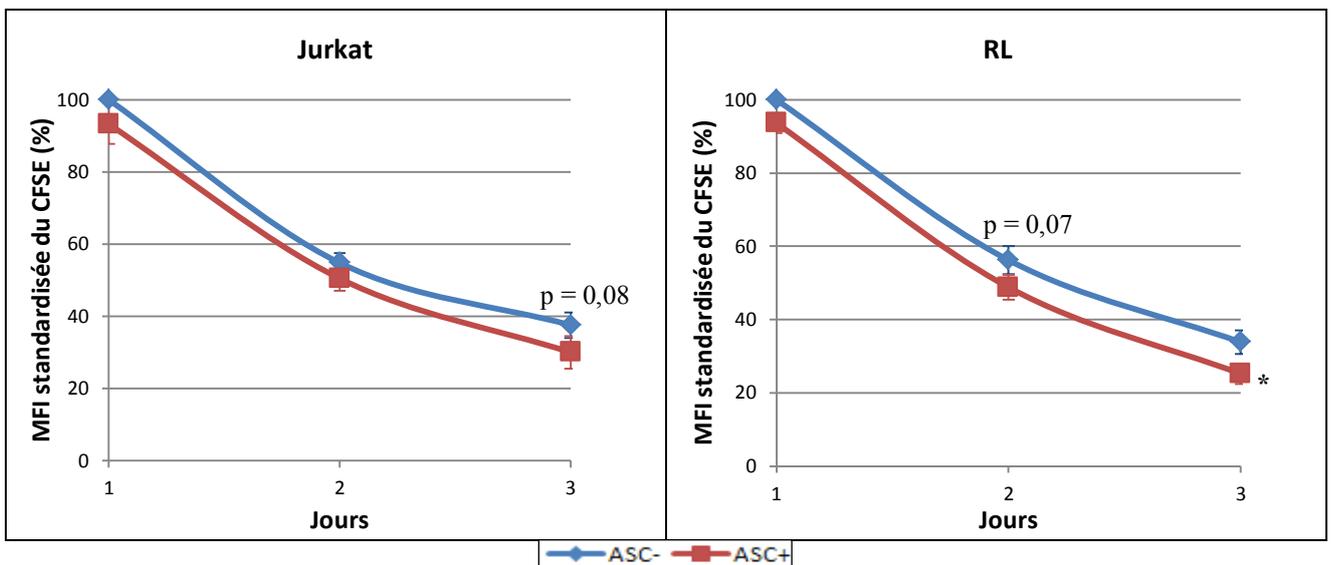


Figure 24. Effet des pré-adipocytes ASC sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 2 à 3)

Dans ces conditions, les cellules prolifèrent moins vite que dans le milieu enrichi puisque le milieu est moins nutritif et on observe une tendance proliférative des cellules ASC sur les cellules Jurkat et RL, statistiquement significative au 3^e jour pour les cellules RL.

1.2.2. Mort cellulaire

L'effet des pré-adipocytes ASC sur la mort des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique a été évalué en milieux enrichi et restrictif avec 1 % de SVF (Figures 25 et 26).

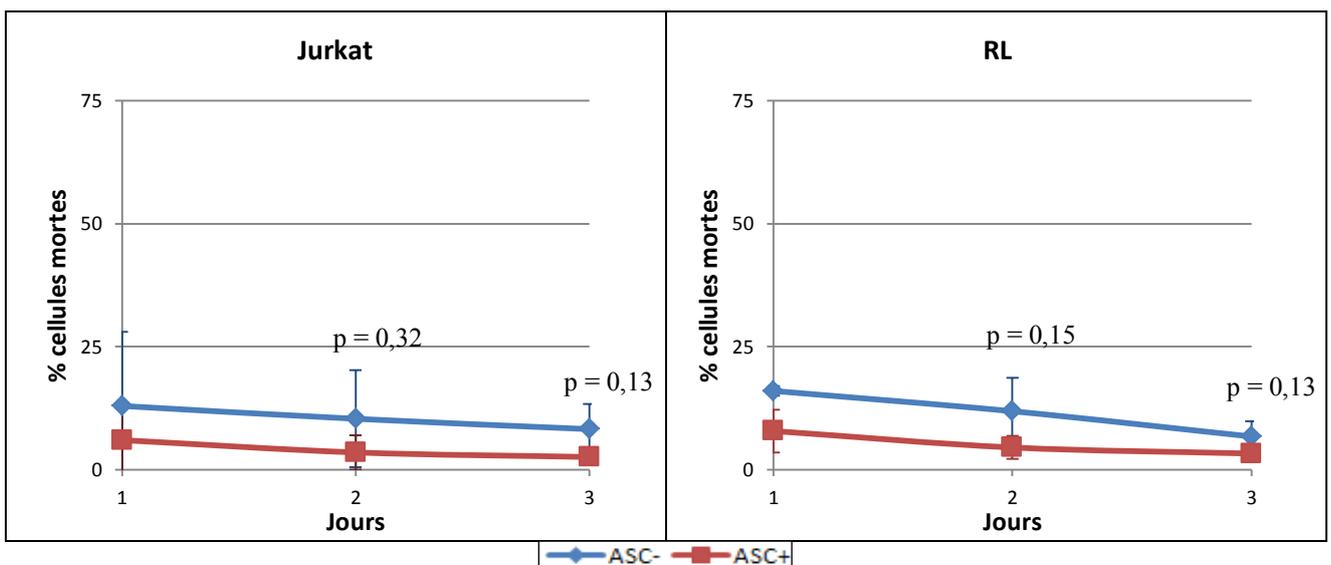


Figure 25. Effet des pré-adipocytes ASC sur la mort cellulaire dans un milieu enrichi. (n = 2 à 3)

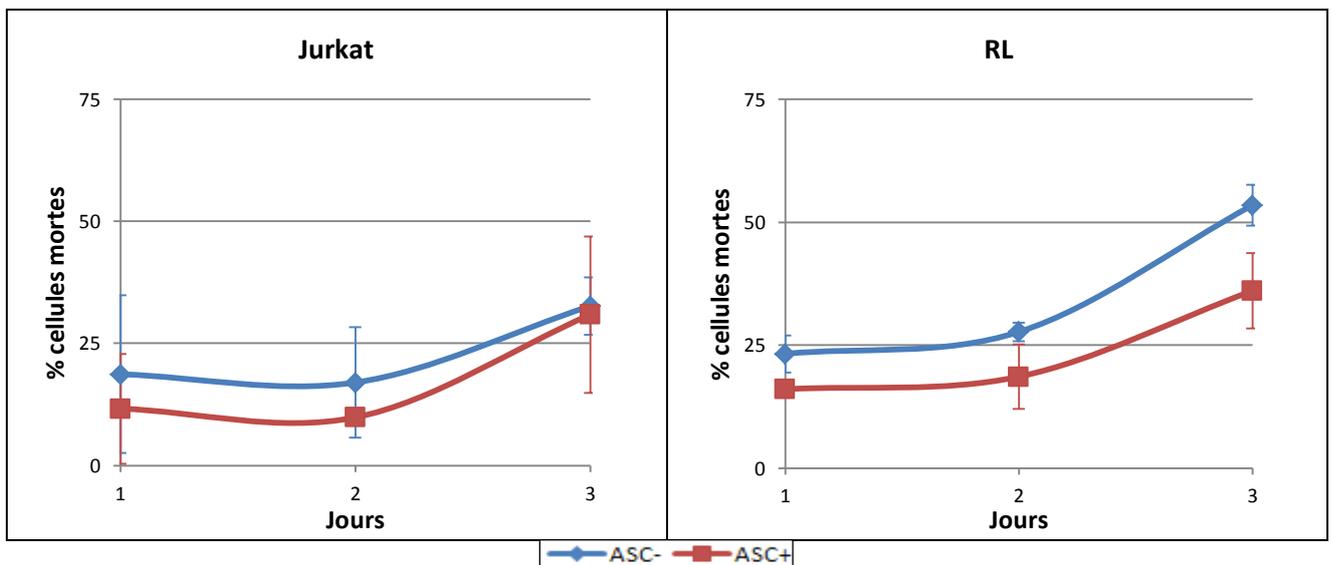


Figure 26. Effet des pré-adipocytes ASC sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 2)

Les pré-adipocytes ASC présentent un effet protecteur contre la mort spontanée des cellules Jurkat et RL, comme les hMAD. Cette tendance est retrouvée dans des conditions de culture où les cellules ASC n'ont pas d'action sur la prolifération des cellules RL (Figure 23), prouvant ainsi que nos méthodes de détection des phénomènes de prolifération et de mort cellulaire sont indépendantes.

Nous avons montré, à partir de deux lignées cellulaires, que les pré-adipocytes ont possiblement un rôle dans la progression tumorale des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.

1.3. Effet des cellules hMAD différenciées en adipocytes

1.3.1. Prolifération cellulaire

L'effet des adipocytes matures sur la prolifération des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique a été évalué avec les cellules hMAD différenciées en adipocytes (hMAD #) dans un milieu enrichi (DMEM F12 avec 10 % de SVF). Dans ces conditions, les adipocytes matures présentent un effet prolifératif minime (données non présentées). La même expérience a été réalisée dans un milieu restrictif pauvre en SVF afin de minimiser l'éventuelle métabolisation de l'adénosine (DMEM avec 1 % de SVF) (Figure 27).

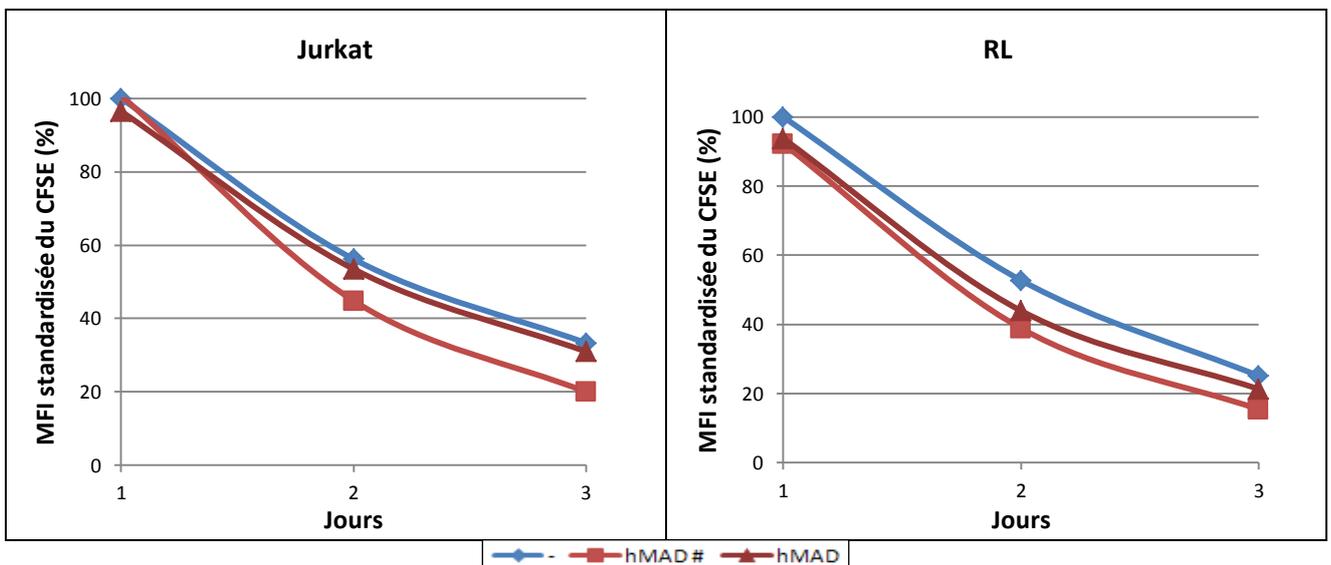


Figure 27. Effet des adipocytes hMAD différenciés sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 1)

Les cellules hMAD différenciées en adipocytes ont une tendance à favoriser la prolifération des cellules cancéreuses notable en milieu restrictif qui est plus importante que celle des pré-adipocytes hMAD.

1.3.2. Mort cellulaire

Les adipocytes matures ne présentent pas d'effet protecteur contre la mort spontanée des cellules Jurkat et RL en milieu enrichi (données non présentées). La même expérience a été réalisée en milieu restrictif (Figure 28).

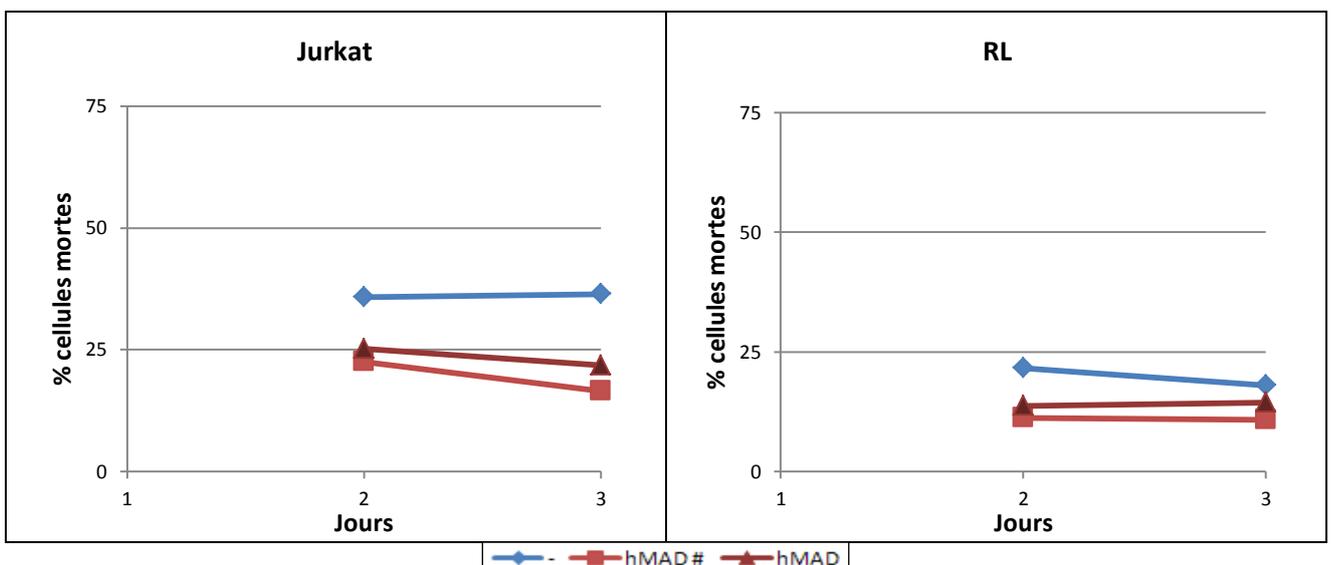


Figure 28. Effet des adipocytes hMAD différenciés sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 1)

Les adipocytes matures présentent une action protectrice contre la mort cellulaire des cellules cancéreuses dans des conditions restrictives qui est plus importante que celle des pré-adipocytes hMAD. Ainsi, notre modèle d'étude avec des cellules pré-adipocytaires est

sûrement représentatif d'un modèle avec des adipocytes matures puisque les effets retrouvés sont de même type dans les deux cas. Nous avons poursuivi nos expériences avec les hMAD non différenciées qui sont plus faciles à cultiver que les hMAD différenciées.

1.4. Effet du milieu conditionné des pré-adipocytes hMAD

Nous avons voulu savoir si les effets des cellules hMAD dépendent d'une molécule soluble présente dans le milieu conditionné des hMAD (hMAD-CM) correspondant au surnageant de culture de ces cellules. Celui-ci n'a qu'un effet minime sur la prolifération et la mort des cellules Jurkat en présence de 10 % de SVF (données non présentées). Les expériences ont été répétées avec 1 % de SVF (Figures 29 et 30).

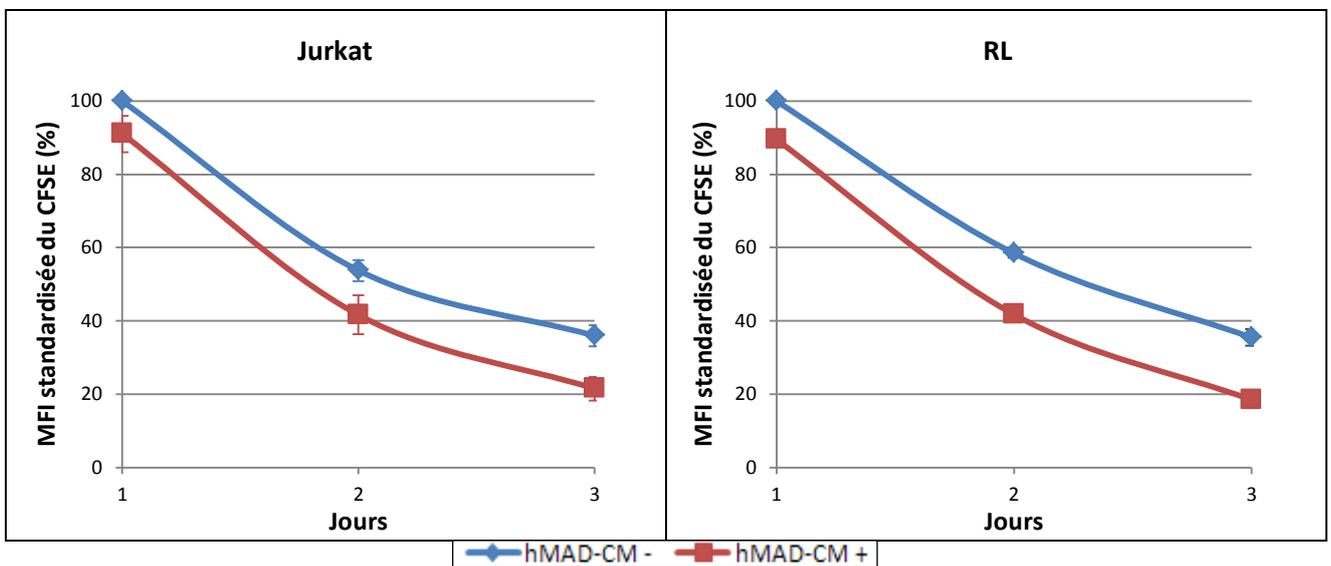


Figure 29. Effet du milieu conditionné de pré-adipocytes hMAD sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 2)

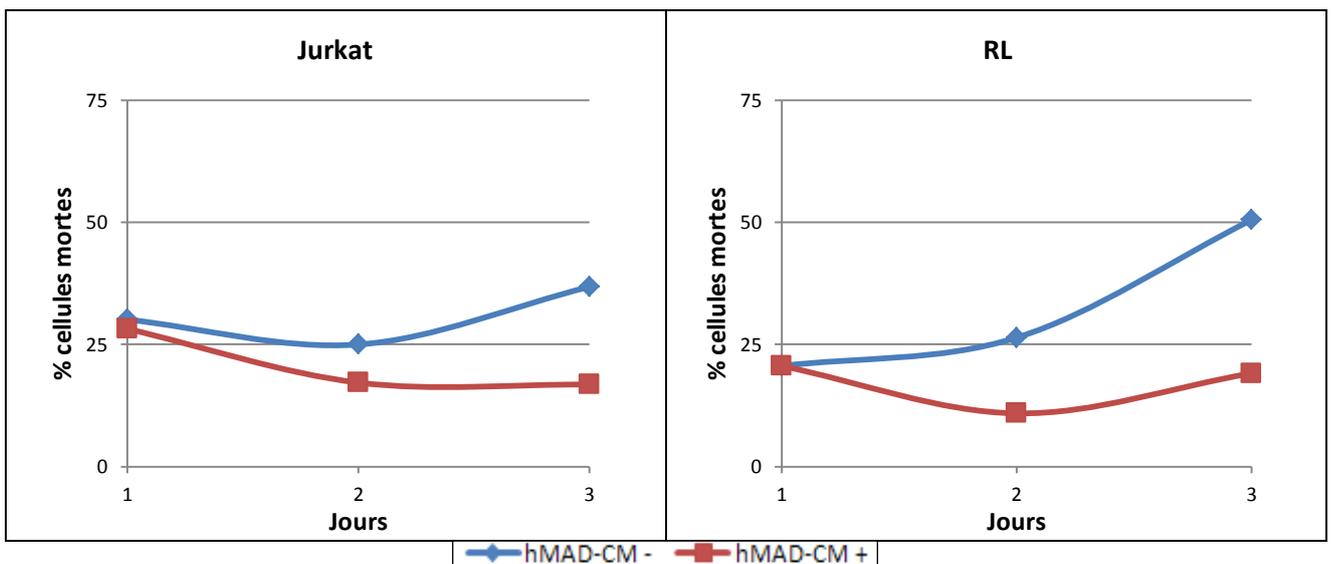


Figure 30. Effet du milieu conditionné de pré-adipocytes hMAD sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 1)

Le milieu conditionné des cellules hMAD induit le même effet prolifératif et protecteur contre la mort spontanée des cellules cancéreuses que lors de la co-culture de celles-ci avec les pré-adipocytes hMAD. Ce résultat suggère que ces effets sont médiés par une molécule soluble et ne nécessitent pas de contact direct entre les cellules.

Ainsi dans cette première partie, nous avons relevé un effet prolifératif et protecteur des cellules adipeuses sur certaines lignées cancéreuses d'origine hématopoïétique.

2. Expression des molécules CD39, CD73, ADK, AdoR et ENT1

Nous avons émis l'hypothèse que les effets des cellules adipeuses sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique sont dus à la production d'adénosine par les cellules adipeuses. Nous avons alors évalué l'expression des molécules de la voie adénosinergique par les cellules étudiées.

2.1. Expressions génique et protéique

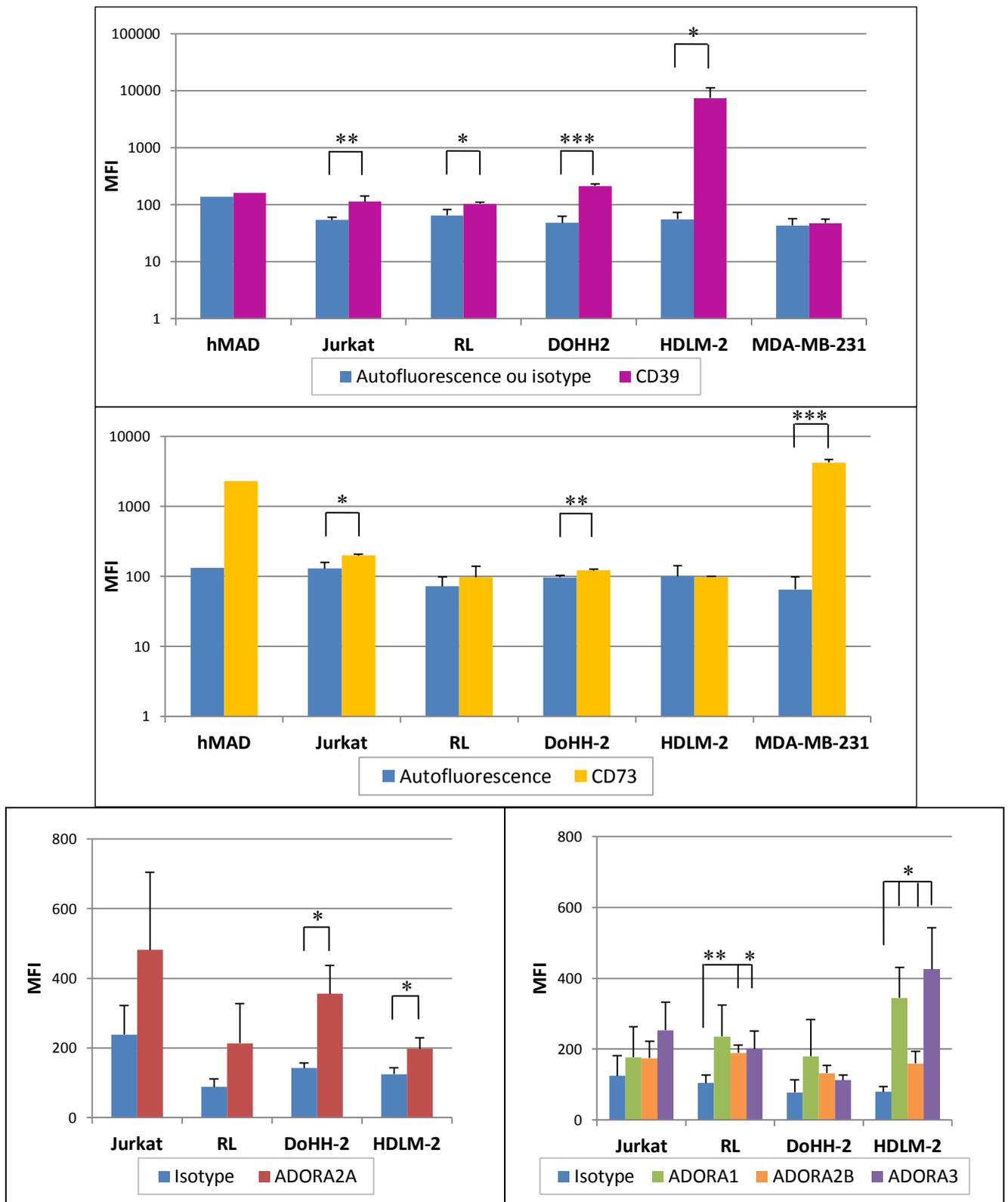
L'expression génique des enzymes CD39 (gène *ENTPD1*), CD73 (gène *NT5E*) et ADK (gène *ADK*), des récepteurs de l'adénosine (gènes *ADORA*) et du transporteur nucléosidique ENT1 (gène *SLC29A1*) a été déterminée par une RT-PCR quantitative. Les niveaux d'expression relatifs des cellules étudiées pour chaque gène d'intérêt sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7. Niveaux d'expression relatifs des gènes des enzymes CD39, CD73 et ADK, des récepteurs de l'adénosine et de ENT1. - : Absence d'expression; + : Expression non quantifiable; 1 : Calibrateur (n = 1).

	<i>ENTPD1</i>	<i>NT5E</i>	<i>ADK</i>	<i>ADORA1</i>	<i>ADORA2A</i>	<i>ADORA2B</i>	<i>ADORA3</i>	<i>SLC29A1</i>
hMAD	-	40	0,2	-	1,6	0,9	-	
Jurkat	+	1	0,9	265	4,4	10,3	2,2	0,06
DoHH-2	1,28	-	0,5	+	10,3	-	3,7	4,2
HDLM-2	1	-	1	1	1	1	1	1
MDA-MB-231	-	221,3	4,9					
RL	-	+	++	+	++	-	-	2

La PCR a été effectuée sur un plus grand panel de cellules que celles présentées dans le tableau et deux groupes d'échantillons ont été obtenus en fonction de leur expression génique de l'ARN ribosomal 18S endogène. De ce fait, nous ne pouvons pas comparer les niveaux d'expression des cellules RL avec ceux des autres cellules étudiées, excepté pour l'expression du gène *ENT1* qui a été déterminée lors d'une expérience indépendante.

L'expression protéique des enzymes CD39 et CD73 et des récepteurs de l'adénosine a été déterminée par cytométrie en flux (Figure 31).



Il existe une concordance entre l'expression génique et l'expression protéique de certaines cibles, comme le CD39. On remarque d'une part que les cellules hMAD et MDA-

MB-231 n'expriment pas CD39 alors que les quatre lignées onco-hématologiques l'expriment. On peut noter d'autre part que l'importante expression protéique de CD39 par les cellules HDLM-2 n'est pas corrélée à l'expression génique. Les résultats d'expression de CD73 concordent également, hormis pour les cellules DoHH-2. L'expression de l'enzyme CD73 par les quatre lignées onco-hématologiques est très faible, voire nulle, par rapport à celle des pré-adipocytes hMAD et des cellules de cancer du sein MDA-MB-231, ces dernières étant le contrôle positif de l'expérience.

Concernant les récepteurs de l'adénosine, il existe plusieurs discordances qui ne permettent pas de conclure sur l'expression de tel ou tel type de récepteur par les lignées cellulaires. Globalement, ils sont fréquemment exprimés par les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique à un faible niveau et de façon variable. Ces cellules peuvent donc interagir avec l'adénosine potentiellement produite par les cellules hMAD via leur enzyme CD73.

On note que le gène *ADK* est exprimé par toutes les cellules étudiées et que le gène du transporteur nucléosidique *ENT1* est exprimé par les quatre lignées onco-hématologiques. L'expression des protéines *ADK* et *ENT1* n'a pas été étudiée.

Ainsi, nous avons obtenu le profil d'expression pour des molécules de la voie adénosinergique des cellules utilisées dans nos expériences afin de vérifier que l'adénosine pouvait être produite par les cellules adipeuses et pouvait agir sur les cellules cancéreuses.

2.2. Activité enzymatique de CD73

Après avoir mis en évidence l'expression de CD73 par les cellules hMAD, nous avons vérifié la fonctionnalité de cette enzyme par mesure de son activité enzymatique à l'aide du test au vert de malachite en présence et en absence du substrat AMP. Les cellules MDA-MB-231 constituent le contrôle positif (Figure 32).

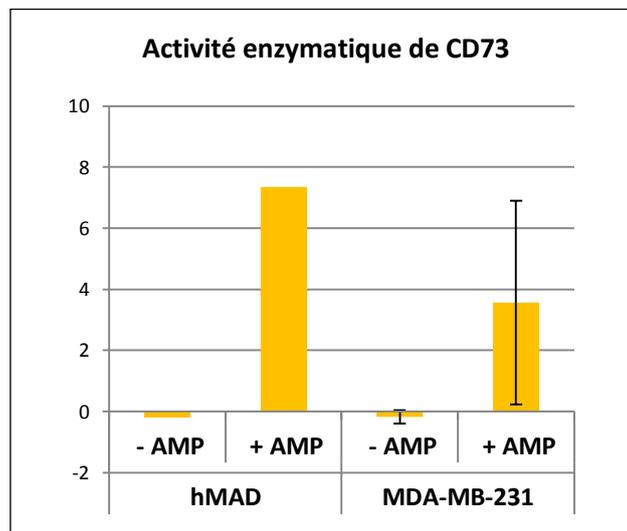


Figure 32. Activité enzymatique de CD73. (n = 1 pour hMAD et n = 12 pour MDA-MB-231).

Les cellules hMAD expriment une enzyme CD73 fonctionnelle capable d'hydrolyser l'AMP en phosphate inorganique et en adénosine.

Ainsi, dans le microenvironnement que nous avons produit dans nos expérimentations, les enzymes CD39 et CD73 et les récepteurs de l'adénosine sont présents. De ce fait, l'effet des adipocytes sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique peut potentiellement passer par le système adénosinergique.

3. Evaluation du rôle de l'adénosine dans l'interaction entre pré-adipocytes et cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique

3.1. Prolifération cellulaire

Pour savoir si l'effet prolifératif des pré-adipocytes hMAD sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique est médié par la production d'adénosine via l'enzyme CD73, nous avons modulé l'activité de cette enzyme. Nous avons alors utilisé l'APCP et l'AMP, respectivement inhibiteur et substrat de l'enzyme CD73, dans des conditions de co-culture restrictives avec 1 % de SVF (Figures 33 et 34).

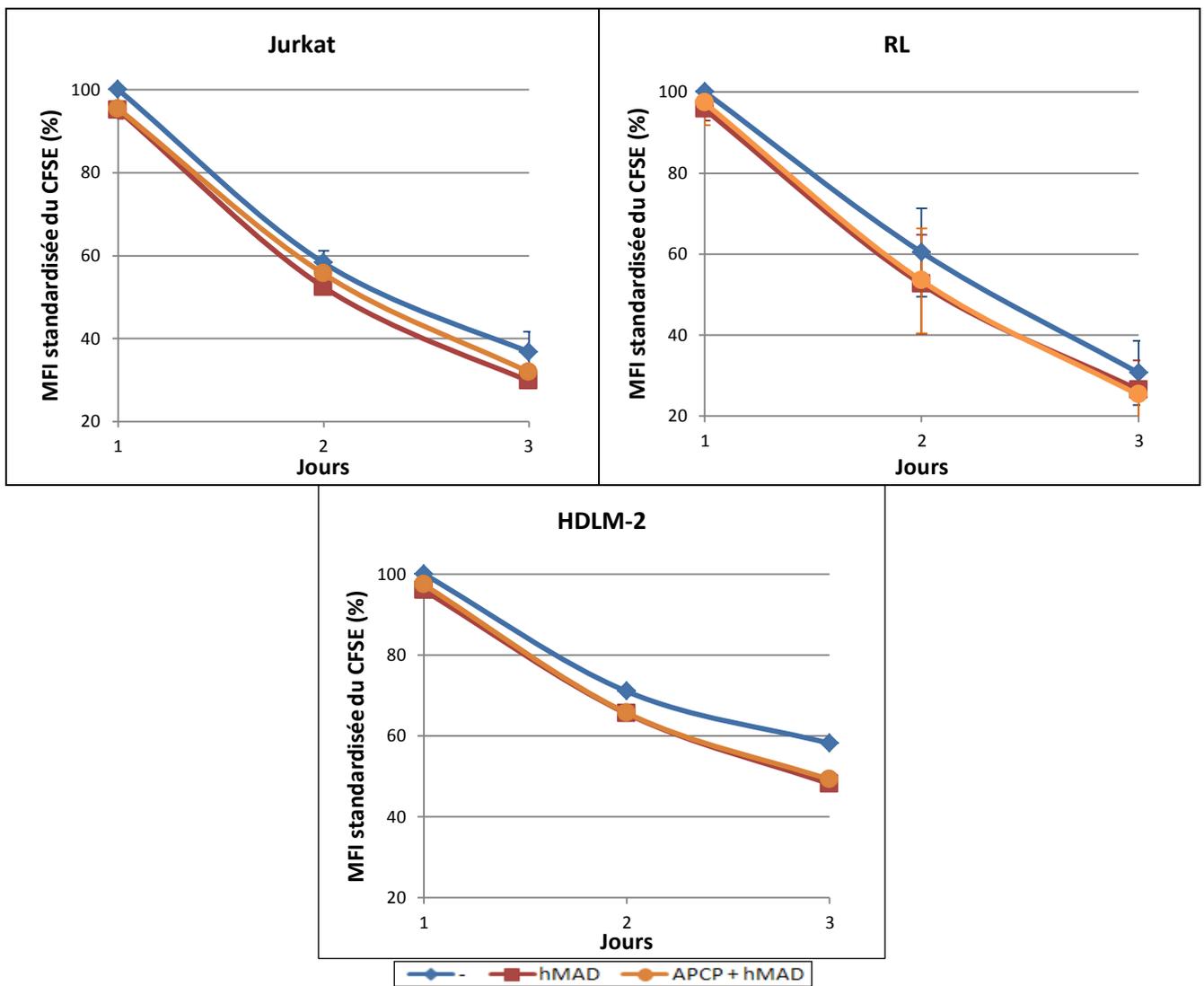


Figure 33. Effet de l'inhibition de l'activité CD73 sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 1 à 2)

L'ajout d'APCP à 10 μ M seul sur les cellules n'a pas d'effet (données non présentées). En présence de pré-adipocytes hMAD, l'APCP semble ralentir la prolifération des cellules Jurkat, mais pas des cellules RL et HDLM-2. Cette réversion partielle de l'effet prolifératif des cellules hMAD pourrait provenir d'une diminution de la quantité d'adénosine dans le milieu.

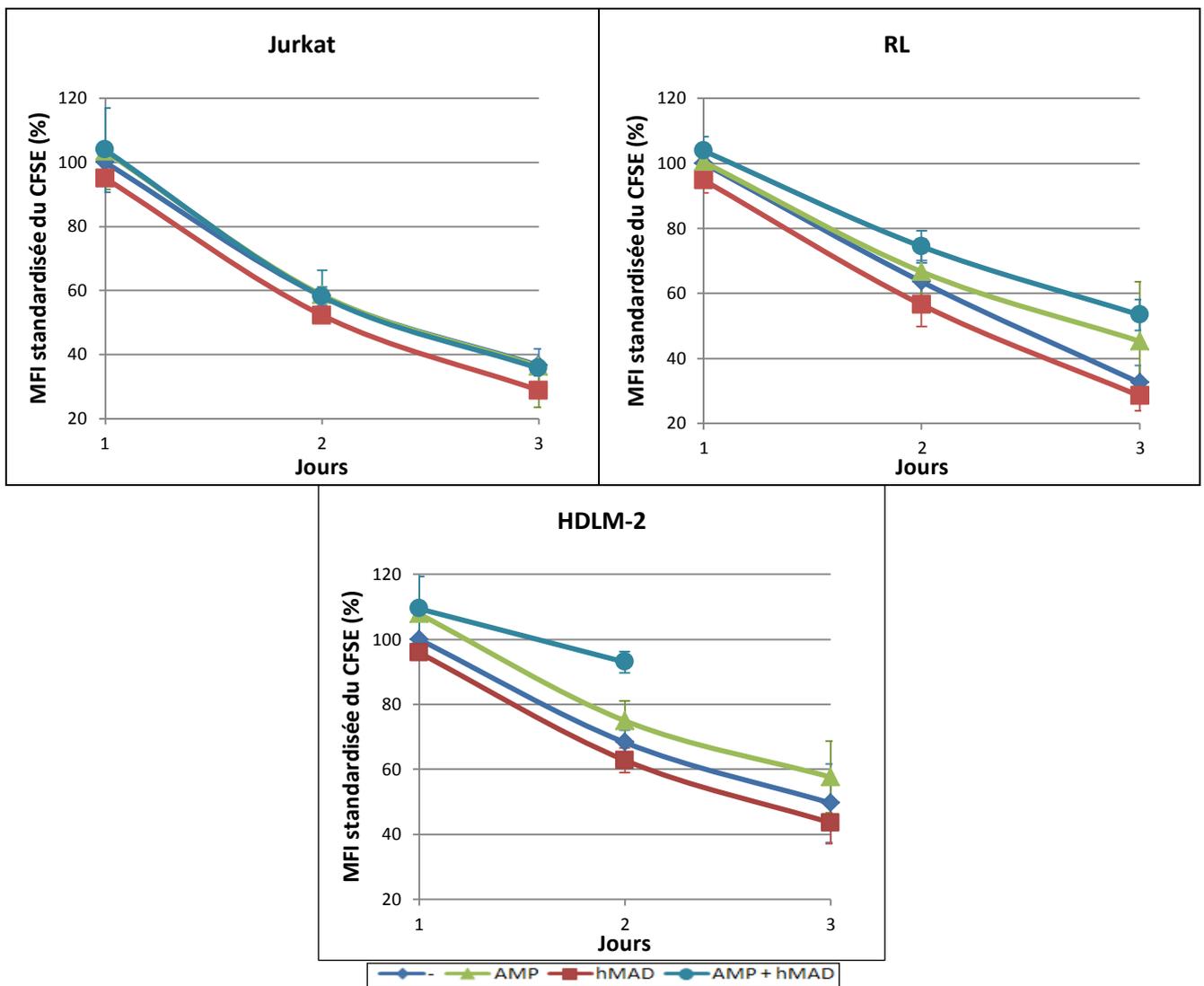


Figure 34. Effet de la stimulation de l'activité CD73 sur la prolifération cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 2)

On remarque que l'ajout d'AMP à 1 mM en absence et en présence de pré-adipocytes provoque un ralentissement de la division cellulaire des cellules RL et HDLM-2, plus marqué pour ces dernières cellules. Ce résultat s'oppose à celui qu'on attendait, puisque l'AMP est métabolisé, au moins en partie, en adénosine par l'enzyme CD73 des cellules hMAD.

3.2. Mort cellulaire

Nous avons étudié l'effet de l'inhibition et de la stimulation de l'activité CD73 sur la mort des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique dans les mêmes conditions de culture (Figure 35). L'inhibition de l'activité CD73 par l'APCP ne modifie pas le pourcentage de cellules cancéreuses mortes (données non présentées).

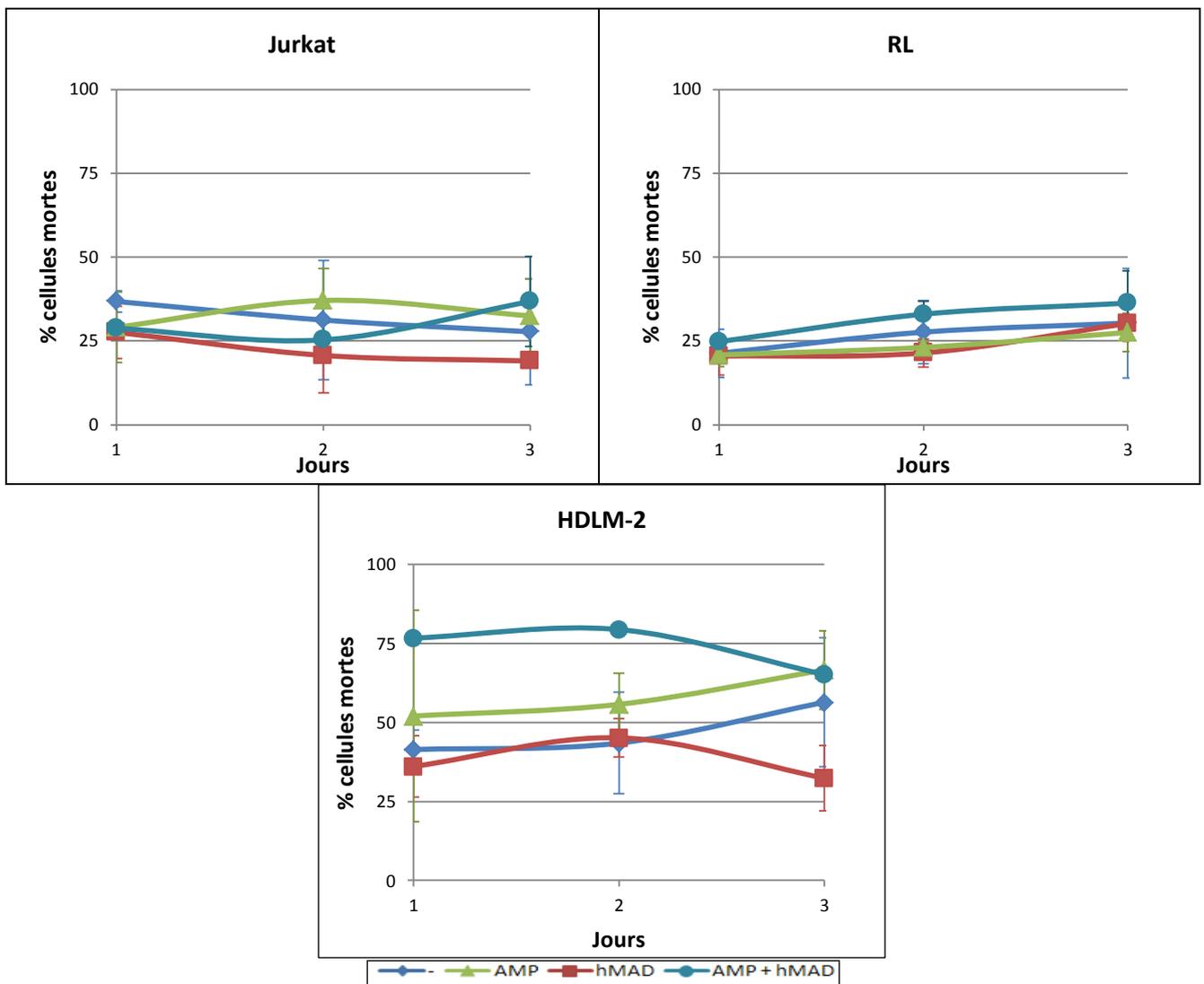


Figure 35. Effet de la stimulation de l'activité CD73 sur la mort cellulaire en présence de 1 % de SVF. (n = 2)

L'AMP induit la mort des cellules HDLM-2, en absence et davantage en présence de pré-adipocytes hMAD. Ce phénomène n'est pas observé pour les cellules Jurkat et RL.

3.3. Activation des récepteurs de l'adénosine

Nous avons voulu savoir si les pré-adipocytes hMAD pouvaient activer les récepteurs de l'adénosine présents à la surface des cellules Jurkat et RL. Pour cela, nous avons évalué la phosphorylation des kinases ERK-1/2 des cellules onco-hématologiques incubées pendant 2 minutes avec le surnageant de culture des hMAD (Figure 36) qui présente les mêmes effets que les cellules hMAD elles-mêmes.

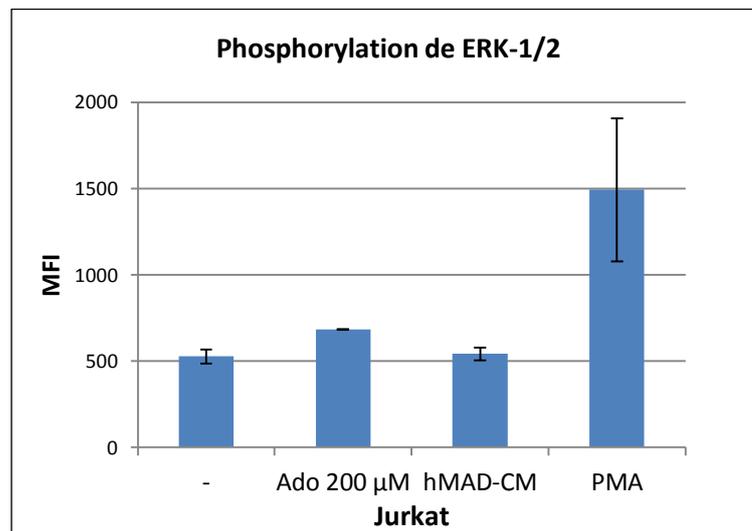


Figure 36. Effet du milieu conditionné des cellules hMAD sur la phosphorylation d'ERK-1/2. (n = 2 à 3)

Le niveau de phosphorylation d'ERK-1/2 des cellules Jurkat après une incubation de 2 minutes avec le PMA à 10 ng/mL et l'adénosine à 200 µM a permis de valider la méthode. On observe que le surnageant de culture des hMAD n'augmente pas la phosphorylation d'ERK-1/2 des cellules Jurkat et n'active probablement pas les récepteurs de l'adénosine. Par ailleurs, les cellules RL n'ont pas présenté de réponse à l'induction de la phosphorylation d'ERK-1/2 par l'adénosine dans les mêmes conditions.

L'étude préliminaire du rôle de l'adénosine dans l'effet prolifératif et protecteur des pré-adipocytes sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique semble indiquer que cette molécule n'entre pas en jeu dans ce phénomène.

4. Effet de l'adénosine sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique

Ayant mis en évidence un effet du système adénoenergique sur les cellules cancéreuses, nous avons alors étudié directement l'effet de l'adénosine sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique en absence d'adipocytes, dans un modèle plus simple.

4.1. Prolifération cellulaire

Nous avons étudié l'effet de l'adénosine exogène (Ado) à différentes concentrations (0, 2, 10, 100, 200 µM) sur la prolifération des quatre lignées cancéreuses en présence de 1 % de SVF afin de minimiser la métabolisation de l'adénosine par les enzymes sériques (Figure 37).

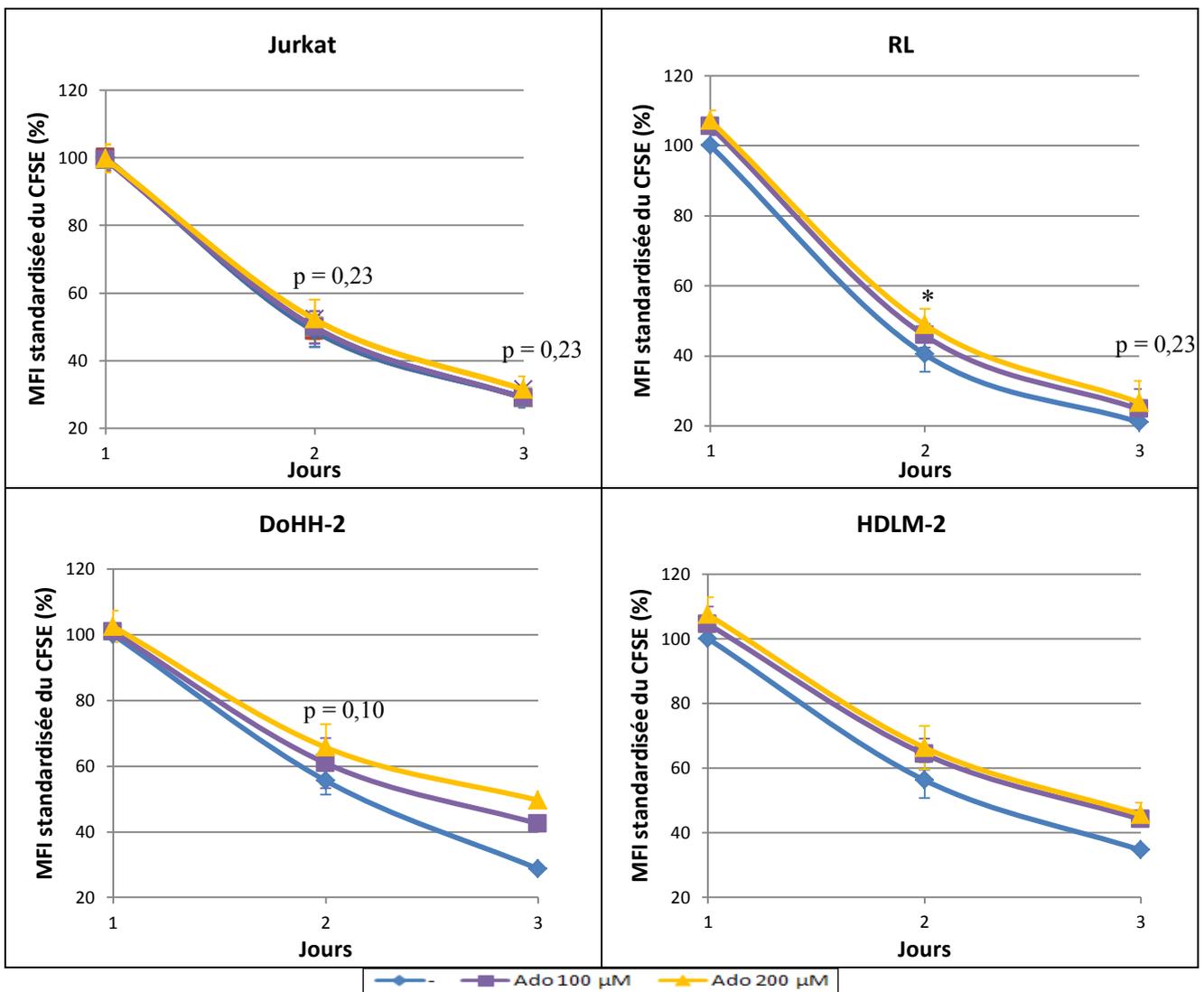


Figure 37. Effet de l'adénosine sur la prolifération cellulaire. (n = 2 à 8)

L'adénosine présente un faible effet cytostatique reproductible non statistiquement significatif, excepté pour les cellules RL, à partir de 100 µM ou 200 µM selon les cellules. L'effet est plus marqué pour les cellules DoHH-2 et HDLM-2 que pour les cellules Jurkat et RL.

Nous avons ensuite réalisé les mêmes expériences en ajoutant la 2'-désoxycoformycine (DCF), inhibiteur spécifique de l'ADA, qui permet d'augmenter la demi-vie de l'adénosine exogène (Figure 38).

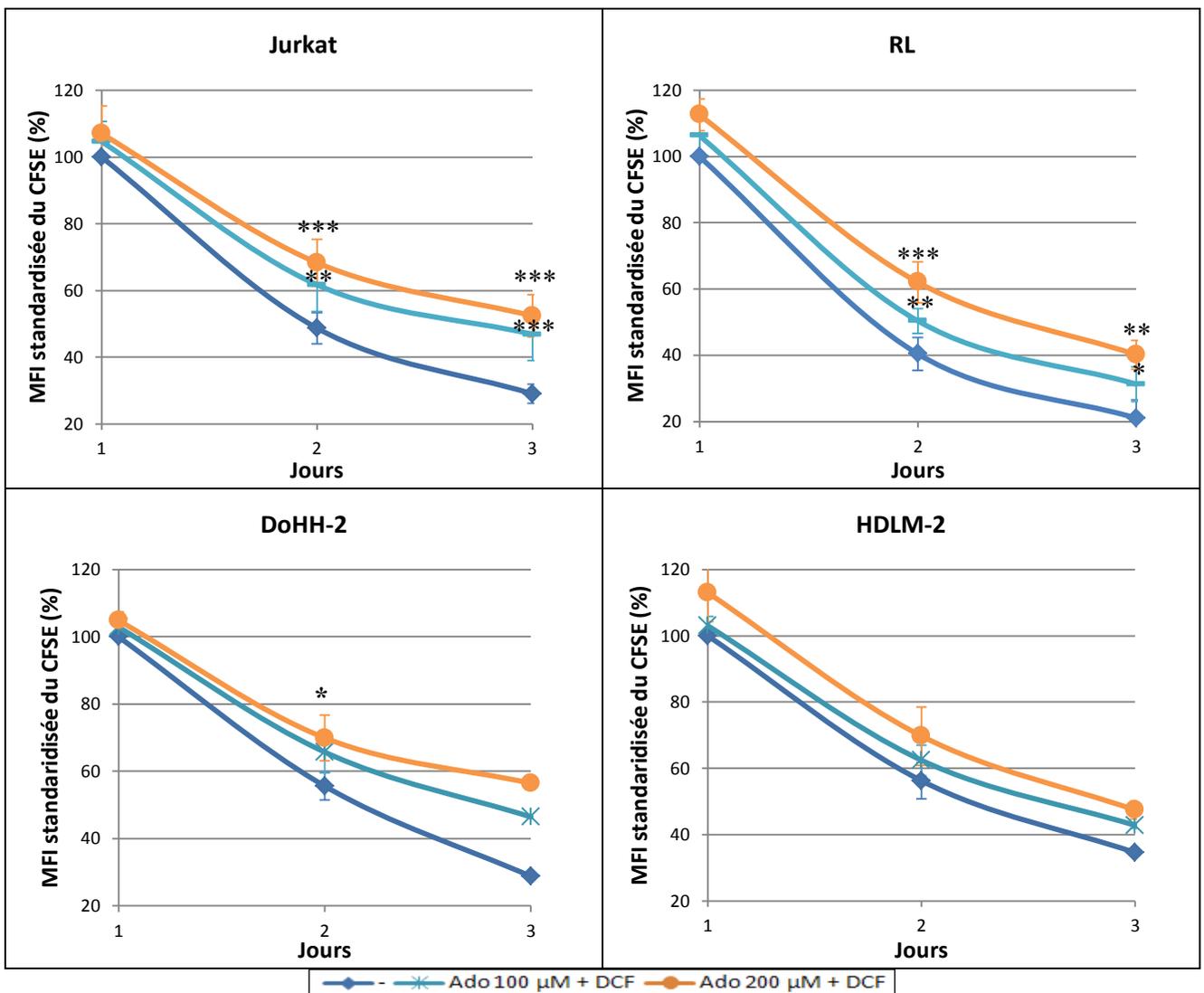


Figure 38. Effet de l'adénosine en présence de DCF sur la prolifération cellulaire. (n = 1 à 8)

La DCF seule à 10 μM n'a pas d'effet sur les cellules (données non présentées), alors qu'elle augmente l'effet cytotatique de l'adénosine à 100 μM et 200 μM sur les quatre lignées cellulaires, de manière statistiquement significative pour les cellules Jurkat, RL et DoHH-2.

4.2. Mort cellulaire

L'effet de l'adénosine sur la mort cellulaire est représenté sur la figure 39.

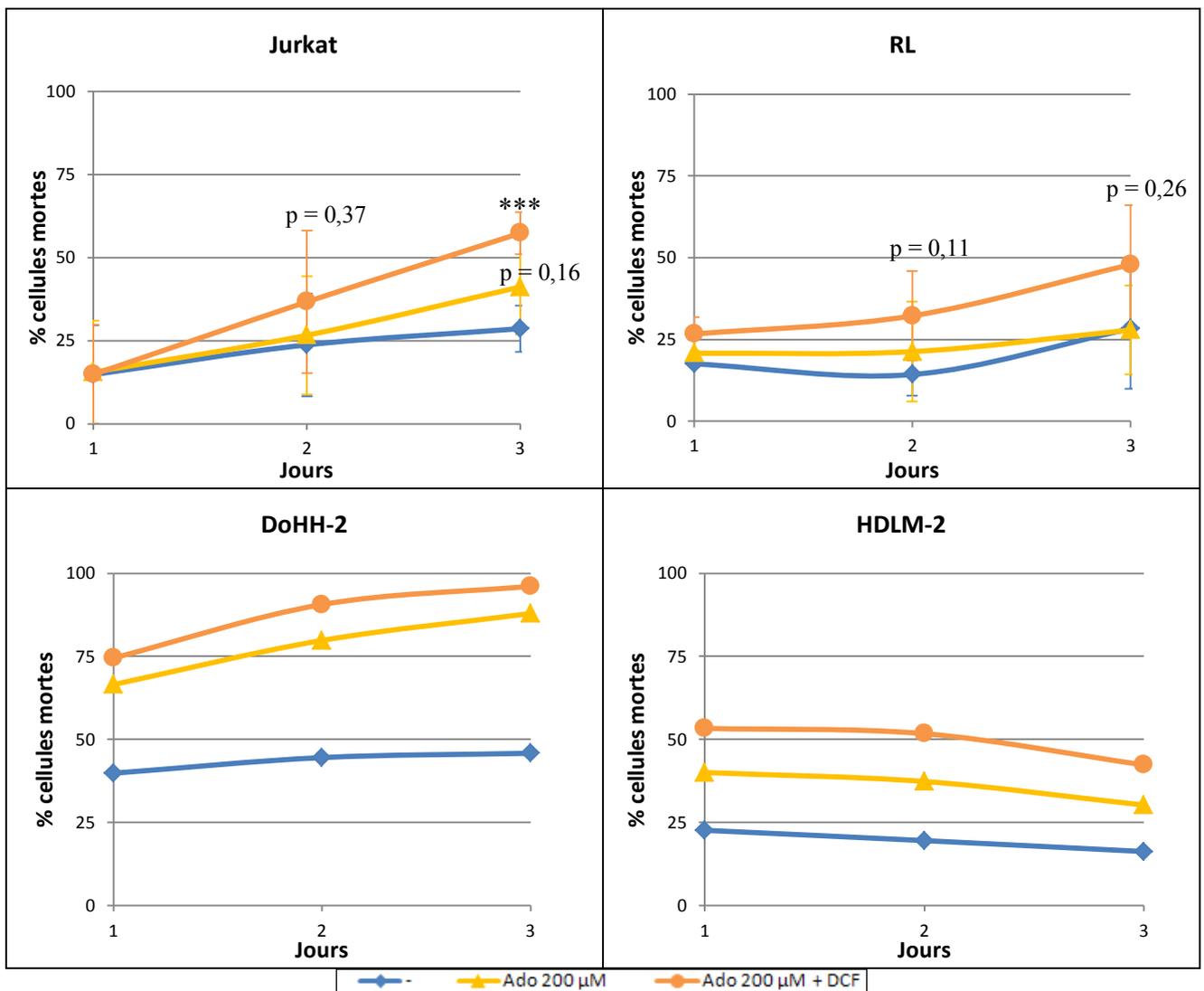


Figure 39. Effet de l'adénosine sur la mort cellulaire. (n = 1 à 4)

L'adénosine présente un effet cytotoxique à la concentration de 200 µM et cet effet est potentialisé par la DCF qui augmente la concentration d'adénosine dans le milieu et est statistiquement significatif pour les cellules Jurkat. La DCF seule à 10 µM ne modifie pas le pourcentage de cellules mortes pour les quatre lignées cellulaires (données non présentées).

4.3. Approche du mécanisme cytotatique de l'adénosine

Pour essayer de déterminer si l'action cytotatique de l'adénosine sur les cellules cancéreuses dépend d'un mécanisme extracellulaire ou intracellulaire, nous avons utilisé le dipyridamole (dip) qui est un inhibiteur du transporteur nucléosidique ENT1 bloquant la principale voie d'entrée de l'adénosine dans la cellule (Figures 40 et 41).

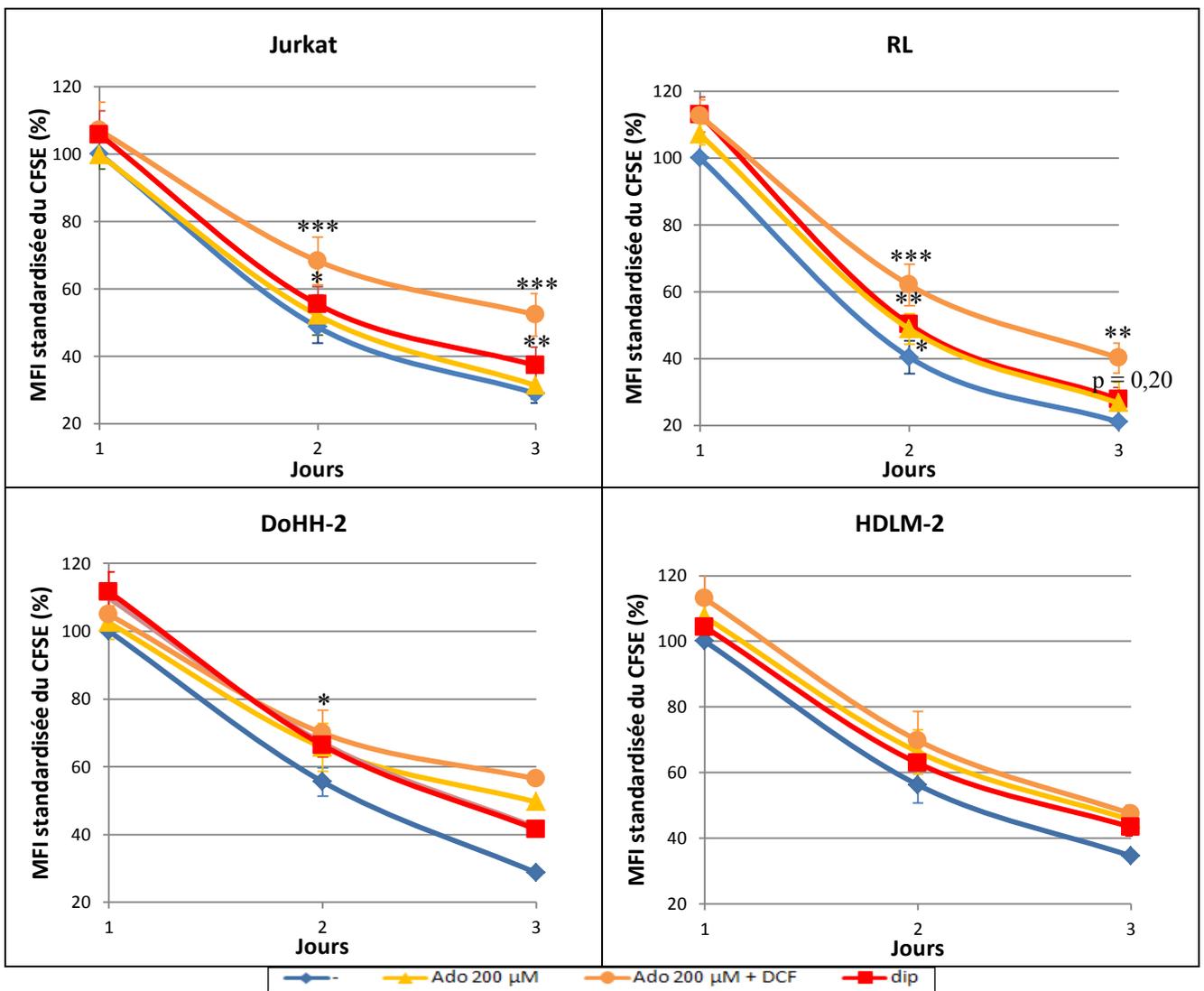


Figure 40. Effet du dipyridamole sur la prolifération cellulaire. (n = 2 à 5)

Le dipyridamole seul à 10 µM présente un effet cytotatique qui se situe entre celui de l'adénosine à 200 µM et celui de l'adénosine à 200 µM en présence de DCF pour les cellules Jurkat et RL et qui est moins important que celui de l'adénosine à 200 µM pour les cellules DoHH-2 et HDLM-2.

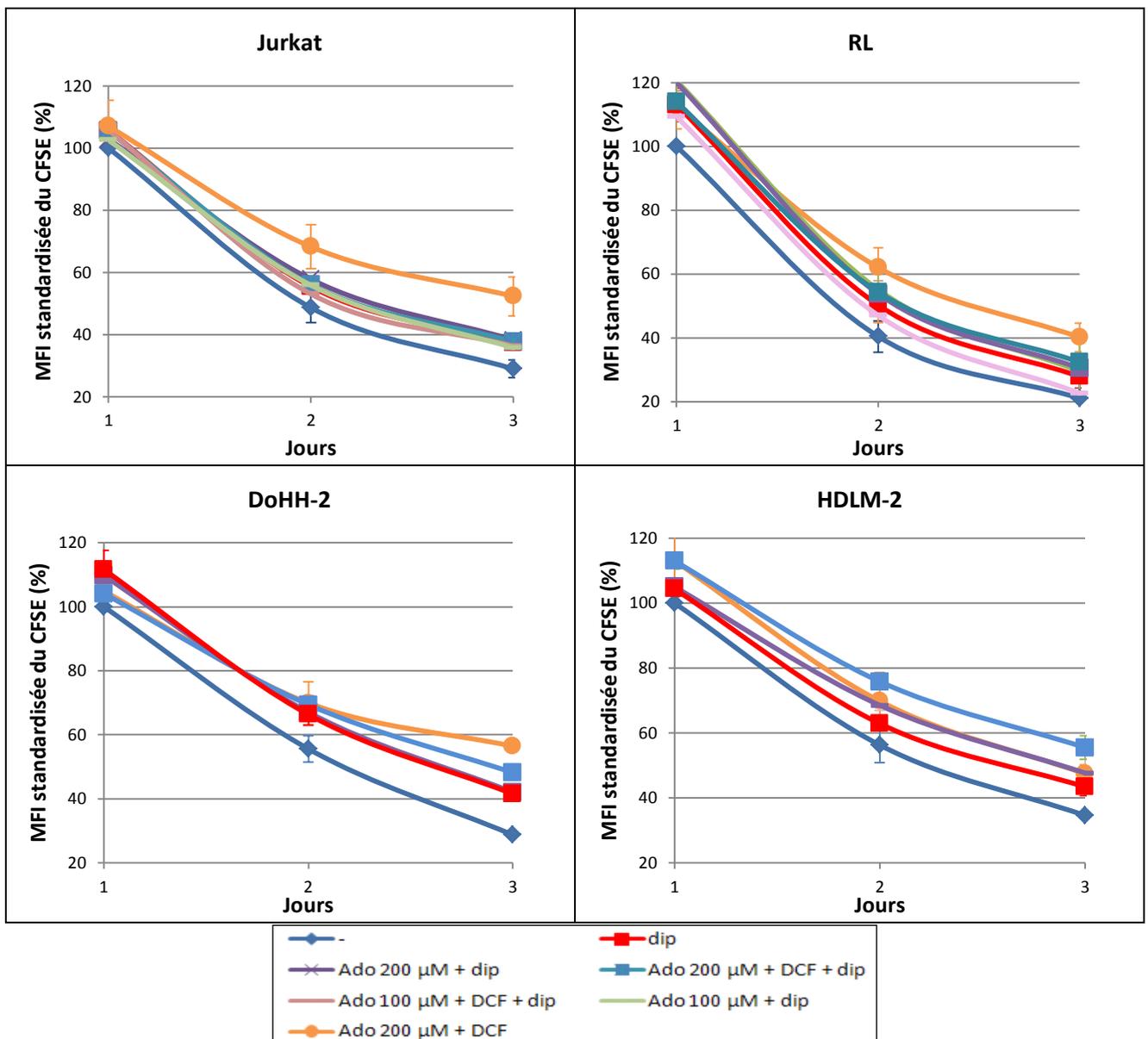


Figure 41. Effet de l'adénosine en présence de dipyridamole sur la prolifération cellulaire. (n = 1 à 7).

En présence de dipyridamole, l'ajout d'adénosine exogène à différentes concentrations avec ou sans DCF n'a pas d'effet supplémentaire sur les cellules Jurkat et RL. Cela suggère que l'effet cytotatique de l'adénosine observé dans les expériences précédentes nécessite son entrée dans la cellule.

A l'inverse, en présence de dipyridamole, l'ajout d'adénosine exogène induit une augmentation de la cytotase des cellules DoHH-2 et HDLM-2, ce qui suggère que l'effet cytotatique de l'adénosine ne nécessite pas son entrée dans la cellule. Ainsi, le mécanisme cytotatique de l'adénosine ne paraît pas être le même selon le type cellulaire.

Ces résultats mettent en évidence un effet cytotatique et cytotoxique de l'adénosine à des concentrations supraphysiologiques sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.

DISCUSSION

Au cours de ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés à l'effet des adipocytes, cellules du microenvironnement médullaire, sur la progression tumorale des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique. Nous avons également évalué le rôle de l'adénosine et de l'enzyme CD73 dans ce phénomène.

1. Les adipocytes favorisent la prolifération et la survie des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.

Pour évaluer la prolifération et la survie cellulaire, essentielles dans la notion de progression tumorale, nous avons tout d'abord essayé la méthode simple de comptage des cellules cancéreuses et de détermination de la viabilité par un colorant vital. Cela s'est révélé peu pertinent puisque nous avons relevé une sous-estimation systématique du nombre de cellules cancéreuses due à leur attachement aux adipocytes adhérents au fond des puits. De ce fait, nous avons eu recours aux marqueurs CFSE et DAPI par cytométrie en flux, technique robuste, sensible et fréquemment utilisée (126).

Les co-cultures des adipocytes avec les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique ont permis d'observer un faible effet prolifératif des pré-adipocytes (hMAD et ASC) et des adipocytes matures (hMAD différenciées) sur les cellules de LAL-T Jurkat et de lymphome folliculaire RL, et des pré-adipocytes hMAD sur les cellules de lymphome diffus à grandes cellules DoHH-2 et de lymphome de Hodgkin HDLM-2. Cet effet est plus notable en présence de 1 % de SVF plutôt que de 10 % de SVF dans le milieu de culture. En outre, le même effet a été observé lors de l'emploi du milieu conditionné des pré-adipocytes hMAD. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse d'une action médiée par une molécule soluble dont la concentration varie en fonction de la quantité de sérum utilisée dans l'expérience. Il pourrait s'agir d'une molécule se fixant à des protéines sériques ou bien d'une molécule métabolisée par une enzyme sérique. C'est le cas de l'adénosine qui peut être métabolisée en inosine par l'ADA sérique (58). Il a d'ailleurs déjà été observé que les adipocytes pouvaient favoriser la progression tumorale par la production de molécules solubles (16).

Par ailleurs, les pré-adipocytes et les adipocytes matures ont tendance à diminuer le pourcentage de mort spontanée des cellules Jurkat et RL. En d'autres termes, ils favorisent la survie de ces cellules. De plus, nous avons établi que la prolifération et la mort

spontanée étaient deux éléments indépendants puisque nous avons observé lors d'une expérience que les cellules RL ne proliféraient pas davantage en présence de cellules ASC alors qu'elles étaient davantage protégées contre la mort spontanée. Ainsi l'effet protecteur des adipocytes est un phénomène supplémentaire de leur effet prolifératif.

Par ailleurs, nous avons effectué une étude préliminaire de la chimio-sensibilité des cellules RL après 3 ou 15 jours de co-culture avec les pré-adipocytes hMAD. Malgré un effet protecteur des cellules hMAD contre la mort spontanée de ces cellules, nous n'avons pas observé, par test MTT, d'effet protecteur contre la mort induite par deux chimiothérapies cytotoxiques.

L'action des adipocytes sur la prolifération et la survie de cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique a déjà été décrite sur des cellules myélomateuses *in vitro* (26). Même si l'ampleur de cet effet est minime dans nos expériences *in vitro* sur trois jours, elle pourrait être majeure chez l'homme où les cellules sont en contact permanent. Nous avons d'ailleurs effectué quelques expériences de co-cultures plus longues de deux semaines avec évaluation à deux temps (4 et 11 jours) de la prolifération des cellules RL par CFSE. Cette prolongation de la co-culture n'a pas démontré d'effet supplémentaire des cellules hMAD. Pour une approche plus réaliste des conditions cellulaires de l'organisme, il serait judicieux d'utiliser un système de culture *in vitro* en 3 dimensions (matrices 3D avec du collagène) afin de mimer le microenvironnement tumoral. Un travail *in vivo* serait également plus représentatif. Il serait par exemple envisageable d'injecter à des souris des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique murines fluorescentes en voie intra-médullaire ou intra-péritonéale et de manière concomitante des cellules adipeuses murines et de comparer ensuite le nombre de cellules fluorescentes au cours du temps.

2. Expression des molécules de la voie adénosinergique

Nous avons émis l'hypothèse que l'adénosine intervenait dans l'effet prolifératif et protecteur des adipocytes observé sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique. De ce fait, nous avons voulu déterminer l'expression génique et/ou protéique des enzymes CD73, CD39 et ADK, des récepteurs de l'adénosine et du transporteur nucléosidique ENT1 par les cellules cancéreuses et des enzymes CD73 et CD39 par les pré-adipocytes hMAD.

Les techniques de détermination de l'expression et de l'activité de CD73 ont été validées par l'emploi d'une lignée cellulaire de contrôle de cancer du sein MDA-MB-231

qui exprime fortement cette enzyme (127) et par la confirmation que les pré-adipocytes hMAD l'expriment fortement également (4). De plus, nous avons retrouvé une expression faible de CD73 par les cellules Jurkat provenant d'une LAL-T (108). Les autres cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique expriment également très faiblement cette enzyme.

Le statut d'expression de l'enzyme CD39 est quant à lui moins bien évalué à l'heure actuelle. Les résultats de notre étude indiquent qu'elle est faiblement exprimée par les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique hormis les cellules HDLM-2, et qu'elle n'est pas exprimée par les pré-adipocytes hMAD. La validation de l'anticorps a été préalablement établie au laboratoire, cependant il nous a manqué une lignée cellulaire de contrôle.

Il nous a été difficile d'interpréter correctement les résultats d'expression des récepteurs de l'adénosine. En effet, la détection de leur expression génique a été compliquée par la présence de plusieurs pics sur certaines courbes de fusion dans les expériences de RT-PCR quantitative. Ce problème peut expliquer certaines incohérences entre nos résultats d'expression génique et protéique pour ces récepteurs. Nous avons également évoqué un problème de sensibilité empêchant la détection d'une expression génique faible. Le choix des amorces n'a peut-être pas été le bon. Le complément d'informations obtenu par l'expression protéique ne nous a pas amené à approfondir l'étude génique et nous avons retrouvé une concordance de nos résultats avec des données de la littérature, comme l'expression des quatre récepteurs de l'adénosine par les cellules Jurkat (85) ainsi que l'expression du récepteur A2A et l'absence d'expression du récepteur A1 par les cellules hMAD (128). Malgré cela, il nous a manqué une lignée cellulaire de contrôle pour valider les amorces de PCR et les anticorps utilisés pour la première fois dans le laboratoire. Nous nous sommes contentés pour ce projet de cette approche à laquelle on peut conclure que les récepteurs de l'adénosine sont faiblement exprimés par les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique et de manière variable entre elles.

Nos résultats indiquent par ailleurs que le transporteur ENT1 est exprimé par les quatre lignées cellulaires onco-hématologiques étudiées, permettant ainsi l'entrée de l'adénosine dans la cellule. L'adénosine peut ensuite être métabolisée en AMP dans ces cellules puisqu'elles expriment l'ADK. L'ubiquité de la distribution de l'ADK a été retrouvée (129).

Nous avons ainsi confirmé que les pré-adipocytes hMAD exprimaient une enzyme CD73 fonctionnelle. Le fait que certains récepteurs de l'adénosine soient exprimés par les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique nous a permis à ce stade du projet de

poursuivre notre étude concernant le rôle de l'adénosine dans l'effet prolifératif et protecteur des adipocytes.

3. Rôle de l'adénosine dans l'effet prolifératif et protecteur des pré-adipocytes

3.1. La modulation de l'activité CD73 des pré-adipocytes modifie la prolifération et la mort des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.

Pour évaluer le rôle de l'adénosine dans l'action proliférative et protectrice des pré-adipocytes hMAD, nous avons modulé sa production par l'enzyme CD73 au cours d'expériences de co-culture. L'expression de cette enzyme par les cellules hMAD est nettement plus importante que celle des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique, ce qui suggère que l'adénosine extracellulaire produite au cours de la co-culture provient des pré-adipocytes.

L'APCP inhibe environ 60 % de l'activité CD73 dans nos conditions de culture (données non présentées). Cet inhibiteur ne présente pas d'effet important sur la prolifération des trois lignées cellulaires Jurkat, RL et HDLM-2. Il semble diminuer légèrement l'effet prolifératif des pré-adipocytes sur les cellules Jurkat.

A l'inverse, nous avons employé l'AMP, substrat de l'enzyme CD73, à la concentration importante de 1mM probablement saturante pour activer davantage l'enzyme CD73 et obtenir une grande quantité d'adénosine. Les résultats obtenus sont différents de ceux attendus dans le cadre de notre hypothèse. En effet, l'ajout d'AMP en présence des cellules hMAD induit un effet cytotatique sur les cellules cancéreuses alors que dans ces conditions, la concentration d'adénosine extracellulaire est sûrement plus élevée qu'en absence d'AMP. Les cellules Jurkat et RL semblent moins sensibles à cet effet cytotatique que les cellules HDLM-2. La sensibilité des cellules à l'adénosine à une concentration donnée dépend probablement du nombre et des types de récepteurs de l'adénosine présents à leur surface. Par ailleurs, l'ajout d'AMP en présence de cellules hMAD présente une action cytotoxique notable sur les cellules HDLM-2.

Le fait que la molécule AMP présente elle-même un effet sur les cellules RL et HDLM-2 est étonnant. En effet, l'AMP n'a pas d'effet extracellulaire propre connu sur les cellules, il s'agit d'un métabolite intermédiaire qui ne présente pas de transporteur membranaire

(58). Nous supposons que cette molécule a été métabolisée en adénosine par l'enzyme CD73 sérique du SVF (58).

Nous pouvons considérer que l'ajout ponctuel d'AMP dans le milieu de culture lors de ces expériences n'est pas représentatif d'une production supposée permanente d'adénosine en faible quantité par les adipocytes. De plus, nous avons vu dans la synthèse bibliographique que l'adénosine présente des effets variables selon sa concentration extracellulaire puisque l'affinité de chacun de ses récepteurs n'est pas la même. L'ajout d'APCP fut également ponctuel et la demi-vie de cette molécule est inconnue. Dès lors, dans l'optique de répondre à notre problématique, nous avons construit un plasmide codant un ARN interférent en épingle à cheveux (shRNA) spécifique de l'ARNm de la molécule CD73 afin d'inhiber sa traduction en protéine de façon permanente. Des pré-adipocytes transfectés par ce plasmide devraient produire nettement moins d'adénosine de façon permanente et pourraient être l'objet d'une étude similaire de leur effet sur la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. En l'occurrence, des clones de pré-adipocytes transfectés par ce plasmide n'ont pas encore pu être obtenus au laboratoire, cependant le plasmide a été validé sur une autre lignée cellulaire qui présente une expression de CD73 largement diminuée (données non présentées).

3.2. Les pré-adipocytes n'activent pas les récepteurs de l'adénosine dans nos conditions.

Pour évaluer si les pré-adipocytes hMAD activent les récepteurs de l'adénosine des cellules Jurkat, nous avons quantifié la phosphorylation des MAPKs ERK-1/2 induite en aval de l'activation des quatre récepteurs de l'adénosine (68). Nous avons vérifié que l'adénosine induisait effectivement ce signal. La phosphorylation d'ERK-1/2 est maximale 2 à 5 minutes après l'ajout d'adénosine aux cellules Jurkat et retrouve un niveau basal après une trentaine de minutes, ce qui correspond aux données de la littérature (68). Nous n'avons pas observé d'effet du surnageant de culture des hMAD sur la phosphorylation d'ERK-1/2, ce qui semble indiquer que les adipocytes ne communiquent pas avec les cellules Jurkat via l'adénosine. Il a été montré que l'adénosine active cette voie à partir d'une concentration de 100 nM (68). L'élaboration d'une technique de dosage des nucléosides dans le milieu de culture serait optimale pour travailler avec ces modèles *in vitro*.

4. L'adénosine ralentit la prolifération et induit la mort des cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.

Il est possible que l'adénosine obtenue à partir de l'AMP exogène dans les expériences précédentes puisse agir sur les pré-adipocytes puisqu'ils expriment certains récepteurs de l'adénosine. Pour s'affranchir de ce biais d'interprétation, nous avons travaillé en l'absence de ces cellules afin de définir l'effet direct de l'adénosine sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique.

Nous avons observé un effet cytostatique de l'adénosine sur les quatre lignées cellulaires à des concentrations supraphysiologiques supérieures à 100 μM . Les cellules DoHH-2 et HDLM-2 sont plus sensibles à cet effet que les cellules RL et Jurkat. Ce degré de sensibilité concorde avec celui des résultats précédents en présence de pré-adipocytes et d'AMP. L'effet cytostatique de l'adénosine est dose-dépendant car en présence de DCF, qui augmente la concentration d'adénosine, l'effet est nettement plus important. Nous n'avons pas retrouvé d'effet de l'adénosine à de faibles concentrations, néanmoins l'ajout d'adénosine exogène tous les jours lors de nos expériences ne suffit pas obtenir un modèle d'apport constant de cette molécule de faible demi-vie.

Nous avons également montré que l'adénosine présente un effet cytotoxique dose-dépendant sur les quatre lignées cellulaires aux mêmes concentrations supraphysiologiques supérieures à 100 μM . De nouveau, les cellules DoHH-2 et HDLM-2 sont plus sensibles à cet effet que les cellules RL et Jurkat, ce qui concorde avec les expériences précédentes avec l'AMP.

Nous avons ensuite utilisé dans notre modèle d'étude *in vitro* de l'effet cellulaire de l'adénosine un inhibiteur du transporteur nucléosidique ENT1 exprimé par les quatre lignées cellulaires, le dipyridamole (Figure 42). Nous avons voulu savoir si l'effet de l'adénosine est dû à une action intracellulaire après son entrée dans la cellule ou à une action extracellulaire par la voie adénosinergique.

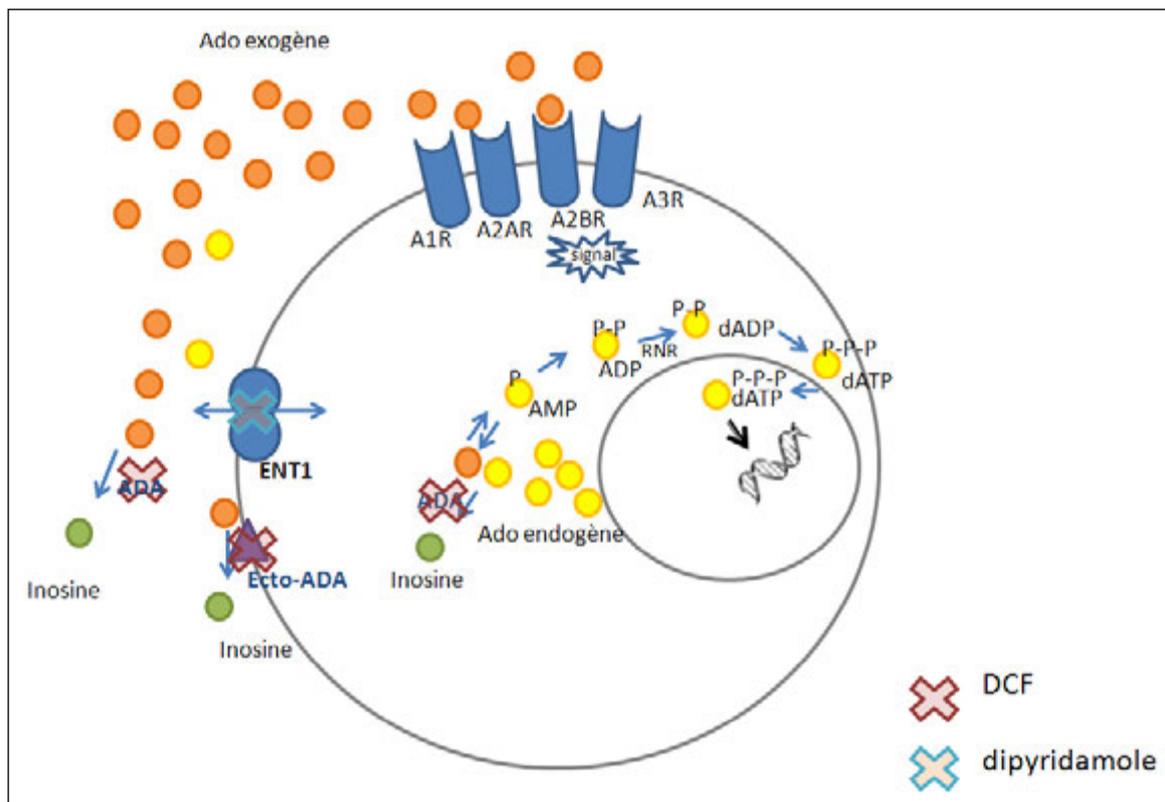


Figure 42. Schéma du modèle d'étude *in vitro* de l'effet cellulaire de l'adénosine. Une quantité importante d'adénosine exogène est ajoutée dans le milieu (orange). La concentration extracellulaire d'adénosine est modulée par l'inhibition de l'enzyme ADA par la DCF et/ou par l'inhibition du transporteur ENT1 par le dipyridamole. L'adénosine peut agir sur ses récepteurs à la surface de la cellule ou entrer dans la cellule et modifier le pool intracellulaire de nucléosides et nucléotides (RNR = ribonucléotide réductase).

Le dipyridamole seul ralentit la prolifération des cellules. Nous avons supposé que dans ce cas le dipyridamole bloque un efflux physiologique de l'adénosine. Cet effet a déjà été constaté sur des cellules sanguines mononuclées issues de patients présentant une leucémie aigüe myéloïde ou une leucémie chronique myéloïde et sur des cellules lymphomateuses humaines (130, 131). Le dipyridamole perturberait les pools de nucléosides et nucléotides intracellulaires. Là encore, la mise en place d'une technique de dosage de l'adénosine dans le laboratoire permettrait de répondre à ces hypothèses en quantifiant l'adénosine extracellulaire dans les différentes conditions expérimentales.

En présence de dipyridamole, l'adénosine exogène ne peut pas entrer dans la cellule par son transporteur ENT1. Dans cette condition, l'effet cytostatique de l'adénosine sur les cellules Jurkat et RL est moins important et cela quel que soit la quantité d'adénosine ajoutée. On suppose alors que l'effet de l'adénosine sur ces cellules est principalement dû à une accumulation intracellulaire du nucléoside via le transporteur ENT1. A l'inverse, l'effet de l'adénosine sur les cellules DoHH-2 et HDLM-2 passerait par un mécanisme extracellulaire puisqu'il augmente en présence de dipyridamole en fonction de la quantité d'adénosine ajoutée. Pour les cellules DoHH-2, l'effet de l'adénosine en présence de

dipyridamole reste inférieur à celui de l'adénosine seule, on suppose donc que son effet passe à la fois par des mécanismes extracellulaires et intracellulaires. Il est également possible que le dipyridamole induise un changement de concentration de l'adénosine suffisant pour que celle-ci agisse sur un autre récepteur. En revanche, pour les cellules HDLM-2, l'effet de l'adénosine en présence de dipyridamole est supérieur à celui de l'adénosine seule, on suppose donc que le mécanisme de l'adénosine est extracellulaire.

Comme cela a été décrit dans la synthèse bibliographique, plusieurs publications scientifiques rapportent un effet délétère de l'adénosine sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique (103, 104, 105, 106). Notamment, elles rapportent une action pro-apoptotique de l'adénosine à forte concentration (100 à 200 μM) par un mécanisme intracellulaire et une action cytostatique par activation de certains récepteurs de l'adénosine à plus faible concentration (5 à 25 μM).

Notre étude paraît indiquer que l'adénosine ne présente également pas d'effet pro-tumoral sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique aux concentrations supraphysiologiques de 100 à 200 μM , alors qu'il s'agit d'une molécule favorisant la progression tumorale de certains cancers solides. Le phénotype entre ces deux types de cancers n'est pas le même puisque, par exemple, de nombreuses tumeurs solides surexpriment CD73 alors que ce n'est pas le cas des cellules onco-hématologiques. Cet effet de l'adénosine est utilisé en thérapeutique dans certaines indications précises ; ainsi la DCF (pentostatine) est utilisée dans la leucémie à tricholeucocytes. Dans notre modèle, nous n'avons pas retrouvé d'effet cytostatique ou lytique de la DCF seule.

Ces considérations s'éloignent partiellement du projet de recherche puisque, dans cette partie, nous n'avons pas travaillé avec les adipocytes. Elle a cependant un intérêt scientifique et éventuellement thérapeutique. L'utilisation d'adénosine en tant que médicament anticancéreux est rendu difficile par sa demi-vie très courte et ses effets pléiotropes potentiellement indésirables. Il est possible d'augmenter sa concentration dans le microenvironnement tumoral en utilisant des activateurs de l'enzyme CD73 ou des inhibiteurs d'ADA. Si l'effet de l'adénosine sur les cellules cibles passe par ses récepteurs, on peut employer des agonistes ou des antagonistes sélectifs de ceux-ci.

Afin de compléter nos résultats concernant le rôle de l'adénosine sur les cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique, il est envisageable d'étudier l'activation des récepteurs de l'adénosine. Pour cela, il est possible de mesurer la quantité d'AMPc (AMP cyclique) intracellulaire puisque les récepteurs de l'adénosine sont couplés à une protéine G qui module sa concentration. Il est également possible de quantifier la phosphorylation

des protéines ERK-1/2 en présence d'adénosine par cytométrie en flux comme nous l'avons fait dans certaines de nos expériences. Enfin, l'utilisation d'antagonistes et d'agonistes pan-récepteurs ou sélectifs de certains récepteurs, comme la caféine à forte concentration ou la molécule 5'-N-éthylcarboxamido adénosine (NECA) serait pertinente et permettrait de déterminer les récepteurs impliqués. On remarque d'ailleurs que les quatre lignées cellulaires étudiées expriment le récepteur de l'adénosine A2A immunosuppresseur ; il faudrait cependant réaffirmer plus précisément l'expression de chaque lignée cellulaire pour les récepteurs de l'adénosine. Ainsi, les cellules onc-hématologiques étudiées se comporteraient vis-à-vis de l'adénosine plutôt comme des cellules immunitaires que comme des cellules cancéreuses. Pour finir, on peut suggérer de mettre en œuvre un nouveau modèle d'étude employant de plus faibles concentrations d'adénosine ajoutés plus fréquemment dans le milieu et pendant plus longtemps pour continuer ces études *in vitro*.

5. Conclusion de la discussion

Ce travail nous a permis d'objectiver *in vitro* un effet prolifératif et protecteur des adipocytes sur différentes cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique et donc de mettre en évidence un rôle nutritif des adipocytes sur les cellules cancéreuses, qui avait été décrit pour les cellules médullaires hématopoïétiques saines (5). Ainsi, on comprend que l'obésité puisse être un facteur de mauvais pronostic dans le cancer ; le contrôle de la prise de poids étant d'ailleurs recommandé comme mesure préventive contre le cancer (8).

A l'inverse, nous avons mis en évidence un effet cytostatique et cytotoxique de l'adénosine sur les mêmes cellules. Ces résultats ne permettent pas de conclure implicitement que l'adénosine n'entre pas en jeu dans le phénomène prolifératif et protecteur induit par les adipocytes puisque les conditions expérimentales, notamment la concentration et la durée d'exposition de l'adénosine aux cellules, n'étaient pas les mêmes dans les deux modèles d'étude. Après vérification de la fonctionnalité de l'enzyme CD73 des pré-adipocytes, les expériences préliminaires de modulation de son activité enzymatique ainsi que l'étude de l'activation des récepteurs de l'adénosine des cellules cancéreuses par le surnageant de culture des cellules hMAD n'indiquent pas que l'adénosine intervienne dans cet effet. Il est possible qu'une autre molécule, dont la concentration varie selon la quantité de SVF, entre en jeu, comme par exemple la leptine ou bien l'IGF1. En effet, la leptine possède un récepteur sérique (sOB-R) qui module la quantité de forme libre active et il existe également une protéine sérique liant l'IGF1

(IGF1-BP). Une réponse concluante devrait être donnée avec l'exploitation du plasmide shRNA-CD73 sur les pré-adipocytes.

Ce travail s'inscrit dans un projet collaboratif du laboratoire d'accueil sur l'implication de l'adénosine dans le cancer qui comporte des études sur les cellules de l'immunité et tumorales et sur la recherche de moyens de cibler la voie purinergique. Ainsi, la mise en place lors de ce projet de techniques permettant d'étudier la voie adénosinergique telles que la modulation *in vitro* du métabolisme de l'adénosine, l'obtention du profil d'expression de molécules de cette voie, la mesure de l'activation des récepteurs adénosinergiques ou l'obtention d'un plasmide ciblant CD73 sera toujours utile à des études ultérieures dans ce domaine.

CONCLUSIONS

MÉMOIRE SOUTENU PAR M^{lle} Cécile BOSSARD

Il est aujourd'hui établi que l'obésité est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer et que l'interaction entre les adipocytes du microenvironnement tumoral et les cellules cancéreuses joue un rôle dans la progression tumorale. Les adipocytes associés au cancer sont impliqués aussi bien dans la croissance et la migration tumorale que dans la résistance aux traitements.

Lors de mon année recherche au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, nous avons soulevé la problématique de la place de l'adénosine produite par les adipocytes via leur enzyme ecto-5'-nucléotidase (CD73) dans le mécanisme de progression tumorale. En effet, l'adénosine possède un rôle pro-tumoral dans les cancers solides. Sachant que les adipocytes sont le constituant majoritaire du microenvironnement médullaire, nous avons étudié leur effet sur des cellules leucémiques et lymphomateuses.

Ce travail nous a permis d'objectiver un effet prolifératif et protecteur contre la mort spontanée des cellules adipeuses sur ces cellules cancéreuses d'origine hématopoïétique. Nous avons caractérisé les expressions géniques et protéiques et la fonctionnalité de l'enzyme CD73 par des pré-adipocytes. Nous avons également étudié l'expression des récepteurs de l'adénosine par les cellules cancéreuses afin d'attester leur capacité de réponse à cette molécule. Par ailleurs, nous avons défini un effet cytostatique et cytotoxique de l'adénosine à des concentrations supraphysiologiques sur les mêmes cellules. Ces résultats opposés à ceux des pré-adipocytes ont été obtenus dans des conditions expérimentales différentes au niveau de la concentration et de la durée d'exposition des cellules à l'adénosine.

Nos expériences de modulation de l'activité de l'enzyme CD73 et de mesure de l'activation des récepteurs de l'adénosine portent à croire que l'adénosine ne fait pas partie de l'interaction entre les deux types cellulaires. Nous avons grandement initié

l'établissement d'une réponse définitive à notre problématique par la construction d'un plasmide shRNA-CD73 pouvant abroger l'expression de l'enzyme CD73 par les pré-adipocytes.

Ce travail s'inscrit dans un projet collaboratif du laboratoire d'accueil sur l'implication de l'adénosine dans le cancer qui comporte des études sur les cellules immunitaires et tumorales et sur la recherche de moyens de cibler la voie purinergique. La compréhension des relations entre stroma et parenchyme tumoraux ainsi que la définition de la composition biochimique du microenvironnement tumoral sont des étapes nécessaires à l'élaboration de stratégies diagnostiques et thérapeutiques innovantes.

Le président du Jury, *C. Vinciguerra*
(Nom et signature)

Vinciguerra
VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Lyon, le 20.12.13

Vu, la Directrice de PISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon
Pour le Président de l'Université Claude Bernard

Vinciguerra
Professeur Christine VINCIGUERRA



BIBLIOGRAPHIE

1. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Feb;18(1):27–34.
2. Hefetz-Sela S, Scherer PE. Adipocytes: impact on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther.* 2013 May;138(2):197–210.
3. Szychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther.* 2000 Sep;87(2-3):161–73.
4. Gaiba S, França LP de, França JP de, Ferreira LM. Characterization of human adipose-derived stem cells. *Acta Cir Bras.* 2012 Jul;27(7):471–6.
5. Laharrague P, Corberand JX, Cousin B, Penicaud L, Casteilla L. Adipocytes médullaires et hématopoïèse. *Hématologie.* 1999 Oct 12;5(4):255–63.
6. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective [Internet]. 2007 [cited 2013 Jul 3]. Available from: <http://www.dietandcancerreport.org/>
7. Lichtman MA. Obesity and the risk for a hematological malignancy: leukemia, lymphoma, or myeloma. *Oncologist.* 2010;15(10):1083–101.
8. Vainio H, Kaaks R, Bianchini F. Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev.* 2002 Aug;11 Suppl 2:S94–100.
9. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003 Apr 24;348(17):1625–38.
10. Demark-Wahnefried W, Platz EA, Ligibel JA, Blair CK, Courneya KS, Meyerhardt JA, et al. The Role of Obesity in Cancer Survival and Recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Aug 1;21(8):1244–59.
11. Parekh N, Chandran U, Bandera EV. Obesity in cancer survival. *Annu Rev Nutr.* 2012 Aug 21;32:311–42.
12. Zhang Y, Daquinag A, Traktuev DO, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ, March KL, et al. White Adipose Tissue Cells Are Recruited by Experimental Tumors and Promote Cancer Progression in Mouse Models. *Cancer Res.* 2009 Jun 15;69(12):5259–66.
13. Wang Y-Y, Lehuédé C, Laurent V, Dirat B, Dauvillier S, Bochet L, et al. Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett.* 2012 Nov 28;324(2):142–51.
14. Tan J, Buache E, Chenard M-P, Dali-Youcef N, Rio M-C. Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells. *Int J Dev Biol.* 2011;55(7-9):851–9.
15. Yamaguchi J, Ohtani H, Nakamura K, Shimokawa I, Kanematsu T. Prognostic impact of marginal adipose tissue invasion in ductal carcinoma of the breast. *Am J Clin Pathol.* 2008 Sep;130(3):382–8.

16. Elliott BE, Tam SP, Dexter D, Chen ZQ. Capacity of adipose tissue to promote growth and metastasis of a murine mammary carcinoma: effect of estrogen and progesterone. *Int J Cancer*. 1992 May 28;51(3):416–24.
17. Iyengar P, Combs TP, Shah SJ, Gouon-Evans V, Pollard JW, Albanese C, et al. Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene*. 2003 Sep 25;22(41):6408–23.
18. Manabe Y, Toda S, Miyazaki K, Sugihara H. Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol*. 2003 Oct;201(2):221–8.
19. Trivanović D, Nikolić S, Krstić J, Jauković A, Mojsilović S, Ilić V, et al. Characteristics of human adipose mesenchymal stem cells isolated from healthy and cancer affected people and their interactions with human breast cancer cell line MCF-7 in vitro. *Cell Biol Int*. 2013 Oct 23;
20. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2455–65.
21. Zhao M, Dumur CI, Holt SE, Beckman MJ, Elmore LW. Multipotent adipose stromal cells and breast cancer development: Think globally, act locally. *Mol Carcinog*. 2010 Nov;49(11):923–7.
22. Amemori S, Ootani A, Aoki S, Fujise T, Shimoda R, Kakimoto T, et al. Adipocytes and preadipocytes promote the proliferation of colon cancer cells in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Mar;292(3):G923–929.
23. Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev*. 2008 Jun;17(3):463–73.
24. Manabe A, Murti KG, Coustan-Smith E, Kumagai M, Behm FG, Raimondi SC, et al. Adhesion-dependent survival of normal and leukemic human B lymphoblasts on bone marrow stromal cells. *Blood*. 1994 Feb 1;83(3):758–66.
25. Pramanik R, Sheng X, Ichihara B, Heisterkamp N, Mittelman SD. Adipose tissue attracts and protects acute lymphoblastic leukemia cells from chemotherapy. *Leuk Res*. 2013 May;37(5):503–9.
26. Caers J, Deleu S, Belaid Z, De Raeve H, Van Valckenborgh E, De Bruyne E, et al. Neighboring adipocytes participate in the bone marrow microenvironment of multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1580–4.
27. Behan JW, Yun JP, Proektor MP, Ehsanipour EA, Arutyunyan A, Moses AS, et al. Adipocytes impair leukemia treatment in mice. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7867–74.
28. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2094–101.

29. Bochet L, Lehuede C, Dauvillier S, Wang YY, Dirat B, Laurent V, et al. Adipocyte-Derived Fibroblasts promote tumor progression and contribute to desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 2013 Jul 31;
30. MacDougald OA, Burant CF. The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metab.* 2007 Sep;6(3):159–61.
31. Jardé T, Perrier S, Vasson M-P, Caldefie-Chézet F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur J Cancer.* 2011 Jan;47(1):33–43.
32. Cleary MP, Phillips FC, Getzin SC, Jacobson TL, Jacobson MK, Christensen TA, et al. Genetically obese MMTV-TGF-alpha/Lep(ob)Lep(ob) female mice do not develop mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Feb;77(3):205–15.
33. Hino M, Nakao T, Yamane T, Ohta K, Takubo T, Tatsumi N. Leptin receptor and leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2000 Feb;36(5-6):457–61.
34. Tabe Y, Konopleva M, Munsell MF, Marini FC, Zompetta C, McQueen T, et al. PML-RARalpha is associated with leptin-receptor induction: the role of mesenchymal stem cell-derived adipocytes in APL cell survival. *Blood.* 2004 Mar 1;103(5):1815–22.
35. Konopleva M, Mikhail A, Estrov Z, Zhao S, Harris D, Sanchez-Williams G, et al. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood.* 1999 Mar 1;93(5):1668–76.
36. Battula VL, Chen Y, Cabreira M da G, Ruvolo V, Wang Z, Ma W, et al. Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. *Blood.* 2013 Jul 18;122(3):357–66.
37. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev.* 2012 Aug;33(4):547–94.
38. Dirat B. Les adipocytes associés au cancer : nouveaux acteurs de la progression tumorale : un lien entre obésité et cancer [Internet]. Toulouse 3; 2010 [cited 2013 Jul 24]. Available from: <http://www.theses.fr/2010TOU30104>
39. Bentov Y, Werner H. IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) [Internet]. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematology. 2008. Available from: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/IGF1RID40928ch15q26.html>
40. Liu E, Samad F, Mueller BM. Local adipocytes enable estrogen-dependent breast cancer growth: Role of leptin and aromatase. *Adipocyte.* 2013 Jul 1;2(3):165–9.
41. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956 Feb 24;123(3191):309–14.
42. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011;17(11):1498–503.
43. Leth-Larsen R, Lund R, Hansen HV, Laenkholtm A-V, Tarin D, Jensen ON, et al. Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified

- by comparative quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Jun;8(6):1436–49.
44. Sounni NE, Noel A. Targeting the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Clinical Chemistry*. 2013 Jan 1;59(1):85–93.
45. Wan AMD, Chandler EM, Madhavan M, Infanger DW, Ober CK, Gourdon D, et al. Fibronectin conformation regulates the proangiogenic capability of tumor-associated adipogenic stromal cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Sep;1830(9):4314–20.
46. Kushiro K, Chu RA, Verma A, Núñez NP. Adipocytes Promote B16BL6 Melanoma Cell Invasion and the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Microenviron*. 2012 Apr;5(1):73–82.
47. Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Jun;12(6):447–64.
48. Burnstock G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays*. 2012 Mar;34(3):218–25.
49. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001 Dec;53(4):527–52.
50. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*. 2013 Mar 28;368(13):1260.
51. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013 Apr 16;
52. Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 2010 Sep 30;29(39):5346–58.
53. Freundlieb M, Zimmermann H, Müller CE. A new, sensitive ecto-5'-nucleotidase assay for compound screening. *Anal Biochem*. 2013 Oct 18;
54. Knapp K, Zebisch M, Pippel J, El-Tayeb A, Müller CE, Sträter N. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure*. 2012 Dec 5;20(12):2161–73.
55. Thomson LF, Ruedi JM, Glass A, Moldenhauer G, Moller P, Low MG, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Tissue Antigens*. 1990 Jan;35(1):9–19.
56. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May;1783(5):673–94.
57. Sadej R, Inai K, Rajfur Z, Ostapkowicz A, Kohler J, Skladanowski AC, et al. Tenascin C interacts with ecto-5'-nucleotidase (eN) and regulates adenosine generation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan;1782(1):35–40.

58. Yegutkin GG, Samburski SS, Jalkanen S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J*. 2003 Jul;17(10):1328–30.
59. Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*. 1992 Jul 15;285 (Pt 2):345–65.
60. Bjursell MK, Blom HJ, Cayuela JA, Engvall ML, Lesko N, Balasubramaniam S, et al. Adenosine kinase deficiency disrupts the methionine cycle and causes hypermethioninemia, encephalopathy, and abnormal liver function. *Am J Hum Genet*. 2011 Oct 7;89(4):507–15.
61. Cassani B, Mirolo M, Cattaneo F, Benninghoff U, Hershfield M, Carlucci F, et al. Altered intracellular and extracellular signaling leads to impaired T-cell functions in ADA-SCID patients. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4209–19.
62. Van De Wiele CJ, Vaughn JG, Blackburn MR, Ledent CA, Jacobson M, Jiang H, et al. Adenosine kinase inhibition promotes survival of fetal adenosine deaminase-deficient thymocytes by blocking dATP accumulation. *J Clin Invest*. 2002 Aug;110(3):395–402.
63. Young JD, Yao SYM, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med*. 2013 Jun;34(2-3):529–47.
64. Chen J-F, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets - what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Apr;12(4):265–86.
65. Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz K-N, et al. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2002 Oct;119(4):923–33.
66. Montinaro A, Iannone R, Pinto A, Morello S. Adenosine receptors as potential targets in melanoma. *Pharmacol Res*. 2013 Jul 12;
67. Jacobson KA, Gao Z-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Mar;5(3):247–64.
68. Schulte G, Fredholm BB. Human adenosine A(1), A(2A), A(2B), and A(3) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol Pharmacol*. 2000 Sep;58(3):477–82.
69. Gessi S, Merighi S, Fazzi D, Stefanelli A, Varani K, Borea PA. Adenosine receptor targeting in health and disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011 Dec;20(12):1591–609.
70. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*. 2001 Dec 20;414(6866):916–20.
71. Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res*. 2012 Nov 1;72(21):5441–7.
72. Mujoomdar M, Bennett A, Hoskin D, Blay J. Adenosine stimulation of proliferation of breast carcinoma cell lines: evaluation of the [3H]thymidine assay system and

- modulatory effects of the cellular microenvironment in vitro. *J Cell Physiol.* 2004 Dec;201(3):429–38.
73. Mujoomdar M, Hoskin D, Blay J. Adenosine stimulation of the proliferation of colorectal carcinoma cell lines. Roles of cell density and adenosine metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2003 Nov 1;66(9):1737–47.
74. Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Simioni C, et al. Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2007 Aug;72(2):395–406.
75. Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal.* 2013 Jun 25;
76. Frey JA, Gandhi V. 8-Amino-adenosine inhibits multiple mechanisms of transcription. *Mol Cancer Ther.* 2010 Jan;9(1):236–45.
77. Minelli A, Bellezza I, Agostini M, Bracarda S, Culig Z. Mechanism of 2-chloroadenosine toxicity to PC3 cell line. *Prostate.* 2006 Sep 15;66(13):1425–36.
78. Carlson CC, Chinery R, Burnham LL, Dransfield DT. 8-Cl-adenosine-induced inhibition of colorectal cancer growth in vitro and in vivo. *Neoplasia.* 2000 Oct;2(5):441–8.
79. Robinson-White AJ, Hsiao H-P, Leitner WW, Greene E, Bauer A, Krett NL, et al. Protein kinase A-independent inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human thyroid cancer cells by 8-Cl-adenosine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Mar;93(3):1020–9.
80. Langeveld CH, Jongenelen CA, Heimans JJ, Stoof JC. Growth inhibition of human glioma cells induced by 8-chloroadenosine, an active metabolite of 8-chloro cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *Cancer Res.* 1992 Jul 15;52(14):3994–9.
81. Garcia-Gil M, Tozzi MG, Allegrini S, Folcarelli S, Della Sala G, Voccoli V, et al. Novel metabolic aspects related to adenosine deaminase inhibition in a human astrocytoma cell line. *Neurochem Int.* 2012 Apr;60(5):523–32.
82. Ohkubo S, Nagata K, Nakahata N. Adenosine uptake-dependent C6 cell growth inhibition. *Eur J Pharmacol.* 2007 Dec 22;577(1-3):35–43.
83. Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, et al. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem.* 2008 Dec;319(1-2):61–8.
84. Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, et al. RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biol Ther.* 2005 Dec;4(12):1355–60.
85. Gessi S, Merighi S, Sacchetto V, Simioni C, Borea PA. Adenosine receptors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011 May;1808(5):1400–12.

86. Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J, Flament S. Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2009 Apr;21(4):977–81.
87. Kalhan A, Gharibi B, Vazquez M, Jasani B, Neal J, Kidd M, et al. Adenosine A2A and A2B receptor expression in neuroendocrine tumours: potential targets for therapy. *Purinergic Signal.* 2012 Jun;8(2):265–74.
88. Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, et al. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73+ tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 Aug 20;
89. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MKK, et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Aug 29;103(35):13132–7.
90. Gessi S, Merighi S, Varani K, Leung E, Mac Lennan S, Borea PA. The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacol Ther.* 2008 Jan;117(1):123–40.
91. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* 2012 May;33(5):231–7.
92. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou J-F, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene.* 2012 Jul 2;
93. Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A, Mitchell BS. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15;10(2):708–17.
94. Ujházy P, Klobusická M, Babusíková O, Strausbauch P, Mihich E, Ehrke MJ. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) in multidrug-resistant cell lines generated by doxorubicin. *Int J Cancer.* 1994 Oct 1;59(1):83–93.
95. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 Jun 17;
96. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008 Mar;134(3):365–72.
97. Zhi X, Chen S, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, et al. RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(6):439–48.
98. Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, et al. Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol Ther.* 2007 Mar;6(3):426–31.
99. Zhou X, Zhi X, Zhou P, Chen S, Zhao F, Shao Z, et al. Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2007 Jun;17(6):1341–6.

100. Terp MG, Olesen KA, Arnspang EC, Lund RR, Lagerholm BC, Ditzel HJ, et al. Anti-Human CD73 Monoclonal Antibody Inhibits Metastasis Formation in Human Breast Cancer by Inducing Clustering and Internalization of CD73 Expressed on the Surface of Cancer Cells. *J Immunol*. 2013 Sep 16;
101. Wu X-R, He X-S, Chen Y-F, Yuan R-X, Zeng Y, Lian L, et al. High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2012 Aug 1;106(2):130–7.
102. Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemelä J, Laurila JP, Elimä K, et al. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol*. 2011 May;41(5):1231–41.
103. Fishman P, Bar-Yehuda S, Ohana G, Pathak S, Wasserman L, Barer F, et al. Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the A3 adenosine receptor. *Eur J Cancer*. 2000 Jul;36(11):1452–8.
104. Bajaj S, Insel J, Quagliata F, Hirschhorn R, Silber R. Adenosine and adenosine analogues are more toxic to chronic lymphocytic leukemia than to normal lymphocytes. *Blood*. 1983 Jul;62(1):75–80.
105. Tanaka Y, Yoshihara K, Tsuyuki M, Kamiya T. Apoptosis induced by adenosine in human leukemia HL-60 cells. *Exp Cell Res*. 1994 Jul;213(1):242–52.
106. Streitová D, Weiterová L, Hofer M, Holá J, Horváth V, Kozubík A, et al. Effect of adenosine on the growth of human T-lymphocyte leukemia cell line MOLT-4. *Cancer Invest*. 2007 Sep;25(6):419–26.
107. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, et al. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*. 2011 Dec 1;118(23):6141–52.
108. Wieten E, van der Linden-Schrever BEM, Sonneveld E, Veerman AJ, Pieters R. CD73 (5'-nucleotidase) expression has no prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2011 Aug;25(8):1374–6.
109. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6267–76.
110. Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J Mol Med*. 2013 Feb;91(2):165–72.
111. Mikhailov A, Sokolovskaya A, Yegutkin GG, Amdahl H, West A, Yagita H, et al. CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *J Immunol*. 2008 Jul 1;181(1):464–75.
112. Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, Peters GJ, Hählen K, van der Does-van den Berg A, et al. Relation of 5'-nucleotidase and phosphatase activities with immunophenotype, drug resistance and clinical prognosis in childhood leukemia. *Leuk Res*. 1992 Sep;16(9):873–80.

113. Veerman AJ, Hogeman PH, van Zantwijk CH, Bezemer PD. Prognostic value of 5'-nucleotidase in acute lymphoblastic leukemia with the common-ALL phenotype. *Leuk Res.* 1985;9(10):1227-9.
114. Zhang B. CD73: a novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 2010 Aug 15;70(16):6407-11.
115. Allard B, Pommey S, Smyth MJ, Stagg J. Targeting CD73 enhances the anti-tumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res.* 2013 Aug 27;
116. Burger RM, Lowenstein JM. Preparation and properties of 5'-nucleotidase from smooth muscle of small intestine. *J Biol Chem.* 1970 Dec 10;245(23):6274-80.
117. Ripphausen P, Freundlieb M, Brunschweiler A, Zimmermann H, Müller CE, Bajorath J. Virtual screening identifies novel sulfonamide inhibitors of ecto-5'-nucleotidase. *J Med Chem.* 2012 Jul 26;55(14):6576-81.
118. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Jan 26;107(4):1547-52.
119. Hilchey SP, Kobie JJ, Cochran MR, Secor-Socha S, Wang J-CE, Hyrien O, et al. Human follicular lymphoma CD39+-infiltrating T cells contribute to adenosine-mediated T cell hyporesponsiveness. *J Immunol.* 2009 Nov 15;183(10):6157-66.
120. Mediavilla-Varela M, Luddy K, Noyes D, Khalil FK, Neuger AM, Soliman H, et al. Antagonism of adenosine A2A receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their growth. *Cancer Biol Ther.* 2013 Jul 17;14(9).
121. Müller CE, Jacobson KA. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2011 May;1808(5):1290-308.
122. Ohta A, Kjaergaard J, Sharma S, Mohsin M, Goel N, Madasu M, et al. In vitro induction of T cells that are resistant to A2 adenosine receptor-mediated immunosuppression. *Br J Pharmacol.* 2009 Jan;156(2):297-306.
123. Kalla RV, Zablocki J. Progress in the discovery of selective, high affinity A2B adenosine receptor antagonists as clinical candidates. *Purinergic Signalling.* 2008 Jun 21;5(1):21-9.
124. Stemmer S. A phase II, multi-center study of a new non-cytotoxic A3 adenosine receptor agonist CF101, dose-finding (randomized blinded) in patients (pts) with refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Onco (Meeting Abstracts).* 2006 Jun;24(18_suppl).
125. Stemmer SM, Benjaminov O, Medalia G, Ciuraru NB, Silverman MH, Bar-Yehuda S, et al. CF102 for the treatment of hepatocellular carcinoma: a phase I/II, open-label, dose-escalation study. *Oncologist.* 2013;18(1):25-6.
126. Quah BJC, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J Vis Exp.* 2010;(44).

127. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Mar;134(3):365–72.
128. Børglum JD, Vassaux G, Richelsen B, Gaillard D, Darimont C, Ailhaud G, et al. Changes in adenosine A1- and A2-receptor expression during adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol*. 1996 Mar 1;117(1):17–25.
129. Spsychala J, Datta NS, Takabayashi K, Datta M, Fox IH, Gribbin T, et al. Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Feb 6;93(3):1232–7.
130. Bruserud O. Effect of dipyridamole, theophyllamine and verapamil on spontaneous in vitro proliferation of myelogenous leukaemia cells. *Acta Oncol*. 1992;31(1):53–8.
131. Iizasa T, Kubota M, Carson DA. Modulation of adenine nucleoside excretion and incorporation in adenosine deaminase deficient human lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Jun 15;121(2):514–20.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.