

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR  
MATHIEU DUFRESNE

LES MACROPHAGES DE TYPE M1 ET M2 RÉGULENT DIFFÉREMMENT  
L'INVASION ET LA PROLIFÉRATION DE CELLULES TUMORALES  
DE LA VESSIE

DÉCEMBRE 2010

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce projet. Je suis spécialement reconnaissant envers mon directeur de recherche, Carlos Reyes-Moreno, Ph.D. qui m'a permis d'entreprendre mes études supérieures et qui a été présent tout au long de ma maîtrise. Je tiens également à remercier monsieur Eric Asselin, Ph.D. qui a généreusement mis à notre disposition le matériel nécessaire à l'avancement de nos recherches, et tous les membres de son laboratoire qui nous ont fourni supports techniques et conseils. Je remercie également Katy Leduc pour son aide précieuse lors de l'élaboration de certaines figures. Évidemment, je remercie tous les collègues qui ont travaillé dans le laboratoire du professeur Moreno pendant ma maîtrise et qui ont contribué à rendre le milieu de travail enrichissant et stimulant.

## RÉSUMÉ

Les macrophages (MØs) sont un des constituants majeurs du stroma du cancer de la vessie chez l'humain et ils jouent un rôle important au niveau de la croissance tumorale et de la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale. Un modèle de MØs dérivés de monocytes sanguins polarisés en phénotype M1 et M2 et les cellules de cancer de la vessie T24 ont été utilisé pour étudier le rôle des MØs polarisés sur la viabilité et l'invasivité des cellules du cancer de la vessie. Les facteurs solubles dérivés des MØs M1 inhibent la prolifération des cellules T24 mais n'induisent pas d'apoptose caspase-3 dépendante. En réponse aux facteurs solubles produits par les MØs M1, l'invasivité des cellules T24 est augmentée. Le blocage du récepteur du TNF- $\alpha$  ou de la voie de signalisation de la PI 3-kinase/Akt inhibe l'invasion des cellules T24 mais n'affecte pas leur viabilité. Les facteurs solubles produits par les MØs M2 favorisent la prolifération des cellules T24 et sont en mesure de contrecarrer l'effet inhibiteur des facteurs solubles produits par les MØs M1 sur la prolifération des cellules T24. La prolifération dans les cocultures T24/ MØ augmente avec les MØs M2 mais diminue avec les MØs M1. L'ajout d'IL-10 permet d'atténuer l'inhibition de la prolifération observée dans les cocultures T24/ MØ M1.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les MØs polarisés sont en mesure de réguler la prolifération et l'invasion des cellules tumorales de la vessie et supportent l'idée que les interactions entre le stroma et la tumeur peuvent influencer la progression du cancer de la vessie vers des tumeurs plus agressives *in vivo*.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
RÉSUMÉ .....	iii
TABLEAU.....	vi
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES.....	viii
<b>CHAPITRE 1</b>	
<b>IMPLICATION DU MACROPHAGE DANS L'IMMUNITÉ ANTI-TUMORALE....</b>	<b>1</b>
1.1 Le macrophage, origine et fonctions.....	1
1.2 Élimination des cellules tumorales par les macrophages .....	2
1.2.1 <i>Reconnaissance des cellules tumorales</i> .....	2
1.2.2 <i>Cytotoxicité médiée par des facteurs solubles</i> .....	3
1.2.3 <i>Cytotoxicité par contact cellule-cellule</i> .....	5
1.2.4 <i>Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps</i> .....	6
<b>CHAPITRE 2</b>	
<b>RÔLE DU MACROPHAGE DANS LA PROGRESSION TUMORALE.....</b>	<b>7</b>
2.1 Macrophages associés aux tumeurs et pronostic.....	7
2.2 Polarisation des macrophages .....	8
2.3 Le recrutement et la polarisation des TAMs .....	10
2.4 Rôle des TAMs dans l'angiogenèse .....	11
2.5 Rôle des TAMs dans l'invasion et la formation de métastases.....	13
2.6 Rôle des TAMs dans l'immunosuppression.....	14
<b>CHAPITRE 3</b>	
<b>LE CANCER DE LA VESSIE .....</b>	<b>20</b>
3.1 Cancer de la vessie et TAMs.....	20

3.2	Traitement au bacille de Calmette-Guérin .....	21
3.3	Implication des MØs dans le traitement au BCG .....	21

## **CHAPITRE 4**

<b>PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>23</b>	
4.1	Problématique et hypothèses .....	23
4.2	Objectifs et méthodologie .....	24

## **CHAPITRE 5**

<b>CORPS DU TRAVAIL .....</b>	<b>26</b>	
5.1	Résumé de l'article .....	26
5.2	Article scientifique.....	28
	Figure legends.....	54

## **CHAPITRE 6**

<b>DISCUSSION.....</b>	<b>67</b>	
6.1	Génération de MØs polarisés .....	67
6.2	Influence des MØs polarisés sur la prolifération des cellules T24 .....	68
6.3	Influence des MØs polarisés sur l'invasion des cellules T24 .....	74
6.4	Conclusion.....	76

<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>79</b>
----------------------------	-----------

## TABLEAU

	<b>Page</b>
<b>2.1</b> Facteurs présents dans l'environnement tumoral.....	16

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
1.1	Signalisation du TNF-R1 ..... 4
4.1	Test d'invasion ..... 25
5.1	Morphological and functional features of human polarized MØs ..... 58
5.2	Cell viability analysis in tumor cell/MØ cocultures ..... 59
5.3	Soluble factors from polarized MØs influence T24 cancer cell viability .. 60
5.4	Influence of M2-derived factors on M1-mediated T24 cell growth arrest ..... 61
5.5	IL-10 weakens the cytotoxic effects of M1 cells in tumor cell/MØ cocultures ..... 62
5.6A	M1 cells up-regulate gene expression and invasiveness of T24 cancer cells ..... 63
5.6B	M1 cells up-regulate gene expression and invasiveness of T24 cancer cells ..... 64
5.7	Influence of TNF-R1 function in T24 cell invasiveness and viability ..... 65
5.8	Akt and p38 signalling pathways in T24 cell survival and invasion ..... 66
6.1	Régulation de l'apoptose ..... 70
6.2	Disposition des TAMs au sein de l'environnement tumoral ..... 77



## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

Akt	Protéine kinase B
ARG	Arginase
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
Bcl	B-cell leukemia/lymphoma
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
EGF	Facteur de croissance épidermal
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermal
GM-CSF	Facteurs stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
HGF	Facteur de croissance hépatique
ICAM	Molécule d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines
IFN	Interféron
IL	Interleukine
iNOS	Synthétase de l'oxyde nitrique inducible
IP	Protéine inducible par l'IFN
kDa	Kilo dalton
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Protéine activée par le mitogène
MCP	Protéine chimioattractante des macrophages
M-CSF	Facteur stimulant les colonies de macrophages
MDC	Chimiokine dérivée des macrophages
MIG	Monokine induite par l'IFN- $\gamma$
MIP	Protéine inflammatoire des macrophages
MMP	Métalloprotéase matricielle
MØ	Macrophage

NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire kappa B
NK	Cellules tueuses naturelles
NO	Oxyde nitrique
NOS	Synthétase de l'oxyde nitrique
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI	Phosphoinoside
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acétate
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor $\kappa$ B Ligand
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
SDF	Facteur dérivé des cellules stromales
TAMs	Macrophages associés aux tumeurs
TGF	Facteur de croissance transformant
Th	Lymphocyte T auxiliaire
TNF	Facteur de nécrose tumoral
TNF-R	Récepteur du facteur de nécrose tumoral
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
Treg	Cellules T régulatrices
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

## CHAPITRE 1

### IMPLICATION DU MACROPHAGE DANS L'IMMUNITÉ ANTI-TUMORALE

#### 1.1 Le macrophage, origine et fonctions

Les macrophages (MØs) sont des cellules immunitaires dérivant de la lignée myéloïde. Le précurseur du MØ, le monocyte, est produit dans la moelle osseuse pour ensuite passer dans la circulation sanguine où il circulera durant quelques heures. Il migrera ensuite vers les tissus sous l'influence de protéines chimiotactiques (chimiokines) et sera différencié soit en cellule dendritique, soit en MØ [1]. Comme les monocytes ont une durée de vie très courte (moins de 3 jours) cette différenciation est essentielle à leur survie.

En tant que phagocytes dans les tissus, les MØs jouent plusieurs rôles dans la réponse immunitaire aussi bien acquise qu'innée. Ce sont des cellules qui phagocytent les pathogènes et les débris cellulaires pour ensuite les digérer à l'aide de plusieurs molécules réactives dont le lysozyme, l'oxyde nitrique (*nitric oxide*, NO) et des intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène [2]. Ils possèdent également des récepteurs Fc qui leur permettent d'identifier et de phagocyter plus facilement les particules qui sont reconnues par des anticorps spécifiques (pathogènes, toxines) [2]. Un second rôle important des MØs est l'apprêtement et la présentation de l'antigène aux cellules T. Lorsque les MØs phagocytent une protéine, celle-ci n'est pas complètement dégradée. Il subsiste de petits peptides d'une taille d'environ 13 à 18 acides aminés. Ces peptides seront présentés à la surface membranaire par les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces complexes antigène-CMH II activeront par la suite des lymphocytes T auxiliaires (Th pour *T helper*) spécifiques de l'antigène [2]. Un autre rôle des MØs est la

sécrétion de facteurs agissant dans la réponse immunitaire, c'est-à-dire, des protéines du complément, des prostaglandines, des facteurs de croissance, des enzymes hydrolytiques (protéases, lysozyme) et des cytokines [2]. Les MØs sont également impliqués dans la réponse-immunitaire anti-tumorale [3, 4]. Cet aspect du rôle des MØs sera présenté plus en détails durant ce chapitre.

## 1.2 Élimination des cellules tumorales par les macrophages

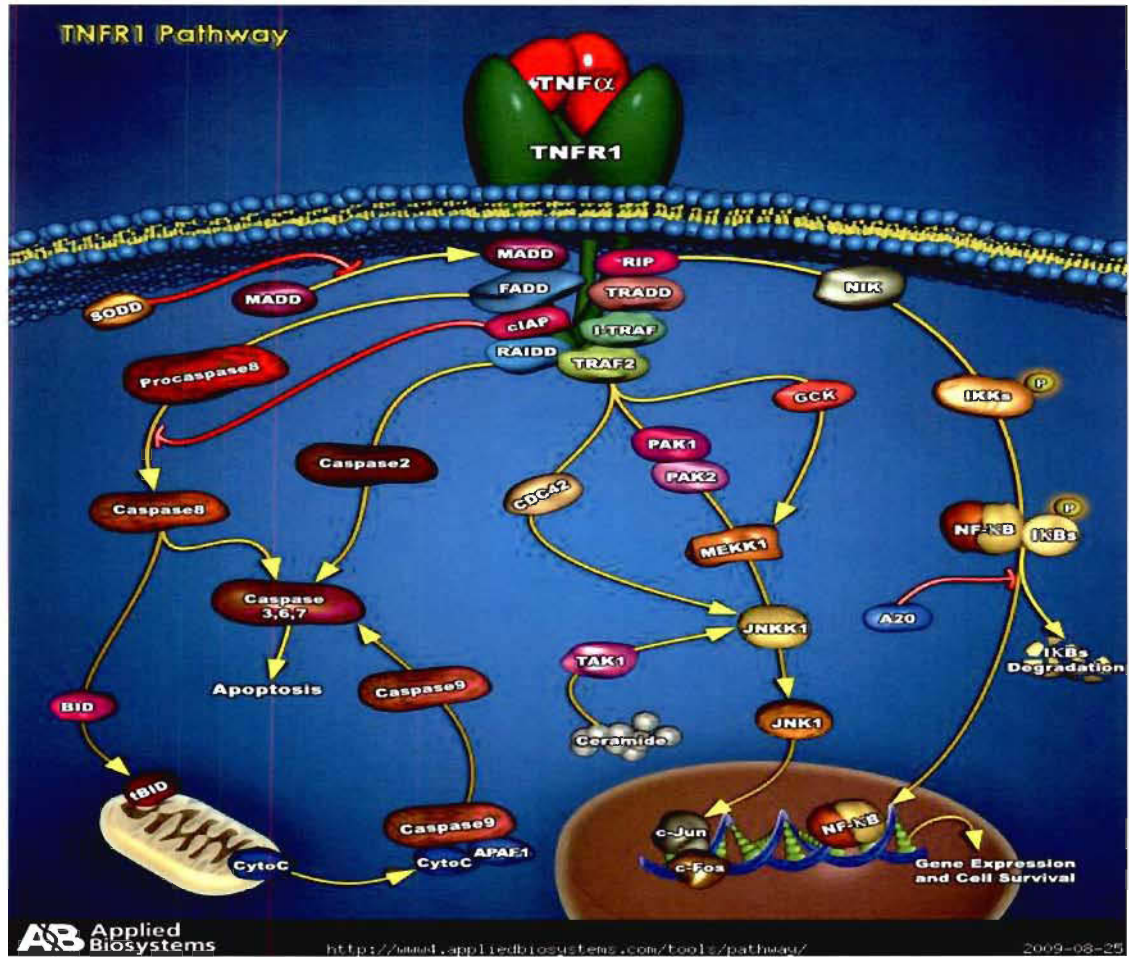
### 1.2.1 Reconnaissance des cellules tumorales

Pour pouvoir éliminer les cellules tumorales, les MØs doivent d'abord être en mesure de les identifier. La capacité des MØs à reconnaître spécifiquement une cellule tumorale réside dans le fait que ces dernières présentent des différences dans leurs compositions membranaires. Par exemple, l'augmentation de la quantité d'une phosphatidylsérine, la N-ethylmaleimide, sur le feuillet externe de la membrane de cellules tumorales entraîne leur lyse et leur phagocytose par des macrophages [5]. De plus, l'altération du profil de glycosylation des glucides complexes à la surface des cellules cancéreuses est un autre mécanisme par lequel elles peuvent être reconnues [6-8]. Les MØs peuvent reconnaître ces structures via des récepteurs "*lectine-like*" exprimés à leur surface [6, 7].

Après l'avoir identifiée, le MØ peut provoquer la mort d'une cellule tumorale par différents mécanismes, soit par la production de médiateurs solubles, soit par contact cellule-cellule ou encore via la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante.

### 1.2.2 Cytotoxicité médiée par des facteurs solubles

Les principaux médiateurs solubles produits par les MØs capables d'induire la mortalité des cellules tumorales sont le *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) et le NO. Le TNF- $\alpha$  est une protéine soluble de 17kDa qui est sécrétée sous forme homotrimérique après le clivage de celle-ci encrée à la membrane plasmique [9]. Autant la forme membranaire que la forme soluble sont en mesure d'induire la mort cellulaire des cellules qui expriment son récepteur [10, 11]. Le TNF- $\alpha$  possède deux récepteurs qui ont des rôles biologiques distincts : le TNF-R1, qui est exprimé par la plupart des cellules de l'organisme, et le TNF-R2, principalement exprimé par les cellules hématopoïétiques [12, 13]. L'activation du récepteur TNF-R1 induit la mortalité cellulaire, l'activité anti-virale et l'activation de la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B (de *nuclear factor- $\kappa$ B*). L'activation du récepteur TNF-R2, quant à lui, induit plutôt la prolifération des thymocytes et des lymphocytes T cytotoxiques [13, 14]. La liaison du TNF- $\alpha$  au TNF-R1 peut conduire à la mort cellulaire par apoptose en induisant une cascade de signalisation cellulaire qui aboutit à l'activation des protéases exécutrices de la mort cellulaire programmée, appelées caspases [15]. Paradoxalement, l'activation du TNF-R1 peut également conduire à l'activation de la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B, ce dernier étant un facteur de transcription qui induit l'expression de gènes favorisant la survie cellulaire (voir Figure 1.1) [16]. La mort ou la survie de la cellule cible dépend donc en grande partie du contexte qui avantagera soit l'activation des caspases conduisant vers l'apoptose, soit l'activation du NF- $\kappa$ B qui favorise la survie [16, 17]. Le TNF- $\alpha$ , comme son nom l'indique, est capable de provoquer la nécrose des tumeurs *in vivo*. De nombreuses études ont démontré que de fortes doses de TNF- $\alpha$  injectées localement induisaient la nécrose de tumeurs isogéniques et de xénogreffes [18-21]. On a également observé que certains types de tumeurs étaient sensibles à une nécrose hémorragique suite à une injection systémique de TNF- $\alpha$ , mettant en évidence le fait que le TNF- $\alpha$  peut avoir un effet anti-angiogénique [20, 22, 23].



**FIGURE 1.1 : Signalisation du TNF-R1.** Lorsque le TNF- $\alpha$  se lie au TNF-R1, il active la caspase 8 via la protéine FADD (*fas associated death domain*). Cela a pour effet d'engendrer la cascade des caspases et de provoquer la relâche de cytochrome C par les mitochondries qui conduira à l'apoptose. D'une autre part, l'activation du TNF-R1 provoque l'activation des voies de signalisations du NF- $\kappa$ B et des JNK conduisant à l'expression de gènes favorisant la survie cellulaire.

Le NO produit par les M $\phi$ s est synthétisé à partir de la L-arginine par l'enzyme oxyde nitrique synthétase (NOS). Cet enzyme possède une forme exprimée de façon constitutive et une autre forme inducible (iNOS). Les M $\phi$ s peuvent exprimer la forme inducible en réponse à plusieurs cytokines et composants de parois bactériennes. Les facteurs les plus connus pour induire l'expression de iNOS par les M $\phi$ s sont l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et le lipopolysaccharide (LPS) [24]. L'effet toxique du NO sur les cellules est

provoqué par plusieurs mécanismes. Premièrement, le NO cause une perte en fer chez les cellules ciblées, inactivant ainsi les enzymes contenant un noyau fer-souffre comme le NADH-ubiquinone oxydoréductase et le succinate-ubiquinone oxydoréductase de la chaîne de transport d'électron mitochondriale [25, 26]. Deuxièmement, le NO est capable d'induire la relâche de zinc par les protéines qui en contiennent, induisant ainsi la formation de ponts disulfures. La formation de ces ponts disulfures inhibe la liaison à l'ADN des facteurs de transcription de type doigt de zinc [27]. Troisièmement, le NO est capable d'influencer l'activité des canaux ioniques, détruisant ainsi le potentiel membranaire mitochondrial [28]. Plusieurs études ont rapporté un effet pro-apoptotique du NO sur les cellules tumorales [29-32]. Cependant, de fortes concentrations de NO sont nécessaires pour provoquer la mort cellulaire. Le iNOS constitue donc la source majeure en NO pour induire l'apoptose *in vivo* des cellules tumorales [33, 34].

### 1.2.3 Cytotoxicité par contact cellule-cellule

La cytotoxicité dépendante du contact cellule-cellule a été mise en évidence par le fait que la susceptibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par les MØs en coculture est en corrélation avec l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1). En effet, les cellules les plus résistantes à la cytotoxicité induite par les MØ sont celles qui expriment le moins de ICAM-1. De plus, la sensibilité des cellules cancéreuses à la cytotoxicité induite par les MØs est diminuée en présence d'anticorps anti-ICAM-1 [35, 36]. Les deux principaux effecteurs de la cytotoxicité par contact cellule-cellule médiée par les MØs sont deux protéines de la famille TNF, le TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) et le Fas ligand. Ces deux protéines membranaires induisent l'apoptose par un mécanisme semblable à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  [37, 38]. Il a également été rapporté que l'IL-1 $\alpha$  membranaire était en mesure de provoquer la mort de cellules cancéreuses par contact cellules-cellules [39].

#### *1.2.4 Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps*

La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps implique la production d'anticorps spécifiques reconnaissant des antigènes exprimés par les cellules tumorales. Les MØs sont capables de reconnaître les cellules liées par des anticorps via leurs récepteurs Fc [40]. Une fois l'anticorps lié, le MØ peut s'attaquer à la cellule cible par contact cellule-cellule ou en sécrétant des facteurs solubles comme le TNF- $\alpha$  et le NO [40-42]. Il peut également provoquer la mort de la cellule cible de façon indirecte via l'activation des protéines du complément [43]. Les principaux anticorps impliqués dans la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps appartiennent à la classe des IgG [40, 44]. Il existe à l'heure actuelle plusieurs traitements anti-cancer impliquant l'utilisation d'anticorps IgG induisant une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps chez les cellules tumorales. Par exemple, le rituximab est un anticorps monoclonal de type IgG1 qui est dirigé contre le CD20, ce dernier étant exprimé par plus de 90% des cellules B de lymphomes non-Hodgkiniens [45]. Il fut démontré que l'anticorps était en mesure d'induire la destruction des cellules cancéreuses par les MØs et les cellules NK, ainsi que par les protéines du complément [46].



## CHAPITRE 2

### RÔLE DU MACROPHAGE DANS LA PROGRESSION TumorALE

#### 2.1 Macrophages associés aux tumeurs et pronostic

Il est connu que les tumeurs solides sont infiltrées par de nombreux MØs, que l'on nomme *Tumor-Associated Macrophages* (TAMs). Malgré le fait que les TAMs sont capables d'induire une réaction immunitaire anti-tumorale et d'éliminer les cellules cancéreuses dans certaines circonstances, principalement dans les cancers du colon et de l'estomac [47, 48], il semble que leur présence au sein de l'environnement tumorale est plutôt associée à un mauvais pronostic dans la majorité des cancers [49]. En effet, l'infiltration des TAMs au site tumoral est corrélée à un mauvais pronostic, entre autres, chez les cancers du sein, de la prostate, de l'endomètre, du col de l'utérus, du rein et de la vessie [50-55].

Les TAMs peuvent être en mesure de favoriser la progression tumorale via différents mécanismes, notamment, en favorisant l'angiogenèse qui est essentielle au développement de tumeurs de taille de plus 3 mm<sup>3</sup> [36, 49]. Les TAMs expriment également plusieurs facteurs de croissance pouvant stimuler la prolifération des cellules tumorales, comme l'EGF, le TGF- $\beta$ , le bFGF, le HGF et le PDGF (voir Tableau 2.1)[49]. Cependant, l'influence des TAMs sur le pronostic s'explique principalement par le fait que la présence des TAMs en grande quantité est associée à un plus grand potentiel métastatique des tumeurs. À ce titre, les TAMs peuvent favoriser la migration et l'invasion tissulaire par des cellules cancéreuses en produisant des enzymes protéolytiques, comme des métalloprotéases, pouvant dégrader la matrice extracellulaire [49]. De plus, les TAMs présenteraient un phénotype incapable d'induire une réponse anti-tumorale efficace. Par exemple, on a observé que

des MØs isolés à partir de patientes atteintes de cancer ovarien étaient incapables d'éliminer des cellules cancéreuses *in vitro* par cytotoxicité dépendante des anticorps, contrairement aux MØs isolés à partir de patientes saines [56].

## 2.2 Polarisation des macrophages

L'activation des MØs en réponse à des agents microbiens ou à des cytokines comme l'IFN- $\gamma$  est connue depuis longtemps; il s'agit de la voie classique d'activation des MØs [57]. Plus récemment, il fut admis que les molécules anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes et les interleukines (IL)-4, IL-10 et IL-13, sont plus que de simples inhibiteurs de l'activation des MØs mais qu'ils induisent un programme d'activation distinct, qualifié de voie d'activation alternative des MØs [58]. On donne l'appellation M1 et M2 aux MØs activés via la voie classique ou alternative respectivement. Les MØs M1 et M2 possèdent des rôles opposés au niveau des réponses inflammatoires et immunitaires. Il est cependant important de mentionner que le concept M1 et M2 est une simplification de la réalité et que l'on doit considérer qu'il existe *in vivo* un spectre de polarisation continu dont les M1 et les M2 constituent les extrémités [58].

Les MØs M1 sont impliqués dans l'initiation de la réponse inflammatoire et la destruction des pathogènes. Les MØs sont polarisés vers un phénotype M1 en réponse à des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-12 et le GM-CSF (de *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), ou encore, par des molécules dérivant de pathogènes bactériens comme le LPS [58]. Les MØs M1 produisent de grandes quantités de cytokines inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le GM-CSF et le TNF- $\alpha$  [58]. Les prostaglandines sont également d'importants médiateurs de l'inflammation. Les prostaglandines possédant une action pro-inflammatoire sont synthétisées par

la cyclooxygénase-2 (COX-2), qui est exprimée plus fortement chez les M1 que chez les M2 [58]. Les MØs M1 expriment également plus fortement l'enzyme iNOS, résultant en une production accrue de NO à partir de l'arginine, augmentant ainsi leur capacité à détruire les pathogènes [58]. La capacité des MØs M1 à orchestrer une réponse immunitaire efficace pour éliminer les pathogènes intracellulaires ou les cellules tumorales réside partiellement dans leur capacité à attirer et à activer les lymphocytes Th1. L'IFN- $\gamma$  induit la production des chimiokines CXCL9 et CXCL10 par les MØs. Ces dernières ont une action chimiotactique sur les lymphocytes Th1. De plus, l'expression du CMH de classe II est accrue chez les MØs M1, augmentant ainsi leur capacité à présenter l'antigène aux cellules T [58]. Le MØ M1 présente donc plusieurs caractéristiques du MØ capable de s'attaquer aux cellules tumorales tel que présenté au premier chapitre.

Les MØs M2 sont impliqués dans l'arrêt de la réponse inflammatoire et la réparation tissulaire subséquente aux dommages causés par l'inflammation. Les MØs sont polarisés vers un phénotype M2 en réponse à plusieurs facteurs anti-inflammatoires comme des hormones glucocorticoïdes ou les cytokines IL-4, IL-10 et IL-13 [58]. Les MØs M2 sont principalement caractérisés par une production accrue d'IL-10 et de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1. On observe également une production diminuée de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et le GM-CSF. La production de CCL22, une chimiokine possédant une action chimio-attractante sur les cellules Th2 et les cellules T régulatrices, s'ajoute aux mécanismes par lesquels les MØs M2 inhibent la réaction inflammatoire [58]. Par ailleurs, il a été rapporté que les cellules T mises en contact avec des MØs de type M2 sécrètent des niveaux élevés d'IL-4 [59]. Les MØs M2 sont également caractérisés par une expression diminuée de iNOS et une augmentation de l'expression de l'arginase [58]. Ceci implique que l'arginine serait métabolisée de façon à produire de l'urée et de l'ornithine plutôt que du NO. L'ornithine est un précurseur des polyamines et de la proline. Les polyamines sont impliquées dans la croissance et la division cellulaire alors que

la proline, sous forme d'hydroxyproline, est un acide aminé essentiel à la forme mature du collagène [60]. De plus, les MØs M2 produisent de grandes quantités de fibronectine et favorisent la synthèse de fibrinogène par les fibroblastes [61]. Ils expriment également les « *scavenger receptors* » A et B nécessaires pour phagocyter et éliminer les débris présents aux sites inflammatoires [58]. Grâce à différents mécanismes, les MØs M2 sont donc en mesure d'inhiber la réponse inflammatoire et de favoriser la réparation tissulaire subséquente.

### 2.3 Le recrutement et la polarisation des TAMs

Les TAMs sont pour la plupart recrutés à partir des monocytes présents dans la circulation sanguine, la prolifération *in situ* des cellules immunitaires étant peu importante au niveau des tumeurs [62]. Les TAMs sont attirés vers la tumeur suite à la production de plusieurs facteurs chimiotactiques produits dans l'environnement tumoral. Le *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 est la chimiokine la plus souvent retrouvée dans les tumeurs et sa surexpression dans l'environnement tumoral est associée avec une augmentation de l'infiltration de MØs et de la croissance tumorale [63-65]. Par exemple, la surexpression de MCP-1 par des fibrosarcomes murins entraîne une augmentation du nombre de TAMs qui conduit à une croissance tumorale accrue [64]. Plusieurs autres molécules dérivant des tumeurs et favorisant l'infiltration de MØs ont été identifiées : le MCP-2 (*macrophage chemotactic protein*), le MIP-1 $\alpha$  et le MIP-1 $\beta$  (*macrophage inflammatory protein*), RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*), le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), le PlGF (*placental growth factor*), le SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*) et le M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) (voir tableau 2.1)[66-73]. Tel que résumé dans le Tableau 1, les hauts niveaux d'expression de la plupart de ces facteurs sont associés à un mauvais pronostic [74, 75]. Il existe cependant quelques exceptions comme, par exemple, la thrombospondine-1 [74]. Bien que son action anti-tumorale soit généralement attribuée à ses propriétés angiostatiques, il semble que son influence sur la réponse

immunitaire anti-tumorale ne soit pas à négliger. En effet, lorsque cette glycoprotéine est produite en grande quantité dans l'environnement tumoral, elle favorise le recrutement et la polarisation des MØs en M1, via la liaison aux intégrines  $\alpha_6\beta_1$  exprimées par ces derniers [76].

Plusieurs observations portent à croire que les TAMs présentent un phénotype M2. Tout d'abord, les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- $\beta$  sont toutes deux produites autant par les cellules cancéreuses que par les TAMs [77]. Cela implique que l'environnement tumoral est en mesure de favoriser la polarisation des MØs vers un phénotype M2. Les TAMs expriment également de faibles niveaux de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  et sont caractérisés par une faible production de NO [77, 78]. L'activation du facteur de transcription NF- $\kappa\beta$  est nécessaire à l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires. Chez les TAMs, les facteurs pro-inflammatoires comme le LPS ou le TNF- $\alpha$  sont incapables d'induire l'expression de ces cytokines pro-inflammatoires qui sont normalement sous la régulation de NF- $\kappa\beta$  [78]. En somme, au niveau de la cytotoxicité et de l'expression de cytokines inflammatoires, les TAMs présentent des caractéristiques semblables aux MØs M2.

## 2.4 Rôle des TAMs dans l'angiogenèse

Dans les tumeurs, les TAMs s'accumulent principalement dans les zones pauvrement vascularisées et autour des vaisseaux sanguins [53, 79, 80]. Plusieurs études cliniques ont montré qu'une grande charge de TAMs dans ces zones favorisait une augmentation de la densité de la vascularisation et un mauvais pronostic [81-85]. En réponse à l'hypoxie et à d'autres signaux présents dans l'environnement tumoral, les TAMs expriment une grande variété de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, la thymidine phosphorylase et «*l'urokinase plasminogen activator*» [86-89]. L'expression de ces facteurs par les TAMs est également corrélée à un mauvais pronostic, mettant ainsi en

évidence le rôle pro-angiogénique des TAMs dans la progression tumorale. Les modèles de tumeurs chez la souris ont permis de démontrer l'importance des TAMs dans l'angiogenèse tumorale. Par exemple, lors d'un croisement entre des souris qui développent spontanément des tumeurs mammaires, les MMTV-PyMT, avec des souris qui n'expriment pas le M-CSF, ce dernier étant essentiel à la différenciation et à la survie des MØs, on observe non seulement une diminution de l'infiltration de TAMs au sein des tumeurs, mais également une réduction du développement de tumeurs ainsi qu'une diminution de métastases pulmonaires comparativement aux souris MMTV-PyMT de type sauvage qui expriment le M-CSF [71]. Conséquemment, une surexpression du M-CSF chez les souris MMTV-PyMT favorise la progression tumorale et l'infiltration des TAMs. Les auteurs ont démontré que les TAMs initiaient l'angiogenèse juste avant la transition des lésions pré-invasives en tumeurs malignes [90]. D'autres études ont également démontré que l'invasion de TAMs et la vascularisation au sein des tumeurs étaient diminuées lorsque l'expression du M-CSF ou de son récepteur était inhibée par des siRNA [91]. D'autres modèles de tumeurs murines ont montré que les TAMs infiltraient les lésions tumorales à un stade précoce et produisaient des facteurs pro-angiogéniques favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins [92]. Dans un modèle murin qui développe spontanément des carcinomes épithéliaux squameux chez les souris K14-HPV16, les TAMs produisent la métalloprotéase-9 (MMP-9), un enzyme qui est principalement impliqué dans la dégradation de la matrice extracellulaire et qui possède un potentiel pro-angiogénique [92]. Un croisement avec des souris déficientes en MMP-9 résulte en une diminution de l'angiogenèse et provoque un retard dans le développement de carcinomes invasifs [92]. Cependant, une transplantation de moelle osseuse provenant de souris K14-HPV16 de type sauvage rétablit la progression tumorale au niveau du contrôle de type sauvage [92]. Les TAMs et les neutrophiles ont également été identifiés comme la source principale de MMP-9, de VEGF et de quelques autres facteurs pro-angiogéniques dans un modèle de cancer pancréatique [93, 94]. De

nombreuses études s'accordent donc sur le fait que les TAMs favorisent l'angiogénèse au sein des tumeurs et participent ainsi à la progression tumorale.

## 2.5 Rôle des TAMs dans l'invasion et la formation de métastases

De nombreuses publications soulignent l'importance de l'implication des TAMs dans le processus métastatique des tumeurs localisées. Pour plusieurs types de tumeurs, un niveau élevé de TAMs est associé à la formation de métastases, autant au niveau des nodules lymphatiques que dans des sites plus éloignés [51, 53]. Les modèles murins ont été en mesure de confirmer l'effet pro-métastatique des TAMs. Il y a plus de 20 ans, Gorelik et al. ont observé que la présence de MØs favorisait la formation de tumeurs pulmonaires suite à l'injection de cellules tumorales de souris [95]. Comme mentionné plus tôt, les TAMs favorisent la formation de métastases pulmonaires chez la souris MMTV-PyMT [71]. Des études subséquentes sur le même modèle ont ensuite montré que l'inhibition de l'infiltration de MØs par des anticorps neutralisants, dirigés contre des facteurs chimioattractants des monocytes, diminue la formation de métastases [96]. D'autres équipes de recherche ont démontré que la présence de MØs aux sites métastatiques favorise l'établissement de tumeurs secondaires [97, 98].

Plusieurs expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* indiquent que la migration des cellules tumorales vers la circulation sanguine ou lymphatique nécessite leur interaction avec les TAMs. Il a été rapporté que la sécrétion de facteur de croissance épidermal (EGF) par les TAMs et la sécrétion de M-CSF par les cellules tumorales formaient une boucle d'amplification stimulant la migration autant des cellules tumorales que des TAMs [99, 100]. Des études réalisées *in vivo* ont par la suite montré que les métastases se forment plus souvent lorsque l'on observe une co-localisation des cellules tumorales et des TAMs [101]. Une autre molécule importante produite par les MØs et qui favorise l'invasion des cellules tumorales est le TNF- $\alpha$ . Malgré le fait que ce dernier



possède un certain potentiel anti-tumoral en raison de son action cytotoxique, il a été rapporté qu'il pouvait favoriser l'invasion de cellules de cancer du sein et de cancer ovarien en induisant la production de MMP-2 et de MMP-9 [102, 103]. La production de MMP-9 par les TAMs en réponse au VEGF a également été associée à la formation de métastases dans un modèle de cancer du poumon [104]. Il a aussi été démontré que l'expression de MMP-7 par les TAMs est augmentée dans les régions hypoxiques des tumeurs [105]. La présence de MMP-7 peut favoriser la motilité et l'invasion des cellules cancéreuses de manière indirecte. En effet, MMP-7 convertit une protéine appelée l'activateur du récepteur de NF- $\kappa$ B (RANKL, *Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand*) dans sa forme active. En conséquence, l'activation de NF- $\kappa$ B par RANKL favorise la formation de métastases [106]. Ainsi, l'expression de MMP-7 par les TAMs conduit à une augmentation de la présence de RANKL actif, favorisant la motilité des cellules cancéreuses et la formation de métastases [107].

## 2.6 Rôle des TAMs dans l'immunosuppression

Plusieurs données expérimentales suggèrent que les TAMs jouent un rôle immunosuppresseur. Sous l'influence de plusieurs facteurs dérivés de la tumeur, les TAMs perdent leur capacité à présenter les antigènes tumoraux et à stimuler les fonctions anti-tumorales des lymphocytes T et des cellules NK [58, 77, 108, 109]. La modulation de la réponse immunitaire anti-tumorale par les TAMs est médiée par l'expression de cytokines, de chimiokines et d'enzymes qui influencent les fonctions des cellules présentatrices d'antigènes et des lymphocytes B et T. La production d'IL-10 par les TAMs prévient la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-12, privant ainsi les lymphocytes T naïfs d'un facteur de différenciation essentiel pour induire la production de cytokines cytotoxiques comme l'IFN- $\gamma$  [78]. L'IL-10 produite par les TAMs peut aussi prévenir la maturation des cellules dendritiques anti-tumorales puisque de l'IL-10 ajoutée aux monocytes en culture inhibe leur différenciation en cellules



dendritiques et favorisent leur différenciation en MØ [110]. Parmi les enzymes exprimés par les TAMs, l'arginase I est celui qui contribue le plus à l'immunosuppression en consommant l'acide aminé L-arginine présent dans l'environnement tumoral. L'absence de L-arginine entraîne une altération de l'expression du récepteur des cellules T (appelé TCR) et de sa capacité à induire une signalisation, entraînant une insensibilité des cellules T CD4+ et CD8+ à l'activation par des anticorps anti-CD3 ou par le PMA [111-116]. Une autre étude a montré qu'avant d'être rendues insensibles, les cellules T, de concert avec les cellules tumorales, peuvent également contribuer à l'activité immunosuppressive des MØs en activant et en recrutant préférentiellement des monocytes exprimant l'arginase I [117].

Il est important de noter que la plupart des études réalisées sur la régulation de la réponse immunitaire par les TAMs ont été menées chez la souris. Cependant, des études réalisées sur des MØs humains ont mis en évidence certains mécanismes spécifiques à l'espèce humaine. Par exemple, des MØs isolés de patientes atteintes du cancer des ovaires suppriment la réponse des cellules T, mais cet effet n'est pas médié par l'activité de l'arginase [118]. L'immunosuppression est plutôt médiée par l'expression de la protéine B7-H4 par les MØs en réponse à l'IL-10. Dans les tumeurs ovariennes humaines, l'augmentation de l'expression de la protéine B7-H4 par les MØs est associée à un plus grand nombre de cellules T régulatrices (Treg) et prédit négativement les chances de survie des patientes [119]. De plus, la co-culture de TAMs avec des cellules Treg augmente la sécrétion d'IL-10 et d'IL-6 par les TAMs, ce qui stimule l'expression de la protéine B7-H4 de manière autocrine [119]. Les MØs présents dans le fluide ascitique des ovaires expriment également du CCL22, une chimiokine possédant une action chimiotactique sur les cellules Treg [120]. En résumé, les TAMs recrutent préférentiellement au sein du micro environnement tumoral des cellules T dépourvues de fonctions anti-tumorales favorisant ainsi la tolérance de la tumeur par le système immunitaire.

**TABLEAU 2.1**  
**Facteurs présents dans l'environnement tumoral**

<b>Cytokine</b>	<b>Effet sur les cellules tumorales</b>	<b>Mécanisme</b>	<b>Effet sur les cellules immunitaires</b>	<b>Origine</b>	<b>Réf.</b>
bFGF	Augmentation de la densité des microvaisseaux; Chimioattractant pour les monocytes; Métastases; Croissance tumorale et invasion; Néoangiogénèse	Facteur de croissance tumoral	Recrutement des MØ	Cellules endothéliales, Cellules tumorales épithéliales, MØ, cellules T	[121]
CCL5 (RANTES)	Varie selon le modèle, Amélioration du taux de survie ou augmentation de la croissance tumorale	Recrutement de leucocytes	Infiltration de cellules T CD8+ et recrutement de monocytes	Cellules tumorales	[122, 123]
CCL22 (MDC)	Encourage la résistance à l'immunité et prédit une diminution du taux de survie	Attraction des cellules Treg	Recrutement des cellules Treg et inhibe l'infiltration de cellules T cytotoxiques	TAMs et cellules tumorales	[120]
CXCL9 (MIG)	Inhibe la croissance tumorale	Induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale, angiostatique	Recrutement des cellules T, des neutrophiles et des MØ	MØ	[124]

CXCL10 (IP-10)	Inhibe la croissance tumorale	Induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale, angiostatique	Recrutement des cellules T, des neutrophiles et des MØ	MØ	[124, 125]
GM-CSF	Favorise l'immunité anti-tumorale; Améliore l'efficacité des traitements immunologiques contre le cancer	Augmente la capacité des MØ et des cellules dendritiques à activer les cellules T CD8+	Stimule la prolifération et la différenciation des MØ et des cellules dendritiques	MØ, cellules T	[126]
IL-1 $\beta$	Augmentation de la densité des microvaisseaux, Chimioattractant pour les monocytes, favorise les métastases	Augmentation de la production de chimiokines	Maturation et mobilisation des cellules dendritiques tissulaires vers les nodules lymphatiques	MØ, cellules stromales, cellules tumorales	[127]
IL-4	Augmentation de la croissance tumorale, métastases	Favorise la réponse Th2, protège les cellules tumorales contre l'apoptose	Polarisation des cellules T CD4+ en Th2 et des MØ en M2	Cellules T, basophiles, mastocytes	[128]
IL-6	Stimulation de la croissance tumorale	Facteur de croissance tumoral	Inhibition de la différenciation et de la maturation des cellules dendritiques	Cellules tumorales, MØ	[129]

IL-8	Favorise l'invasion des cellules tumorales; Métastases; Angiogénèse	inconnu	Rétention des cellules dendritiques au sein de la tumeur	MØ et cellules tumorales	[130-132]
IL-10	Favorise la croissance tumorale	Inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale	Inhibe la maturation des cellules dendritiques, Induit un phénotype M2 chez les MØ	MØ et cellules tumorales	[78, 110]
IL-12	Diminue la densité des microvaisseaux; inhibe la croissance tumorale	Favorise la réponse immunitaire de type Th1	Activation des MØ et des cellules dendritiques	MØ et cellules dendritiques	[133, 134]
IL-13	Stimulation de la croissance tumorale; métastases	Augmente la résistance à l'apoptose, inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale	Inhibe la production de cytokines inflammatoires par les MØ, inhibe la réponse des cellules T cytotoxiques	Cellules T, cellules dendritiques, cellules NK	[135-137]
M-CSF	Favorise la survie et l'invasion des cellules tumorales	Recrutement et prolifération des TAMs	Inhibition de la différenciation et de la maturation des cellules dendritiques, Active la différenciation des monocytes en MØ	MØ, monocytes, fibroblastes, cellules tumorales	[71, 138, 139]
PDGF	Augmente la prolifération des cellules cancéreuses; angiogénèse	Facteur de croissance, induit la prolifération et la migration des cellules endothéliales	Recrutement de MØ	MØ, cellules endothéliales, cellules tumorales	[140, 141]

TGF- $\beta$	Favorise l'invasion des cellules cancéreuses et la formation de métastases	Induit une transition mésenchymale (les cellules épithéliales adoptent un phénotype fibroblastique invasif)	Inhibe la prolifération des cellules T et des cellules NK, Favorise l'infiltration des M $\emptyset$	M $\emptyset$ , Cellules tumorales	[142]
VEGF	Croissance tumorale, angiogénèse, métastase	Facteur de croissance pour les cellules endothéliales, fortement angiogénique	Chimioattractant pour les M $\emptyset$	M $\emptyset$ , cellules myéloïdes, cellules tumorales	[143, 144]
<b>Enzyme</b>					
ARG1	Augmentation de la prolifération et de la néovascularisation	Formation de polyamines, augmentation de la synthèse protéique	Altération de la fonction des cellules T cytotoxiques, inhibition de la prolifération des cellules T	Cellules myéloïdes, cellules tumorales	[145-147]
COX2	Favorise la croissance tumorale, la vascularisation et l'invasivité	Augmentation de la PGE2, induit la production de VEGF	Anergie des cellules T	M $\emptyset$ , Cellules tumorales	[148-150]

## CHAPITRE 3

### LE CANCER DE LA VESSIE

#### 3.1 Cancer de la vessie et TAMs

Le cancer de la vessie est l'un des plus importants cancer génito-urinaire et la troisième cause de décès chez les patients atteints de cancer génito-urinaire [151]. Plus de 90% des cancers de la vessie sont des carcinomes épithéliaux transitionnels, 5% sont des carcinomes des cellules squameuses et moins de 2% sont des adénocarcinomes. De tous les nouveaux cas de carcinomes transitionnels diagnostiqués, environ 70% sont superficiels. Cependant, de 50 à 70 % de ces tumeurs superficielles seront récurrentes une fois traitées et de 10 à 20% progresseront vers la couche musculaire augmentant le risque de développer un cancer invasif avec métastases [152]. Il est très difficile de prédire quelles tumeurs superficielles évolueront vers un cancer invasif. À cette fin, le décompte des TAMs infiltrants la tumeur pourrait s'avérer une méthode utile pour prédire l'évolution clinique des tumeurs de la vessie ou le pronostic. Une étude menée par Hanada *et al.* [51] a montré que la densité des TAMs est plus élevée dans les tumeurs invasives que dans les tumeurs superficielles et que les TAMs infiltraient les tumeurs invasives plus profondément que les tumeurs superficielles. De plus, ils ont mis en évidence une corrélation positive entre le décompte des TAMs et la densité de la vascularisation tumorale. Finalement, les patients avec un décompte élevé de TAMs présentent un pronostic défavorable. Ces observations mettent en évidence l'importance du rôle des MØs dans la progression du cancer de la vessie.

### 3.2 Traitement au bacille de Calmette-Guérin

Le cancer de la vessie est un modèle intéressant pour étudier l'influence des MØs sur la progression tumorale, non seulement parce qu'il a été démontré que les MØs sont impliqués dans la progression du cancer de la vessie [51], mais également parce qu'il existe un traitement immunologique très efficace pour traiter les patients atteints par ce type de cancer. En fait, le cancer de la vessie est le seul cancer pour lequel il existe un traitement immunologique bien établi. Il s'agit de la thérapie au bacille de Calmette-Guérin (BCG). Le traitement consiste à inoculer le BCG dans la vessie des patients, ce qui aura pour effet de stimuler le système immunitaire de façon à ce qu'il soit en mesure d'éliminer la tumeur. Le taux de réponse complète au traitement au BCG est de 70 à 75% et le taux de rémission à 5 ans est de 70% [153]. Le BCG provoque une inflammation locale de la paroi de la vessie et son effet thérapeutique dépend d'un système immunitaire fonctionnant normalement. La réponse immunitaire est médiée via la sécrétion de cytokines associée à la réponse Th1, notamment par l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12, mais aucune mémoire immunitaire anti-tumorale n'est détectée, ce qui suppose que la réponse implique principalement l'immunité innée [154]. Cependant, il a été démontré que les lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont tous deux nécessaires à l'élimination des tumeurs suite au traitement au BCG [154], ce qui suppose que la génération lymphocytes T réactifs contre des antigènes du BCG est important pour la réponse anti-tumorale.

### 3.3 Implication des MØs dans le traitement au BCG

Les MØs jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire induite par le BCG. En effet, la présence des MØs est essentielle pour induire la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes CD4+ et CD8+. Il a été démontré que les MØs et les cellules dendritiques produisent de l'IL-12 suite au contact avec le BCG. L'IL-12 ainsi produit est nécessaire pour induire l'activation subséquente des

cellules T CD8+ cytotoxiques et engendrer une réponse immunitaire efficace [155]. Cependant, malgré la capacité des MØs à initier la réaction immunitaire qui éliminera les tumeurs suite au traitement au BCG, l'infiltration importante de TAMs au sein de la tumeur avant le traitement est plutôt corrélée à un mauvais pronostic [156]. Comme mentionné précédemment, les MØs peuvent être polarisés en un phénotype pro-inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2). Lorsque stimulé par le BCG, le MØ adopte un phénotype M1 et sécrète des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-12 [157]. Dans bien des cas, il en résultera une réponse inflammatoire aiguë qui aboutira à l'élimination de la tumeur. Cependant, cette réponse ne semble pas pouvoir prendre place lorsque la tumeur est déjà fortement infiltrée par des MØs. Une étude menée par Takayama *et al.* a montré que l'infiltration de TAMs au sein de la masse tumorale était associée à un taux de récurrence accru suite au traitement avec le BCG et à un mauvais pronostic [156]. Ces observations sont conséquentes avec l'hypothèse selon laquelle les TAMs sont des MØs M2. La présence de nombreux TAMs créerait donc un environnement immunosuppresseur empêchant une réponse immunitaire efficace de s'installer, protégeant ainsi la tumeur du traitement au BCG.



## CHAPITRE 4

### PROJET DE RECHERCHE

#### 4.1 Problématique et hypothèses

On sait maintenant que les TAMs jouent un rôle important dans la progression du cancer de la vessie et que leur présence en grand nombre au sein de l'environnement tumoral est associé à un mauvais pronostic [51]. À la lumière de plusieurs études qui démontrent que les TAMs possèdent une action immunosuppressive et pro-angiogénique, il est généralement admis qu'ils présentent une polarisation de type M2 [58, 77, 83, 105, 106]. Les MØs de type M1, quant à eux, sont considérés comme étant anti-tumoraux puisqu'ils sont capables de s'attaquer aux cellules tumorales [36]. Cependant, de nombreux facteurs pro-inflammatoires produits par les MØs M1, comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , sont connus pour être surexprimés dans plusieurs cancers et pour favoriser la progression tumorale [102, 103, 127]. Bien qu'il soit bien connu que les MØs sont impliqués dans la progression du cancer de la vessie, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée concernant l'influence des MØs polarisés sur le comportement des cellules du cancer de la vessie. Nous proposons donc que les MØs polarisés en phénotype M2 peuvent influencer le comportement des cellules tumorales de la vessie de façon à favoriser la progression tumorale. De plus, nous suggérons que certains facteurs solubles produits par les MØs M1 sont en mesure de favoriser la progression tumorale. Comme la progression tumorale comprend la croissance tumorale et la capacité invasive des cellules cancéreuses leur permettant de former des métastases, nous étudierons l'effet des MØs polarisés sur la prolifération et l'invasivité de cellules de cancer de la vessie.

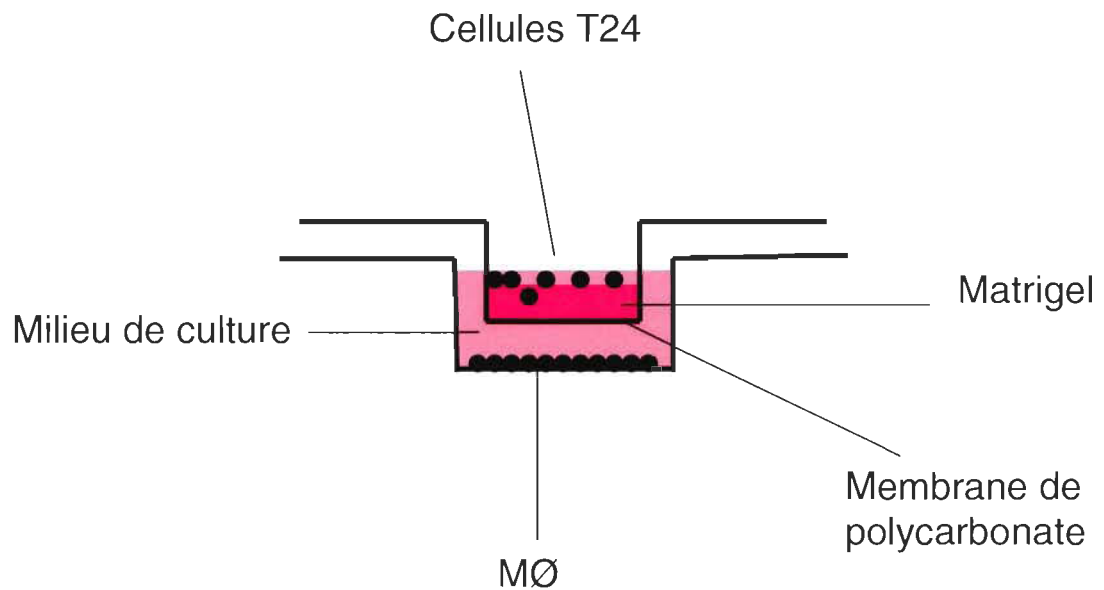
## 4.2 Objectifs et méthodologie

### Objectifs :

1. Induire et caractériser la polarisation des MØs en M1 et M2
2. Déterminer l'influence des MØs M1 et M2 sur la prolifération des cellules T24
3. Déterminer l'influence des MØs M1 et M2 sur l'invasion des cellules T24
4. Identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la prolifération et de l'invasion des cellules T24 par les MØs M1 et M2

Pour réaliser ces objectifs, nous avons d'abord isolé des monocytes sanguins par centrifugation sur Ficoll suivi d'une adhésion en plaque [158]. Les monocytes ainsi isolés ont été différenciés en MØs par une stimulation avec le M-CSF [159]. Les MØs ont ensuite été polarisés en phénotypes M1 et M2 en les stimulant avec de l'IFN- $\gamma$  et du LPS (M1) ou avec de l'IL-4 et de l'IL-10 (M2) [58]. La caractérisation des MØs polarisés a été effectuée par RT-PCR et par cytométrie de flux. Les cellules T24 ont été utilisées comme modèle de cellules cancéreuses de la vessie. Cette lignée provient d'un carcinome épithélial transitionnel superficiel de la vessie. Il s'agit d'un modèle idéal puisqu'il représente la grande majorité des cancers de la vessie et comme un cancer de ce stade n'est pas invasif, il est possible de déterminer si les MØs sont en mesure de le rendre invasif. Les MØs et les facteurs solubles qu'ils sécrètent ont été utilisés pour stimuler les cellules T24 afin d'évaluer leurs effets sur la prolifération et l'invasion des cellules T24. Pour évaluer l'effet des MØs polarisés sur la prolifération des cellules T24, nous avons utilisé le test au sel de tétrazolium (MTT). La molécule de MTT est réduite par la succinate déshydrogénase mitochondriale en formazan, ce dernier formant un précipité violet. La quantité de précipité formé étant proportionnel au nombre de cellules vivantes. L'induction de l'apoptose a été évaluée par la détection de la caspase-3 clivée par immunobuvardage de type Western. La capacité invasive

des cellules T24 a été évaluée avec un test d'invasion à travers une matrice extracellulaire artificielle (Figure 4.1). L'évaluation de l'activité des voies de signalisation a été réalisée par la détection des protéines de signalisation phosphorylées à l'aide d'un anticorps spécifique par immunobuvardage de type Western. Toutes ces méthodes sont expliquées en détail dans l'article scientifique qui suit.



**Figure 4.1 : Test d'invasion.** Le test d'invasion consiste à déposer les cellules T24 sur une matrice extracellulaire artificielle (Matrigel) qui elle-même repose sur une membrane de polycarbonate perméable aux facteurs solubles. Le puits contenant les cellules T24 et le matrigel est inséré dans un puits contenant les MØs, permettant ainsi aux facteurs solubles produits par les MØs de diffuser à travers la membrane de polycarbonate de façon à influencer la capacité invasive des cellules T24. L'invasivité des cellules T24 est mesurée en comptant les cellules qui sont parvenues à migrer à travers le matrigel jusqu'à la membrane.

## CHAPITRE 5

### CORPS DU TRAVAIL

#### 5.1 Résumé de l'article

**Contexte :** Les macrophages (MØs) associés aux tumeurs (TAMS) sont potentiellement impliqués dans la croissance tumorale, la formation de métastases et la suppression de la réponse anti-tumorale dans plusieurs types de cancers. Les MØs constituent une partie importante des cellules stromales infiltrant les cancers de la vessie. Cependant, la contribution des TAMs dans la régulation de la survie et de l'invasion des cellules tumorales vésicales et les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas encore complètement élucidés.

**Méthodes :** Des MØs issus de monocytes sanguins humains ont été polarisés en phénotypes M1 ou M2. Les milieux conditionnés et les cellules ont été utilisés pour étudier les interactions paracrines et le contact cellule-cellule avec les cellules de cancer de la vessie T24. La viabilité des cellules a été analysée par test MTT et par analyse microscopique. L'expression génique a été analysée par RT-PCR. La signalisation cellulaire et le clivage de la caspase-3 ont été analysés par immunobuvardage Western. L'invasion cellulaire a été évaluée en mesurant la migration des cellules à travers une matrice cellulaire artificielle.

**Résultats :** L'expression de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  est induite chez les MØs M1 alors que l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est induite chez les MØs M2. L'étude des contacts cellules-cellules a montré que le nombre de cellules viables augmentait dans les cocultures T24/M2 et diminuait dans les cocultures T24/M2 par rapport aux T24 seules.

Les facteurs solubles produits par les M1 inhibent la croissance des T24 mais n'induisent pas d'apoptose caspase-3-dépendante. Les facteurs solubles produits par les M2 ont la capacité de supprimer l'effet inhibiteur des facteurs solubles des M1 sur la croissance des T24. La présence d'IL-10 exogène renverse l'effet inhibiteur sur la croissance dans les cocultures T24/M1. Des analyses plus poussées ont révélé que les facteurs solubles produits par les M1 induisent la transcription du gène du TNF- $\alpha$ , favorisent l'invasion cellulaire et augmentent l'activité de la voie de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI 3-k)/Akt chez les cellules T24. L'inhibition de la voie PI 3-k/Akt ou le blocage du récepteur du TNF- $\alpha$  chez les T24 diminue l'invasivité cellulaire mais n'affecte pas la prolifération ou la viabilité des cellules tumorales. Les facteurs solubles produits par les M2 envoient des signaux de survie/prolifération aux cellules T24 et ces signaux dépendent des voies de signalisation PI 3-k/Akt et p38 MAP kinase.

**Conclusion :** Nos résultats suggèrent que les MØs polarisés peuvent réguler la croissance et l'invasion des cellules tumorales de la vessie.

## 5.2 Article scientifique

### **Macrophages of M1 and M2 subtypes differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma cells**

Mathieu Dufresne<sup>1</sup>, Geneviève Dumas<sup>1</sup>, Christian Carrier<sup>2</sup>, Marc Pouliot<sup>3</sup>, Éric Asselin<sup>1</sup>, and Carlos Reyes-Moreno<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Research Group in Molecular Oncology and Endocrinology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières (PQ), Canada, G9A 5H7

<sup>2</sup>Haemato-oncologic Service, Centre Hospitalier Régional de Trois-Rivières, Trois-Rivières (PQ), Canada, G8Z 3R9

<sup>3</sup>Research Center of Rheumatology and Immunology, Université Laval, Québec City (PQ), Canada, G1V 4G2.

\*Corresponding author:

Carlos Reyes-Moreno, Ph.D.

Professor of department of Chemistry and Biology

Université du Québec à Trois-Rivières

3351 boul. des Forges, C.P. 500

Trois-Rivières, Canada, G9A 5H7

Tel: (819) 376-5011 Ext.: 3308; Fax: (819) 376-5084.

E-mail:

CRM - [carlos.reyes-moreno@uqtr.ca](mailto:carlos.reyes-moreno@uqtr.ca)

MD - [mathieu.dufresne1@uqtr.ca](mailto:mathieu.dufresne1@uqtr.ca)

GD - [genevieve.dumas@uqtr.ca](mailto:genevieve.dumas@uqtr.ca)

CC - [christian.carrier@chrtr.ca](mailto:christian.carrier@chrtr.ca)

MP - [marc.pouliot@crchul.ulaval.ca](mailto:marc.pouliot@crchul.ulaval.ca)

EA - [eric.asselin@uqtr.ca](mailto:eric.asselin@uqtr.ca)

## Abstract

**Background:** Intratumoral macrophages are potentially involved in tumor growth, metastasis, and suppression of anti-tumoral immune responses in several types of cancer diseases. Macrophages constitute a major inflammatory component of the stroma of human bladder carcinoma. However, the relative contribution of infiltrating macrophages in the regulation of bladder tumor cell survival and invasion and the molecular mechanisms concerned are yet to be completely elucidated.

**Methods:** Monocyte-derived macrophages were polarized into M1 or M2 subtypes and conditioned media and cells were used to study cell-to-cell and paracrine interactions with bladder carcinoma T24 cells. Cell viability was analyzed via MTT cytotoxicity assays and microscopy analysis. Gene expression was assessed by RT-PCR. Cell signaling and caspase-3 cleavage was monitored via western blot analysis. Transwell assays were performed to evaluate cell invasion.

**Results:** Gene expression of the pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$  is preferentially induced in M1 cells, whereas gene expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 is preferentially induced in M2 cells. Cell-to-cell studies indicated that the number of viable cells were considerable higher in T24 cell/M2 cell cocultures but lower in T24 cell/M1 cell cocultures when compared to cultures of T24 cells alone. M1-derived factors inhibit T24 cell growth but fail to induce caspase-3-mediated apoptosis. M2-derived factors, in contrast, have the ability to suppress the inhibitory effect of M1-derived factors on T24 cell growth. Exogenous IL-10 reverse M1 cell-mediated arrest growth in T24 cell/M1 cell cocultures. Further analysis shows that M1- but not M2-derived factors induce the gene transcription of TNF $\alpha$ , promote cellular invasiveness and increase phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K)/Akt signaling pathway activity in T24 cells. Inhibition of PI 3-K activation in tumor cells or blockade of TNF $\alpha$  receptor in tumor cells and M1 cells decreases cellular invasiveness but does not affect tumor cell proliferation or viability. M2-derived factors provide

survival/proliferation signals to T24 cells, in a p38 MAP kinase- and PI 3-K/Akt-dependent manner.

**Conclusion:** Altogether, our results strongly suggest that polarized MØs can regulate bladder tumor cell survival and invasion, and support the idea that tumor-stroma interactions can influence the progression of superficial bladder cancer to more aggressive tumors *in vivo*.

## Background

The micro-environment of a solid tumor is not only composed of tumor cells; rather, it also comprises a range of stromal cells including fibroblasts and inflammatory cells. An important inflammatory cell type commonly found at the stroma-tumor interface is macrophages (MØs), which are referred as tumor-associated macrophages (TAMs) [160]. Activated MØs can be classified into either M1 or M2 subtypes, according to the Th1/Th2 dichotomy of polarized immune responses [58, 161]. Classically activated M1 cells, which are essentially pro-inflammatory, are generated in response to IFN- $\gamma$  and the microbial agent LPS and trigger the release of high levels of interleukin (IL)-12 but not IL-10 [160, 161]. M1 cells are thought to play a key role in the phagocytic killing of microbes and the initiation of humoral and anti-tumoral immunity [58]. M1 cells also have the intrinsic ability to kill tumor cells by the release of various agents such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Type II cytokines such as IL-4, IL-10 and IL-13 induce an alternative activation program in MØs [108, 160], resulting in the M2 cell subpopulation. M2 cells produce higher levels of anti-inflammatory factors such as IL-10 but release less IL-12 and TNF- $\alpha$ . They are thought to play a primary role in the resolution of inflammation and the coordination of tissue repair after acute inflammatory reaction.

Polarized MØs are characterized by their plasticity [162, 163], and as observed in the development of cancer and chronic inflammatory diseases [75, 164], their normal function could be subverted under the influence of environmental activating factors. TAMs have thus been shown to display an ambivalent role in the regulation of tumor growth and metastasis [36, 75]. The



presence of TAMs is associated with poor prognosis in patients with bladder, kidney, prostate, breast, and endometrial cancers [75]. In these cancer diseases, TAMs are believed to adopt an M2-like phenotype, which is oriented towards suppressing adaptive immunity and promoting tumour growth, invasion, angiogenesis, and metastasis [58, 160, 164, 165]. Exceptionally, in patients with stomach and colon cancer, it is reported that TAM infiltration is associated with a good prognosis suggesting that they may exhibit a M1 phenotype in such cancer diseases [75].

Transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder is one of the most common malignancies affecting the genitourinary tract and the third leading cause of death among people with genitourinary tumors [151]. Most bladder cancers occur within the transitional epithelial layer of the bladder (urothelium), which tend to recur but are generally not life threatening. However, more aggressive tumors can also develop: bladder carcinoma in situ (CIS) is associated with a high risk of death from distant metastases [151]. In selected patients with superficial TCC, the risk of local recurrence is reduced by  $\approx 60\%$  with intravesical applications of the immunomodulator Bacillus Calmette-Guerin (BCG), and can lead to 5-year survival rates of  $\approx 90\%$  in cancer patients with unifocal disease [153]. Despite this elevated response rate, as many as 20% of patients will ultimately die of metastatic disease, and a significant proportion will develop both intravesical and extravesical recurrences [166]. The progression of human bladder TCC and the response to BCG immunotherapy is highly influenced by the host immune response [167], the balance of Th1/Th2 cytokines [168] and the host inflammatory cells that infiltrate the tumor microenvironment [169]. An early study by Hanada et al. reported that increased MØ infiltration in human bladder TCC is associated with the presence of tumors with high survival and invasive capacities [51]. Recent clinical data indicates that patients with a high level of infiltration of bladder tumors by TAMs are less responsive to BCG immunotherapy [169], and that increased infiltration of CIS of the bladder with TAMs after intravesical BCG therapy is associated with a poor prognosis [156]. From these observations, it appears that the level of bladder

tumor infiltration by TAMs prior to and after BCG treatment might have a major impact on the outcome of such immunological therapy. However, despite the potential involvement of TAMs in tumor progression and metastasis in several types of cancer diseases, the influence of infiltrating MØs in bladder tumor cell survival and invasiveness remains elusive.

In this study, we found that M1 and M2 cells differentially regulate different aspects of bladder tumor cell biology. M1 cells decrease cell proliferation, increase cellular invasiveness, enhance gene expression of pro-inflammatory factors and activate pro-inflammatory and pro-survival signaling pathways. In contrast, M2 cells increase tumor cell growth and survival and can protect bladder tumor cells against the cytotoxic effect of M1 cells. Based on these observations, we suggest that similar functional interactions between tumor cells and MØs can take place *in vivo* and influence cell survival and invasion during bladder tumor progression.

## **Methods**

### ***Materials***

All cell culture media, serum and cell culture reagents were from Wisent. The cytokines macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), interleukin (IL)-4, IL-10 and interferon (IFN)- $\gamma$  were purchased from Peprotech. The neutralizing anti-TNF-R1 Abs, the primary monoclonal Abs anti-CD14 and anti-CD16 and the irrelevant IgG1 Abs were from R&D Systems. Human IgG and goat anti-mouse FITC-conjugated IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories. The rabbit monoclonal Abs directed against Akt, phospho-Akt, p38, and phospho-p38 were purchased from Cell Signaling. The HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG were from Bio-Rad Laboratories. The PI 3-K inhibitor LY294002 and the p38 MAP kinase inhibitor SB203580 were from Calbiochem. Lipopolysaccharide (LPS), methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reagent and all electrophoresis grade chemicals were from Sigma Chemical Company. Trizol reagent and PCR primers were from Invitrogen. Taq DNA polymerase and M-MLV reverse transcriptase were from New England Biolabs.

***Monocytes extraction and differentiation to macrophages.***

Human blood donations were from the haemato-oncologic service of the Centre Hospitalier Régional de Trois-Rivières (CHRTR, Trois-Rivières, PQ, Canada). Monocyte cells were isolated as previously described [158]. Briefly, adherent mononuclear cells were recovered using Lymphocyte Separation Medium (Ficoll) and cultured for 5 days to induce MØ differentiation in the presence of 10 ng/ml M-CSF. At day one, the purity of monocyte-derived MØs was approximately 96% as assessed by the detection of CD14 by flow cytometry as described [158].

***Preparation of polarized MØs and conditioned media.***

Five days M-CSF-induced MØs were gently washed and cultured in serum-free culture media in the absence of cytokines to obtain control MØs (MO cells). M1-polarization of MØs (M1 cells) was induced with 100 ng/ml LPS and 25 U/ml IFN- $\gamma$ . To induce M2-polarization (M2 cells), cells were cultured in serum-free culture media supplemented with 20 ng/ml IL-4 and 20 ng/ml IL-10. To validate M1 and M2 polarization, cells were collected after a 6-h stimulation period to evaluate specific gene expression by RT-PCR analysis [158] and after a 48-h stimulation period to evaluate the expression level of specific cell-surface antigens by flow cytometry analysis [158, 170]. Cell-free conditioned media (CM) were collected from 2-days MØ cultures. To obtain control media, fresh serum-free RPMI-1640 was placed in the cell incubator for 2 days. CM and control media were kept at -80 °C until use.

***Visualisation of T24 cells cocultured with polarized MØs.***

Human bladder transitional cell carcinoma T24 cells (ATCC number HTB-4) were cultured in RPMI-1640 supplement with 10% FBS, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM pyruvate, and 50 mg/L gentamycin (referred as 10% FBS RPMI-1640). Cocultures were performed in 96-well plates by incubating  $5 \times 10^3$  T24 cells with  $15 \times 10^3$  or  $30 \times 10^3$  polarized MØs in 100  $\mu$ l of culture media for different periods of time at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. At the end of the incubation period,

the relative number of viable cells was determined by the MTT cell viability and proliferation assay as described below. To visualize T24 cell/MØ interactions, the cultured cells were washed, fixed with methanol for 5 min, washed again and stained for 30 min with 2 µg/ml Hoechst 33258 dye solution. The DNA stained with Hoechst 33258 has a blue color under the inverted fluorescence microscope, while the cytoplasm become especially visible when picture are taken up directly in the cell culture polystyrene plates. By this way, both cell types are easily recognizable. The black background of pictures was inverted to better visualize cell morphology details.

#### ***MTT cell viability and proliferation assay.***

T24 cells ( $5 \times 10^3$  cells/well) were plated in 96-well plates in 100 µl 10% FBS RPMI-1640 and cultured for 24h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were then co-incubated with polarized MØs or stimulated with conditioned media from M1 or M2 cells, or with control media. At the end of the culture period, 10 µl of 5 mg/ml methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) solution was added to each well. After a 3 to 4-h incubation period with MTT reagent, 100 µl of MTT solubilization buffer was added (10% SDS in 10 mM HCl) and plates were placed overnight in the cell incubator before absorbance measure. The optical density was read at 580 nm using the Microplate Reader Manager (Bio-Rad).

#### ***RNA isolation and RT-PCR analysis.***

Total RNA was extracted by homogenization in Trizol reagent as indicated by the manufacturer's instructions (Invitrogen). Preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT) and polymerase chain reaction (PCR) were performed using standard methods in a Thermal Cycler Automation apparatus (Bio-Rad). The sequences of PCR primers are shown in Table 1. To quantify the abundance of IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, GM-CSF, TNF-α, MCP-1 and CCL22 mRNA, primers were tested with different cycles to avoid mRNA amplification close to plateau and saturation. The PCR reaction conditions were chosen when

amplification of mRNA was in the middle of the exponential amplification phase. GAPDH mRNA expression was used as internal standard.

### ***Microinvasion assay.***

Invasion was measured by assessment of T24 cell migration rate through an artificial basement membrane in a modified Boyden chamber (HTS Transwell System; Corning). The membrane consisted of a polycarbonate filter with 0.4  $\mu\text{m}$  pores diameter and was coated on ice with Matrigel (BD Biosciences) diluted 1:2 (v/v) in serum-free culture media. T24 cells ( $50 \times 10^3$  cells) were seeded into the Matrigel coat in the upper well of the chamber, while polarized MØs ( $50 \times 10^3$  cells) were seeded in the lower well. To assess the effects of soluble factors from M1 or M2 cells on T24 cell invasiveness, the lower wells were replenished with either M1-CM or with M2-CM. Cells that migrated down to the polycarbonate filter were stained with Hoescht 33258 dye after a 48-h incubation period, visualized by fluorescence microscopy and counted.

### ***Immunodetection of cell signalling molecules.***

T24 cells were plated at a cell density of  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates and left to adhere for 24h. Cells were then washed and incubated in CM at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After a 15-min stimulation period, the reactions were stopped by adding pre-heated 2x SDS solubilisation buffer containing 10% 2-mercaptoethanol, protease inhibitors (Roche Applied Science) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Protein samples were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a PVDF membrane (Millipore Corporation). Akt, Phospho-Akt p38, and phospho-p38 molecules were probed respectively with anti-Akt (1:2000), anti-phospho-Akt (Ser473; 1:1000), p38 (1:2000) and anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182; 1:1000) overnight at 4°C. Blots were then incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (1:3000) for 1h at room temperature. Probed molecules were visualized using an enhancement chemiluminescence detection kit (Pierce).

**Statistical Analysis.**

Values were presented as mean  $\pm$  SD from at least three independent experiments. Data were subjected to one- or two-way ANOVA (PRISM software version 2.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey test. P values of  $\leq 0.05$  were considered to indicate statistical significance.

**Results****Validation of macrophage polarization.**

To visualize cell morphology of polarized MØs, living cultured cells were imaged using a phase contrast microscope. As shown in Figure 5.1A, M0 cells are small and round with small cytoplasm and short pseudopodes. In contrast, M1 cells adopt an elongated spindle shape and M2 cells are large with triangular shape, abundant cytoplasm and enlarged extensions. As expected [58, 160, 161], M1 cells but not M2 cells show increased expression of the LPS receptor CD14 (Fig. 5.1B). To further confirm functional polarization of MØs, we have measured gene expression of specific pro- and anti-inflammatory cytokines associated with M1 and M2 profiles [58]. We found that gene expression of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-12 and GM-CSF is preferentially induced in M1 cells, whereas gene expression of anti-inflammatory cytokines IL-10, MCP-1 and CCL22 is preferentially induced in M2 cells (Fig. 5.1C). Overall, gene expression pattern of cytokines and CD14 expression of polarized MØs we have obtained *in vitro* are in accordance with the expected pro-inflammatory and anti-inflammatory phenotypes of M1 and M2 cells, respectively [108, 160, 161].

**Cell viability in T24 cancer cells/MØs cocultures.**

In order to investigate the respective function of polarized MØs in bladder tumor cell survival, we have developed an *in vitro* model of cell-to-cell interactions between tumour cells and MØs. In this model, T24 cells were directly cocultured with polarized MDM at a tumor cell:MDM ratio of 1:3 and of 1:6, and for different periods of time to establish the kinetic growth of cocultured

cells. As evidenced by the images obtained by inverted fluorescence microscopy, T24 cells adopt an elongated shape with small cytoplasm when cultured in the presence of M1 cells. When cocultured with M2 cells, however, T24 cells retain their enlarged form with abundant cytoplasm (Fig. 5.2A). In direct cell-to-cell interaction with T24 cells, the characteristic morphology of M1 and M2 cells are modified and produce a more homogenous MDM cell population with a round shape and abundant cytoplasm (Fig. 5.2A). We have established that polarized M1 and M2 cells do not proliferate and that they remain viable for at least 5 days when cultured alone in serum-free culture media (data not shown). We next examined by MTT assays the changes in the relative number of viable cells in T24 cell cultures alone or in T24 cells cocultured with polarized M1 and M2 cells. As can be seen in Figure 2B, the rates of increase are considerable higher in cell cultures of T24 cells with either M2 cells at 1:3 cell ratio (closed triangle; relative viability =  $0,11t + 0,46$ ;  $R^2 = 0,98$ ) or M2 cells at 1:6 cell ratio (closed square; relative viability =  $0,11t + 0,50$ ;  $R^2 = 0,97$ ) compared with T24 cell alone (closed circle; relative viability =  $0,09t + 0,37$ ;  $R^2 = 0,99$ ). In contrast to cultures with M2 cells, striking rates of decrease in the number of viable cells was observed when T24 cells were cultured in the presence of M1 cells at a cell ratio of 1:3 (open triangle; relative viability =  $-0,03t + 0,55$ ;  $R^2 = 0,99$ ) and of 1:6 (open square; relative viability =  $-0,06t + 0,58$ ;  $R^2 = 0,98$ ).

***Soluble factors from M1 and M2 cells differentially affect T24 cancer cell viability.***

The effects of soluble factors from M1 and M2 cells on T24 cell proliferation/viability were determined by treating T24 cells for 48h with various concentrations (v/v) of conditioned media (CM) from M1 or M2 cells (M1-CM and M2-CM, respectively), diluted in serum-free culture medium (Fig. 5.3A). As assessed by MTT assays, M1-CM inhibits while M2-CM stimulates T24 cell proliferation and viability. The maximal inhibitory effect on T24 cell viability was observed with 100% M1-CM ( $65\% \pm 4\%$  viable cells) and decreased

progressively when diluted at 75%, 50% and 25%; when diluted at 10%, M1-CM no longer decreased cell viability ( $95\% \pm 7\%$  viable cells). When T24 cells were cultured in 100% M2-CM, a modest but significant stimulatory effect on cell proliferation was observed ( $113\% \pm 4\%$  viable cells). This stimulatory effect was also observed when M2-CM was diluted at 75% and 50% but it was undetected in 10% M2-CM dilution ( $102\% \pm 5\%$  viable cells). Since maximal effects were observed using 100% CM from both M1 and M2 cells, undiluted CM were used for subsequent studies, and referred as M1-CM or M2-CM, respectively.

***M1-derived factors inhibit T24 cancer cell growth but do not affect cell viability.***

Pro-inflammatory M1 cells produce soluble factors known to be lethal to normal and cancerous tissues [165]. The cytotoxic effects of activated M1 cells are associated with apoptosis and killing of susceptible tumor cells [36]. As can be seen in Figure 3B, immunodetection of cleaved caspase-3, an apoptosis marker, revealed that T24 cells are insensitive to the apoptotic effects of M1-CM. Nuclear staining with Hoescht 33258 dye was used to assess the features of apoptotic cells after T24 cells were cultured for 48h with control medium, M1-CM and M2-CM. Density of T24 cells cultured with M1-CM is reduced compared to control treatment, but the cells retain the enlarged morphology with abundant cytoplasm (Fig. 5.3C). However, no apoptotic bodies were detected by this procedure when T24 cells were incubated with either M1-CM or M2-CM (Fig. 5.3C). Similar results were obtained after short exposure (6 and 24h) of T24 cells to M1-CM (data not shown).

***M2-derived factors reverse M1 cell-mediated arrest of T24 cancer cell growth.***

To investigate the immunosuppressive phenotype of M2 cells, we test the influence of M2-derived factors and IL-10 on the inhibition of cytotoxic effects of M1-derived factors in tumor cells. To this end, T24 cells were cultured with complete 100% M1-CM in the absence and the presence of exogenous IL-10,



with either M1-CM and M2-CM (both 50% diluted in serum-free culture media), and with a mixture of M1-CM and M2-CM. MTT viability assays were performed after a 48-h incubation period. As shown in Figure 5.4, addition of IL-10 to T24 cell cultures treated with M1-CM does not reverse the inhibitory effect of M1-derived factors on T24 cell viability. However, stimulation of T24 cells with an equal volume of M1-CM and M2-CM revealed that, together, M2-derived factors have the ability to reverse the inhibitory effect of M1-derived factors on T24 cell survival (Fig. 5.4).

***IL-10 modulates M1 cell-mediated arrest of T24 cancer cell growth.***

The cytokine IL-10, which was primarily recognized as an effective deactivator of MØ pro-inflammatory cytokine synthesis [171, 172], is now considered as a key inducer of M2 polarization of TAMs [108, 160, 161] and a suppressor of the pro-inflammatory phenotype of tumor-infiltrating MØs [78]. To explore this possibility in our *in vitro* model, the cytotoxic activity of M1 cells was challenged during T24 cell/M1 cell interaction in the presence of IL-10. MTT viability assays were performed to assess the effects of exogenous IL-10 on cell viability in T24 cell cultures alone or in T24 cell/M1 cell cocultures. Consistent with the results presented above (Fig. 5.2B), the number of viable cells considerably decreased in cell cultures of T24 cells with M1 cells at 1:3 cell ratio and even more with M1 cells at 1:6 cell ratio (Fig. 5.5 A-B). In the absence of M1 cells, stimulation of T24 cells with exogenous IL-10 does not influence T24 cell viability, the number of viable cells being  $98\% \pm 6\%$  and  $96\% \pm 6\%$  of control at 10 ng/ml and 50 ng/ml IL-10, respectively (Fig. 5.5 A-B). Using T24 cell/M1 cell without IL-10 as control, the number of viable cells were evaluated at  $115\% \pm 5\%$  and  $138\% \pm 9\%$  of control when IL-10 at 10 ng/ml and 50 ng/ml was added to T24 cell/M1 cell cocultures at a cell ratio of 1:3 (Fig. 5.5B). This beneficial effect on cell viability was maintained even in the presence of an increasing number of M1 cells (cell ratio at 1:6), the number of viable cells being  $108\% \pm 7\%$  and  $129\% \pm 5\%$  of control when IL-10 was added to cocultures at 10 ng/ml and 50 ng/ml, respectively (Fig. 5.5B). IL-10 does not affect M1 cell viability

(data not shown) suggesting that the mechanism by which IL-10 positively regulate cell survival in T24 cell/M1 cell cocultures involves a deactivating process of M1 cells which in turn produce less cytotoxic factors for T24 cells.

***Soluble factors from M1 cells induce gene expression in T24 cancer cells.***

To further explore the functional phenotype of polarized MØs, we next investigated whether M1 and M2 cells have the ability to regulate gene transcription of pro- and anti-inflammatory cytokines in T24 cancer cells. After a 6-h stimulation period with either M1-CM or with M2-CM, the total RNA of T24 cells was extracted and processed for quantitative RT-PCR analysis. In response to soluble factors from pro-inflammatory M1 cells, gene expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, and MCP-1 was induced in T24 cells (Fig. 5.6A). Consistent with the anti-inflammatory role of M2 cells, the transcription level of most of these pro-inflammatory genes were down-regulated in T24 cells stimulated with M2-CM (Fig. 5.6A). Levels of IL-6 mRNA, however, were up-regulated when T24 cells were stimulated with M2-CM but to a lower extent compared to M1-CM (Fig. 5.6A). T24 cells do not produce basal levels of the anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta$ 1 and IL-10 mRNA and their expression was not induced by M1-CM or M2-CM (data not shown).

***T24 cancer cell invasion is enhanced in response to M1-derived factors.***

Several lines of evidence indicate that TAMs and inflammatory cytokines found in tumors are more likely to contribute to local tumor growth, invasion, and immunosuppression than they are to mount an effective host anti-tumor response [74]. In order to determine the role of polarized MØs on bladder cancer cell motility/invasion, T24 cells were seeded onto the top of the Matrigel matrix-coated filters and co-incubated with either M1 or M2 cells, which were placed in the lower chamber, under the filters (no direct cell-to-cell contact between tumor cells and macrophages; only soluble factors are exchanged between the two cell types). We found that the invasiveness of T24 cells was significantly increased when co-incubated with M1 cells, but not with M2 cells (Fig. 5.7B). The

amplitude of such effect was dependent on the number of M1 cells co-incubated with T24 cells ( $28 \pm 5$  invasive cells/field at 1:3 cell ratio vs  $49 \pm 13$  invasive cells/field at 1:6 cell ratio) and could be mimicked by soluble factors from M1 cells ( $33 \pm 12$  invasive cells/field with M1-CM).

***Promotion of T24 cancer cell invasion requires type 1 TNF- $\alpha$  receptor activation.***

Previous publications have reported that increased invasiveness of tumor cells cocultured with MØs is dependent on up-regulation of TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$ -induced release of matrix metalloproteases by MØs [102]. Because TNF- $\alpha$  is highly expressed by M1 cells (Fig. 5.1B) and is one of the most important tumor cell killing mediators of fully activated human MØs [36], we reasoned that TNF- $\alpha$  could be one of the M1-derived soluble factors that arrest T24 cell growth but increase cellular invasiveness. We have found that blockade of TNF-R1 in M1 cells and T24 cells reduced the ability of M1 cells to increase the invasiveness of T24 cells (Fig. 5.8A) but it did not affect the inhibitory effect of M1 cells on T24 cell growth (Fig. 5.8B). This indicates that TNF-R1 ligation by TNF- $\alpha$  is required to mediate T24 cell invasiveness, and that although T24 cells are resistant to TNF- $\alpha$  induced apoptosis they are sensitive to other cytotoxic/cytostatic factors released by M1 cells.

***T24 cancer cell invasion and viability involve distinct signalling pathways.***

Recently, it has been shown that invasive phenotype of a panel of bladder cancer cells, including T24 cells, is linked with enhanced activation of the PI 3-K/Akt cell signalling pathway [173]. Activation of this signaling pathway is also known to provide cells with a survival signal that allows them to withstand apoptotic stimuli [174]. We thus explored the possibility that T24 cells activate the PI 3-K/Akt survival signaling pathway in response to soluble factors from M1 cells. Western blot analysis demonstrated that phospho-Akt was rapidly induced within 15 min after treatment with both M1-CM and M2-CM (Fig. 5.8A), but decreased to basal levels after 30 min of stimulation (data not shown). Of note,

strong phosphorylation of Akt was induced with M1-CM (7.2 fold) when compared with M2-CM (3.5 fold) (Fig. 5.8A). Similar to previous studies [170], inhibition of the PI 3-K/Akt signalling pathway activation was performed using the chemical LY294002 at an optimal dose of 50  $\mu$ M. MTT proliferation and viability assay shown that T24 cell pre-treatment with this PI 3-K/Akt signalling pathway antagonist does not affect the inhibitory effect of M1-CM but reduces the stimulatory effects of M2-CM on T24 cell proliferation (Fig. 5.8B). Micro-invasion assays (Fig. 5.8C) indicated that the increased number of invasive tumor cells found in response to M1-derived factors ( $44 \pm 9$  invasive cells/field) decreased to basal levels ( $5 \pm 2$  invasive cells/field) when T24 cells were pre-treated with LY294002 at 10  $\mu$ M ( $7 \pm 4$  invasive cells/field) and 50  $\mu$ M ( $6 \pm 4$  invasive cells/field). These results revealed that increased invasiveness of T24 cells in response to M1-derived factors is PI 3-K-dependent, and suggest that other signalling pathways are involved in cell survival.

Further cell signalling analysis shown that phosphorylation of the p38 MAP kinase is induced by both M1-CM and M2-CM (Fig. 5.8A). In contrast to phospho-Akt, however, the levels of phospho-p38 were more efficiently induced when T24 cells were stimulated with M2-CM (5.3 fold) than with M1-CM (2.2 fold). In order to determine the involvement of this signaling pathway in cell viability, T24 cells were pre-treated with the p38 MAP-kinase inhibitor SB203580 before stimulation with soluble factors from M1 and M2 cells. As assessed by MTT assay, pre-treatment of T24 cells with SB203580 (at 10  $\mu$ M) significantly decreased the number of viable cells, even in control cells and cells treated with M2-CM (Fig. 5.8B). No change was observed in the number of invasive T24 cells pre-treated with SB203580 and stimulated with M1-CM (data not shown) suggesting that activation of p38 MAP-kinase is required to sustain cell viability but not for M1 cells to increase the invasiveness of T24 cells.

## Discussion

In an attempt to clarify the involvement of infiltrating MØs and their derived soluble factors in bladder cancer cell survival and invasion, we have developed a relevant *in vitro* model to study interactions between tumor cells and MØs of M1 and M2 subtypes. In accordance with the literature [108, 160, 161], the generation of cells with a M1 (IL-10<sup>low</sup>IL-12<sup>high</sup>CD14<sup>high</sup>) or a M2 (IL-10<sup>high</sup>IL-12<sup>low</sup>CD14<sup>low</sup>) phenotype was directed by the activation of monocyte-derived MØs with a combination of IFN- $\gamma$ /LPS or IL-4/IL-10, respectively. As expected, M1 polarization enhances the gene expression of pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF- $\alpha$  and GM-CSF), while M2 polarization increases gene expression of anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-10 and CCL22).

In peripheral blood of patients with bladder cancer, proportions of Th2 cells producing IL-10, IL-4, and/or IL-6 is significantly elevated, whereas proportions of Th1 cells producing IFN- $\gamma$  is decreased, as compared with otherwise healthy cohorts [175]. IL-10, which was first identified as a factor produced by Th2 cells, inhibits cytokine production by MØs [171, 172] and Th1 cells [176] and contributes to the inhibition of accessory function of MØs and dendritic cells [177]. This can explain why IL-10 suppresses the cytotoxic effects of M1-derived factors we have revealed in our study. These observations are strongly supported by the finding that commitment of TAMs to produce high levels of IL-10 may be a common mechanism used by tumors to interfere with immune responses and promote tumor survival [78]. Along with TGF- $\beta$ , IL-10 is spontaneously produced by a variety of tumors and is believed to play a major role in the induction of immunosuppression during tumor growth [178]. In regard of bladder cancer progression and evasion to immune surveillance, the biological significance of inhibitory circuits established by tumor-infiltrating leukocytes is highlighted by the study of Loskog et al. who have recently discovered that the malignant tissue of patients with bladder cancer is dominated by the expression of the inhibitory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  together with the presence of IL-10-producing regulatory T cells [179].

TNF- $\alpha$  is highly released by M1 cells and is considered as the most important mediator directly involved in tumor cell killing by fully activated human M $\phi$ s [36]. The mechanism by which TNF- $\alpha$  is able to kill target cells involves the binding of TNF- $\alpha$  to TNF receptors type 1 (TNF-R1) [12, 13], binding of TNF- $\alpha$  to TNF-R2 not being sufficient to initiate cell killing [13]. TNF- $\alpha$  is cytotoxic *in vitro* and different cancer cells have different sensitivities to TNF $\alpha$ -induced apoptosis, growth inhibition or cell lysis [180]. Moreover, among the different model cancer cell lines isolated from a given organ site, intrinsic sensitivity to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis can vary depending on various parameters, including endogenous levels of anti-apoptotic factors such as X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) [181]. The bladder carcinoma T24 cell line we used in this study was previously evidenced to be resistant to TNF- $\alpha$  -induced apoptosis [182], and we found that blocking access to TNF-R1 using specific antibodies does not affect T24 cell proliferation or viability in response to soluble factors from M1 cells. Although it has been showed that conditioned media from M1 cells contains high levels of pro-apoptotic factors, including TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ [183], no apoptotic bodies or cleaved caspase-3 were detected when T24 cells were cocultured with M1 cells. This indicates that M1 cells fail to induce apoptosis in T24 cells. Because the number of metabolically active T24 cells decreased when cultured in the presence of M1 cells or conditioned media, as indicated by MTT assay, we conclude that M1 cells inhibit T24 cell growth but do not affect cell viability.

Previous studies have established that some tumor- and M $\phi$ -derived soluble factors, such as TNF- $\alpha$ , M-CSF, MIF, EGF and osteopontin are involved in tumor cell/M $\phi$  interactions and the regulation of tumor cell migration and invasiveness [99, 102, 184-186]. In this context, we have demonstrated that TNF-R1 ligation by TNF- $\alpha$  in M $\phi$ s and T24 bladder cancer cells is required to mediate tumor cell invasiveness. In agreement with our results involving TNF-R1 in M $\phi$ -mediated tumor cell invasion, it was reported that coculture of M $\phi$ s with either breast or ovarian cancer cell lines led to a significant increase in the *in vitro* invasiveness of the tumor cells [102, 103]. Addition of neutralizing TNF- $\alpha$  antibodies in the micro-invasion model revealed that enhanced invasiveness of

these malignant cells was dependent on up-regulation of TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  - induced release of matrix metalloprotease (MMP)-2 and MMP-9 in M $\phi$ s, and TNF- $\alpha$  -dependent activation of the transcription factor Nuclear Factor-Kappa B (NF- $\kappa$ B) in tumor cells [102, 103].

In response to soluble factors from M1 cells, the relative number of metabolically active cells was similar in T24 cell cultures pre-treated or not with the PI 3-K inhibitor LY294002. This suggests that despite the fact that the PI 3-K/Akt signaling pathway is strongly activated by M1-derived factors, this survival pathway is probably not involved in T24 cell resistance to M1-induced tumor cell growth arrest. Two independent studies have demonstrated that increased activation of the p38 MAP-kinase signaling pathway is an important route for the resistance to TNF-induced apoptosis in breast and prostate carcinoma [187, 188]. When T24 cells were pre-treated with the p38 MAP-kinase inhibitor SB203580 before stimulation with soluble factors from M1 and M2 cells, strong growth inhibitory effect was observed, even in control cells and cells treated with M2-derived soluble factors. This suggests that activation of the p38 MAP-kinase signalling pathway is absolutely required to sustain T24 cancer cell viability. In contrast to M2 cells, we found that M1 cells have the ability to promote T24 cancer cell invasion in a way depending on PI 3-K/Akt signaling pathway activation in tumor cells. In accordance with this finding, a recent study has demonstrated that the invasive phenotype of a panel of bladder cancer cells, including T24 cells, is correlated with high levels of both Akt and Epidermal Growth Factor receptor (EGFR) activation [173]. Similar to our experimental approach, the authors showed that PI 3-K inhibition reduced the invasiveness of EGFR-expressing bladder cancer cell lines. To our knowledge, however, this is the first report that paracrine activation of PI 3-K/Akt signaling pathway in tumor cells by pro-inflammatory M $\phi$ s is involved in the regulation of tumor cell invasion. Nevertheless, other signaling pathway(s) involved in the M1-induced invasion of bladder cancer cells required further studies.

In summary, our study confirmed that when applied to T24 bladder cancer cell cultures, M2 cells and their soluble factors support tumor cell survival and



proliferation but fail to promote invasion or the activation of pro- or anti-inflammatory genes in tumor cells. Conversely, M1 cells and their derived soluble factors displayed a strong growth inhibitory activity but did not cause extensive cancer cell death. Of note, our results suggest that M2 cells, via production of IL-10 and other soluble factors, may suppress the anti-tumoral effects of M1 cells. In response to soluble factors from M1 cells, but not to those from M2 cells, T24 cells are not only induced to increase their invasiveness but also to activate several pro-inflammatory genes known to be involved in tumor promotion and metastasis, such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, and MCP-1 [12, 189-191].

### **Conclusions**

Our findings that both types of polarized MØs can regulate bladder tumor cell survival and invasion in both cell-to-cell and paracrine manners give important new insight into the significance of tumor cell/MØ interactions, which were recently reported to influence the outcome of bladder cancer immunotherapy [156, 169]. Furthermore, it supports the idea that TAMs may also serve as predictors of immunological therapy outcomes [156, 169]. Our experimental data will be helpful for the rational design of novel anticancer strategy. Interrupting tumor cell–MØ communication by targeting IL-10, for example, may provide an alternative therapeutic approach for the treatment of bladder cancer.

**List of abbreviations:** BCG, Bacillus Calmette-Guerin; CIS, carcinoma-in-situ; MØs, macrophages; MDM, monocyte-derived macrophages; PI 3-K, phosphoinositide 3'-OH kinase; TCC, transitional cell carcinoma; TAMs, tumor-associated macrophages.

**Competing interests:** The authors declare no financial conflict of interest.

**Authors' contributions:** MD performed the experimental procedures and wrote the manuscript with support from GD. MP and CC help with the experimental



design to isolate and polarize monocyte-derived macrophages. CRM and EA were responsible for experimental design, interpretation of the results, and critical review of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgments:** The authors wish to acknowledge Dr Céline Van Themsche for assistance with the microinvasion model and for critical reading of this manuscript. This study was financially supported by grants from The Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to CRM.

## References

1. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P: **Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy.** *Eur J Cancer* 2006, **42**(6):717-727.
2. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.** *Trends Immunol* 2004, **25**(12):677-686.
3. Mantovani A, Sica A, Locati M: **Macrophage polarization comes of age.** *Immunity* 2005, **23**(4):344-346.
4. Gordon S: **Alternative activation of macrophages.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**(1):23-35.
5. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J: **Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences.** *J Immunol* 2005, **175**(1):342-349.
6. Stout RD, Suttles J: **Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments.** *J Leukoc Biol* 2004, **76**(3):509-513.
7. Condeelis J, Pollard JW: **Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis.** *Cell* 2006, **124**(2):263-266.
8. Pollard JW: **Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(1):71-78.
9. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T: **A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer.** *Critical reviews in oncology/hematology* 2002, **44**(2):143-161.
10. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE: **The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies.** *J Pathol* 2002, **196**(3):254-265.

11. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS: **Bladder cancer**. *Lancet* 2009, **374**(9685):239-249.
12. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K: **BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on**. *Lancet* 1999, **353**(9165):1689-1694.
13. Jakse G, Hall R, Bono A, Holtl W, Carpentier P, Spaander JP, van der Meijden AP, Sylvester R: **Intravesical BCG in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder: long-term results of EORTC GU Group phase II protocol 30861**. *Eur Urol* 2001, **40**(2):144-150.
14. Schamhart DH, de Boer EC, de Reijke TM, Kurth K: **Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use**. *European urology* 2000, **37 Suppl 3**:16-23.
15. Luo Y, Chen X, O'Donnell MA: **Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN-gamma production: cytokine promotion and simulation of BCG effect**. *Cytokine* 2003, **21**(1):17-26.
16. Ayari C, LaRue H, Hovington H, Decobert M, Harel F, Bergeron A, Tetu B, Lacombe L, Fradet Y: **Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells and macrophages as predictors of response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy**. *European urology* 2009, **55**(6):1386-1395.
17. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, Nomura T, Nasu N, Nomura Y: **Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer**. *Int J Urol* 2000, **7**(7):263-269.
18. Takayama H, Nishimura K, Tsujimura A, Nakai Y, Nakayama M, Aozasa K, Okuyama A, Nonomura N: **Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation**. *The Journal of urology* 2009, **181**(4):1894-1900.
19. Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J: **Method for large scale isolation,**

- culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *Journal of immunological methods* 2004, **288**(1-2):123-134.
20. Reyes-Moreno C, Girouard J, Lapointe R, Darveau A, Mourad W: **CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes.** *J Biol Chem* 2004, **279**(9):7799-7806.
  21. Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P: **Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes.** *J Exp Med* 1996, **184**(1):51-60.
  22. Clarke CJ, Hales A, Hunt A, Foxwell BM: **IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity.** *Eur J Immunol* 1998, **28**(5):1719-1726.
  23. Sica A, Sacconi A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van Damme J, Mantovani A: **Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages.** *J Immunol* 2000, **164**(2):762-767.
  24. Balkwill F: **Cancer and the chemokine network.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(7):540-550.
  25. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C: **Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases.** *Carcinogenesis* 2004, **25**(8):1543-1549.
  26. Wallerand H, Cai Y, Wainberg ZA, Garraway I, Lascombe I, Nicolle G, Thierry JP, Bittard H, Radvanyi F, Reiter RR: **Phospho-Akt pathway activation and inhibition depends on N-cadherin or phospho-EGFR**

**expression in invasive human bladder cancer cell lines().** *Urologic oncology* 2008.

27. Toker A Y-LM: **AKT signaling and cancer: Surviving but not moving on.** *Cancer research* 2006, **66** (8):3963-3966.
28. Agarwal A, Verma S, Burra U, Murthy NS, Mohanty NK, Saxena S: **Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder.** *Cancer Immunol Immunother* 2006, **55**(6):734-743.
29. Becker JC, Czerny C, Brocker EB: **Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10.** *Int Immunol* 1994, **6**(10):1605-1612.
30. Luscher U, Figueira L, Juretic A, Zuber M, Luscher NJ, Heberer M, Spagnoli GC: **The pattern of cytokine gene expression in freshly excised human metastatic melanoma suggests a state of reversible anergy of tumor-infiltrating lymphocytes.** *International journal of cancer* 1994, **57**(4):612-619.
31. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY: **The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction.** *Immunol Today* 1997, **18**(10):493-497.
32. Loskog A, Ninalga C, Paul-Wetterberg G, de la Torre M, Malmstrom PU, Totterman TH: **Human bladder carcinoma is dominated by T-regulatory cells and Th1 inhibitory cytokines.** *The Journal of urology* 2007, **177**(1):353-358.
33. Balkwill F: **Tumour necrosis factor and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(5):361-371.
34. Tartaglia LA, Goeddel DV: **Two TNF receptors.** *Immunol Today* 1992, **13**(5):151-153.
35. Old LJ: **Tumor necrosis factor (TNF).** *Science* 1985, **230**(4726):630-632.
36. Van Themsche C, Lafontaine L, Asselin E: **X-linked inhibitor of apoptosis protein levels and protein kinase C activity regulate the**

**sensitivity of human endometrial carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.** *Endocrinology* 2008, **149**(8):3789-3798.

37. Gao XD, Chen YR: **Inhibition of telomerase with human telomerase reverse transcriptase antisense enhances tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in bladder cancer cells.** *Chin Med J (Engl)* 2007, **120**(9):755-760.
38. Dumont P, Berton A, Nagy N, Sandras F, Tinton S, Demetter P, Mascart F, Allaoui A, Decaestecker C, Salmon I: **Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer.** *Lab Invest* 2008, **88**(8):896-906.
39. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, Stanley ER, Segall JE, Condeelis JS: **Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop.** *Cancer research* 2005, **65**(12):5278-5283.
40. Patsialou A, Wyckoff J, Wang Y, Goswami S, Stanley ER, Condeelis JS: **Invasion of Human Breast Cancer Cells In vivo Requires Both Paracrine and Autocrine Loops Involving the Colony-Stimulating Factor-1 Receptor.** *Cancer research* 2009.
41. Song G, Ouyang G, Mao Y, Ming Y, Bao S, Hu T: **Osteopontin promotes gastric cancer metastasis by augmenting cell survival and invasion through Akt-mediated HIF-1alpha up-regulation and MMP9 activation.** *J Cell Mol Med* 2008.
42. Sun B, Nishihira J, Yoshiki T, Kondo M, Sato Y, Sasaki F, Todo S: **Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor invasion and metastasis via the Rho-dependent pathway.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(3):1050-1058.
43. Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C, Balkwill FR: **Macrophages induce invasiveness**

- of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J Immunol* 2005, **175**(2):1197-1205.**
44. Weldon CB, Parker AP, Patten D, Elliott S, Tang Y, Frigo DE, Dugan CM, Coakley EL, Butler NN, Clayton JL *et al*: **Sensitization of apoptotically-resistant breast carcinoma cells to TNF and TRAIL by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling.** *Int J Oncol* 2004, **24**(6):1473-1480.
45. Ricote M, Garcia-Tunon I, Fraile B, Fernandez C, Aller P, Paniagua R, Royuela M: **P38 MAPK protects against TNF-alpha-provoked apoptosis in LNCaP prostatic cancer cells.** *Apoptosis* 2006, **11**(11):1969-1975.
46. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL: **The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer.** *Eur J Cancer* 2005, **41**(16):2502-2512.
47. Li S, Takeuchi F, Wang JA, Fuller C, Pacheco-Rodriguez G, Moss J, Darling TN: **MCP-1 overexpressed in tuberous sclerosis lesions acts as a paracrine factor for tumor development.** *J Exp Med* 2005, **202**(5):617-624.
48. Waugh DJ, Wilson C: **The interleukin-8 pathway in cancer.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(21):6735-6741.

## Figure legends

### **Figure 5.1. Morphological and functional features of human polarized MØs.**

**(A)** Morphology analysis. Macrophages were polarized as described in Materials and Methods and cellular morphology was visualized using phase contrast microscopy. Representative sections are shown (original magnification, x 400).

**(B)** Flow cytometry analysis. Result show CD14 protein expression in polarized macrophages and is representative of three independent experiments.

**(C)** RT-PCR analysis. Result show mRNA levels of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$  and anti-inflammatory cytokines IL-10, MCP-1 and CCL22, normalized to GAPDH. The relative mRNA expression of gene of interest (gene/GAPDH ratio) was expressed as fold induction of control cells (no polarized M0 cells).

### **Figure 5.2. Cell viability analysis in tumor cell/MØ cocultures.**

**(A)** Visualization of cell density of T24 cells cultured alone and T24 cells cocultured with polarized MDM as assessed by the images obtained using an inverted fluorescence microscope. Pictures were recorded at time point 24, 48 and 72h from T24 cells ( $5 \times 10^3$ /well) alone and T24 cells cocultured with previously polarized MDM at a cell ratio of 1:3 ( $15 \times 10^3$  M1 or M2 cells) and 1:6 ( $30 \times 10^3$  M1 or M2 cells). At the end of incubation, cultured cells were washed, fixed and stained with Hoescht 33258 dye. Representative (n=16) sections are shown (original magnification, x 400). Arrowheads indicate T24 cells and arrows show M1 or M2 cells.

**(B)** Growth kinetic analysis of T24 cell cultures and T24 cell/MDM cocultures. MTT assays were performed to determine the changes in the relative number of viable cells in T24 cell cultures alone or in T24 cells cocultured with polarized M1 or M2 cells. \* p <0.01 significantly different compared with T24 cell cultures alone.



**Figure 5.3. Soluble factors from polarized MØs influence T24 cancer cell viability.**

**(A)** T24 cells ( $5 \times 10^3$ /well) were cultured for 48h with different concentrations of CM from polarized M1 or M2 cells and MTT assays were performed to measure cellular viability. CM from M1 and M2 cells were a pool of three different preparations of MDM; CM dilutions were done using serum-free culture media. The relative number of viable cells was expressed as percent of no stimulated control (Ctl) T24 cells. \*  $p < 0.05$ , significantly different compared with control media.

**(B)** Immunoblot analysis of cleaved caspase-3, an apoptosis marker, revealed that T24 cells were insensitive to the apoptotic effects of M1-CM. Cells were cultured for 24h with control (Ctl) media, M1-CM and M2-CM and then lysed to quantify the protein content. The blots were probed with anti- $\beta$ -actin antibodies to confirm that an equal amount of proteins per well were loaded (50  $\mu$ g). The results represent one of three independent experiments.

**(C)** T24 cells were cultured for 48h with control medium, 100% M1-CM and 100% M2-CM. At the end of incubation, the cultured cells were washed, fixed and stained with Hoescht 33258 dye to distinguish apoptotic and viable cells. No apoptotic bodies were detected when T24 cells were incubated with either M1-CM or M2-CM. Representative ( $n=16$ ) sections are shown (original magnification, x 400).

**Figure 5.4. Influence of M2-derived factors on M1-mediated T24 cell growth arrest.**

T24 cells ( $5 \times 10^3$ /well) were cultured with control (Ctl) media, M1-CM, M2-CM and with an equal volume of M1-CM and M2-CM. MTT assays were performed to measure cellular viability after 48h of stimulation. IL-10 was added to M1-CM to determine whether IL-10 reverse the inhibitory effect of M1-cell derived factors on T24 cell growth. The relative number of viable cells was expressed as percent of control (Ctl). Different superscripts denote significant differences between treatments,  $p < 0.05$ .

**Figure 5.5. IL-10 weakens the cytotoxic effects of M1 cells in tumor cell/MØ cocultures.**

**(A)** Visualization of cell density of T24 cells cultured alone and T24 cells cocultured with M1 cells, in the presence and the absence of IL-10. T24 cells cultured alone ( $5 \times 10^3$ /well) and T24 cells cocultured with M1 cells at a cell ratio of 1:3 and 1:6 were left untreated to serve as control, or treated for 72h with IL-10 at 10 and 50 ng/ml. Arrowheads indicate T24 cells and arrows shown M1 cells.

**(B)** Analysis of cellular growth and viability in tumor cell/MØ cocultures as assessed by MTT assays. Result show the changes in the relative number of viable cells in T24 cell cultures alone or in T24 cells cocultured with M1 cells, in the presence and the absence of exogenous IL-10. The relative number of viable cells was expressed as percent of control (Ctl). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  significantly different compared with control (Ctl); NSD, no significant difference.

**Figure 5.6. M1 cells up-regulate gene expression and invasiveness of T24 cancer cells.**

**(A)** T24 cells ( $500 \times 10^3$ /well) were stimulated with control (Ctl) media, M1-CM and M2-CM during 6h and total RNA was extracted and processed for quantitative RT-PCR analysis. The relative mRNA expression of gene of interest (gene/GAPDH ratio) was expressed as fold induction of no stimulated control (Ctl) T24 cells. The result shown is representative of three independent experiments.

**(B)** T24 cells ( $50 \times 10^3$ /well) were cultured with polarized MØs at a cell ratio of 1:3 ( $150 \times 10^3$  M1 or M2 cells) and 1:6 ( $300 \times 10^3$  M1 or M2 cells), or stimulated with either M1-CM or with M2-CM. Invasion was measured by assessment of T24 cell migration through Matrigel in a modified Boyden chamber, where tumor cells were cocultured for 48h without direct cell-to-cell contact with MØs. Representative ( $n=16$ ) sections are shown (original magnification,  $\times 400$ ). Different superscripts denote significant differences between treatments,  $p < 0.05$ .

**Figure 5.7. Influence of TNF-R1 function in T24 cell invasiveness and viability.**

**(A)** T24 cells ( $50 \times 10^3$ /well) were cocultured in a modified Boyden chamber with polarized MØs at a cell ratio of 1:6 ( $300 \times 10^3$  M1 or M2 cells) in the presence of an anti-TNF-R1 neutralizing antibody or an irrelevant isotype-matched antibody, both at 5 µg/ml.

**(B)** T24 cells ( $5 \times 10^3$ /well) were cultured for 48 h with M1-CM and M2-CM in the presence of anti-TNF-R1 antibodies or an irrelevant isotype-matched antibody. The relative number of viable cells was evaluated by MTT assays and expressed as percent of control (Ctl). NSD, no significant difference.

**Figure 5.8. Akt and p38 signalling pathways in T24 cell survival and invasion.**

**(A)** T24 cells ( $50 \times 10^3$ /well) were stimulated for 15 min with control (Ctl) media, M1-CM and M2-CM. Immunodetection of Akt, phospho-Akt, p38, and phospho-p38 molecules was performed as described in Materials and Methods. A representative result from three independent experiments is shown.

**(B)** T24 cells ( $5 \times 10^3$ /well) were pre-treated with the PI 3-K inhibitor LY294002 (LY at 50 µM) and the p38 MAP kinase inhibitor SB203580 (SB at 10 µM) for 1h and then stimulated with control (Ctl) media, M1-CM and M2-CM. The relative number of viable cells was evaluated by MTT assays and expressed as percent of control cells (Ctl) pre-treated with DMSO as vehicle. \* p <0.05; \*\* p <0.01 significantly different compared with vehicle.

**(C)** T24 cells ( $50 \times 10^3$ /well) were pre-treated with the PI 3-K inhibitor LY at 10 and 50 µM for 1h and then cocultured in a modified Boyden chamber with M1 cells at a cell ratio of 1:6 ( $300 \times 10^3$ ). \* p <0.05 significantly different compared with vehicle; NSD, no significant difference.

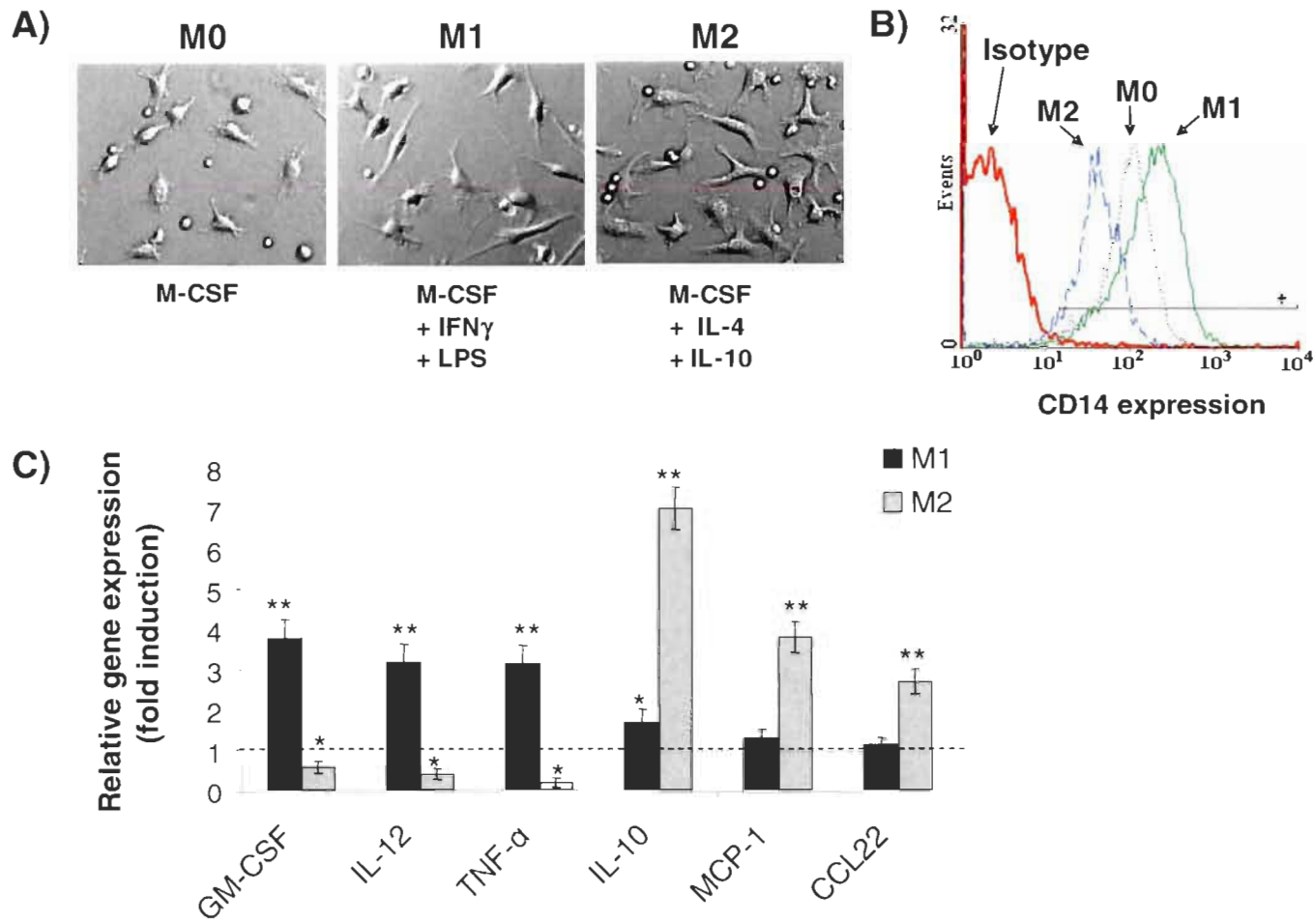


Figure 5.1: Morphological and functional features of human polarized M $\phi$ s

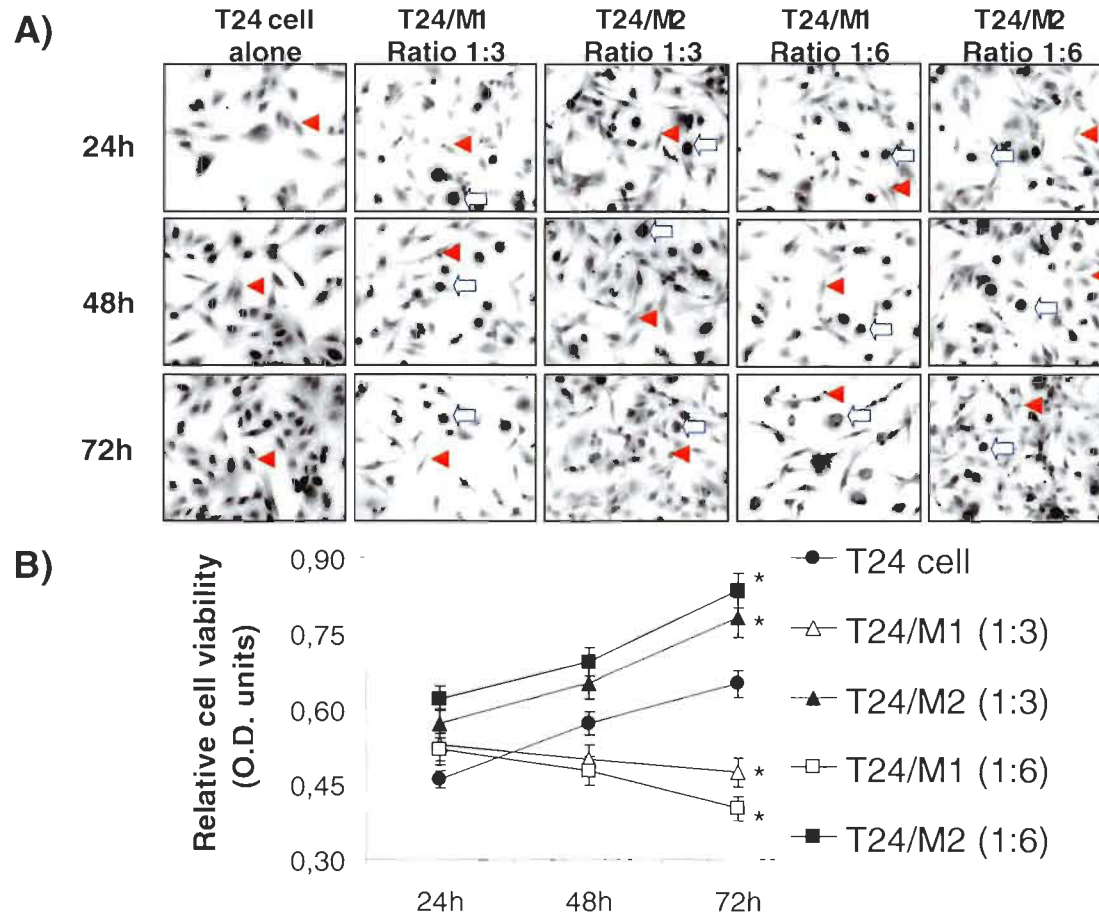


Figure 5.2: Cell viability analysis in tumor cell/MØ cocultures

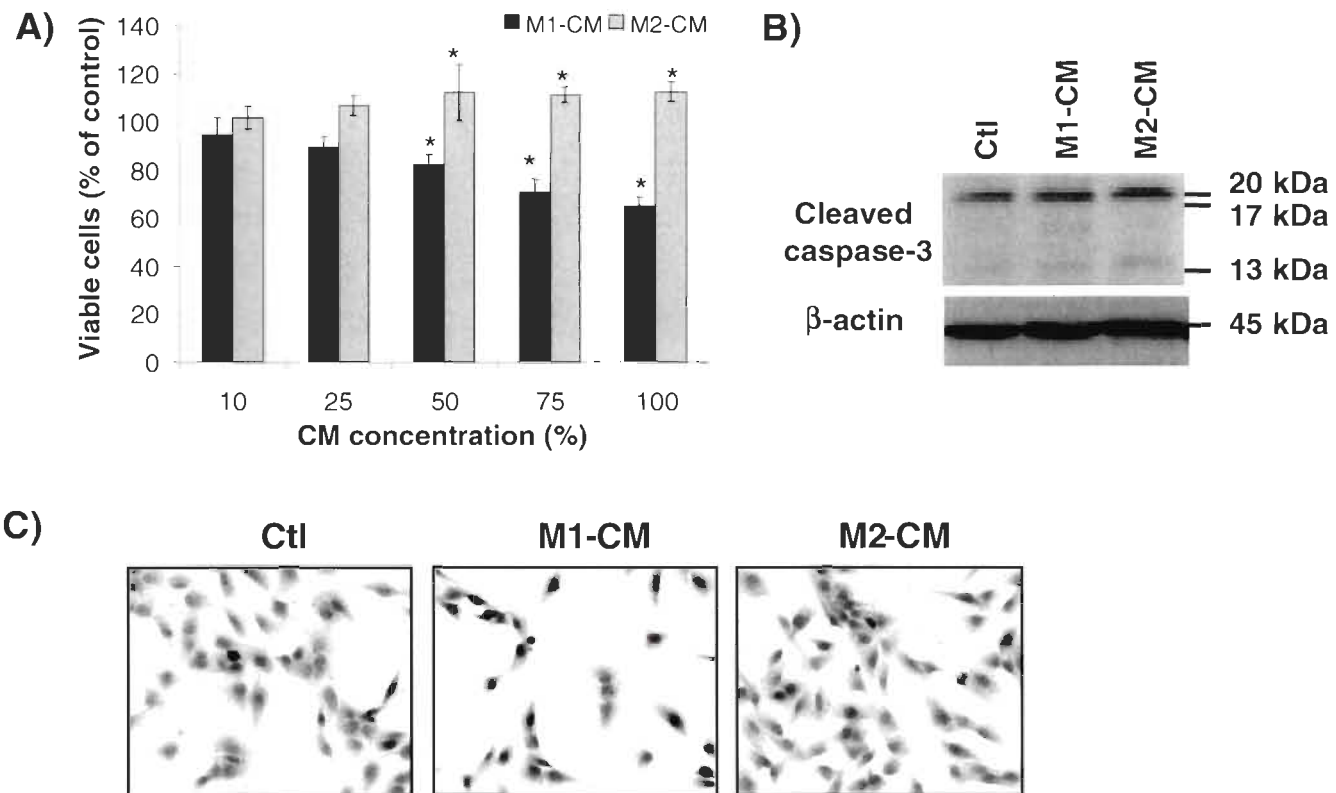


Figure 5.3: Soluble factors from polarized MØs influence T24 cancer cell viability

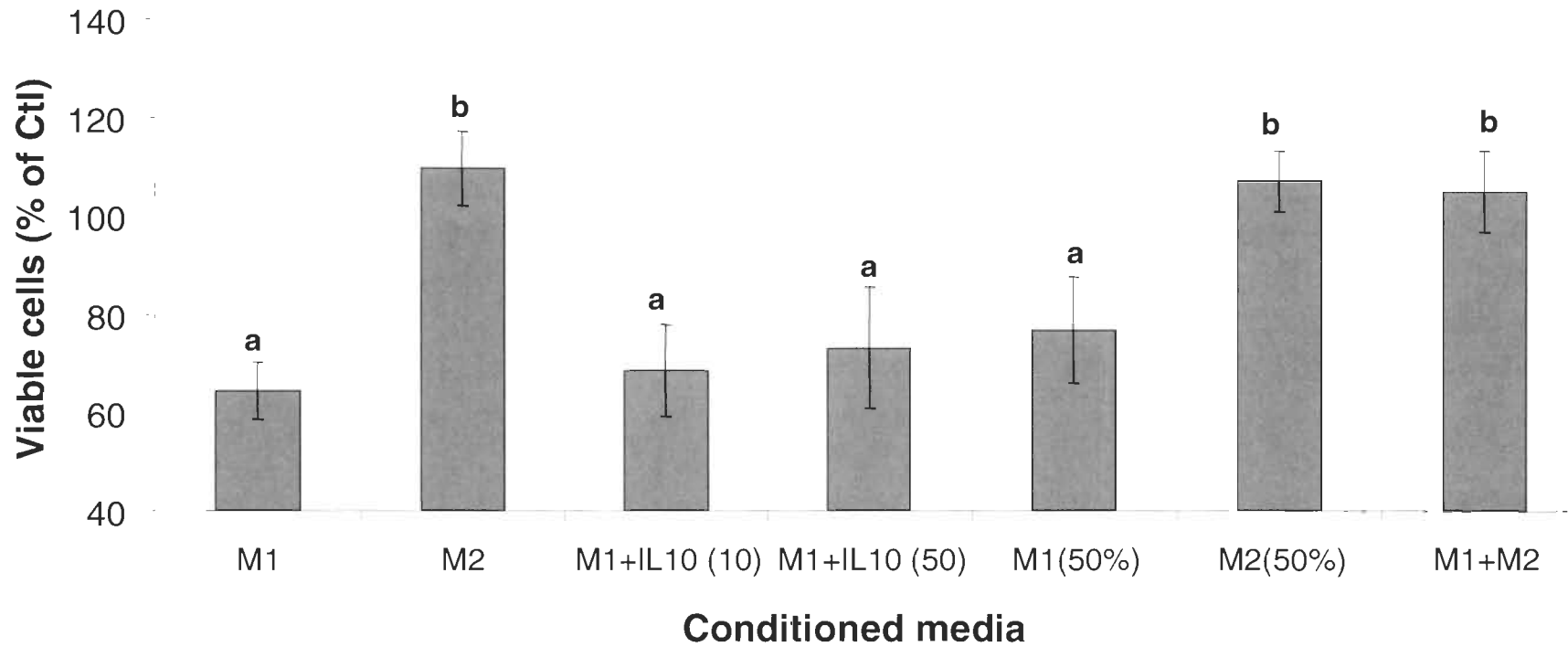
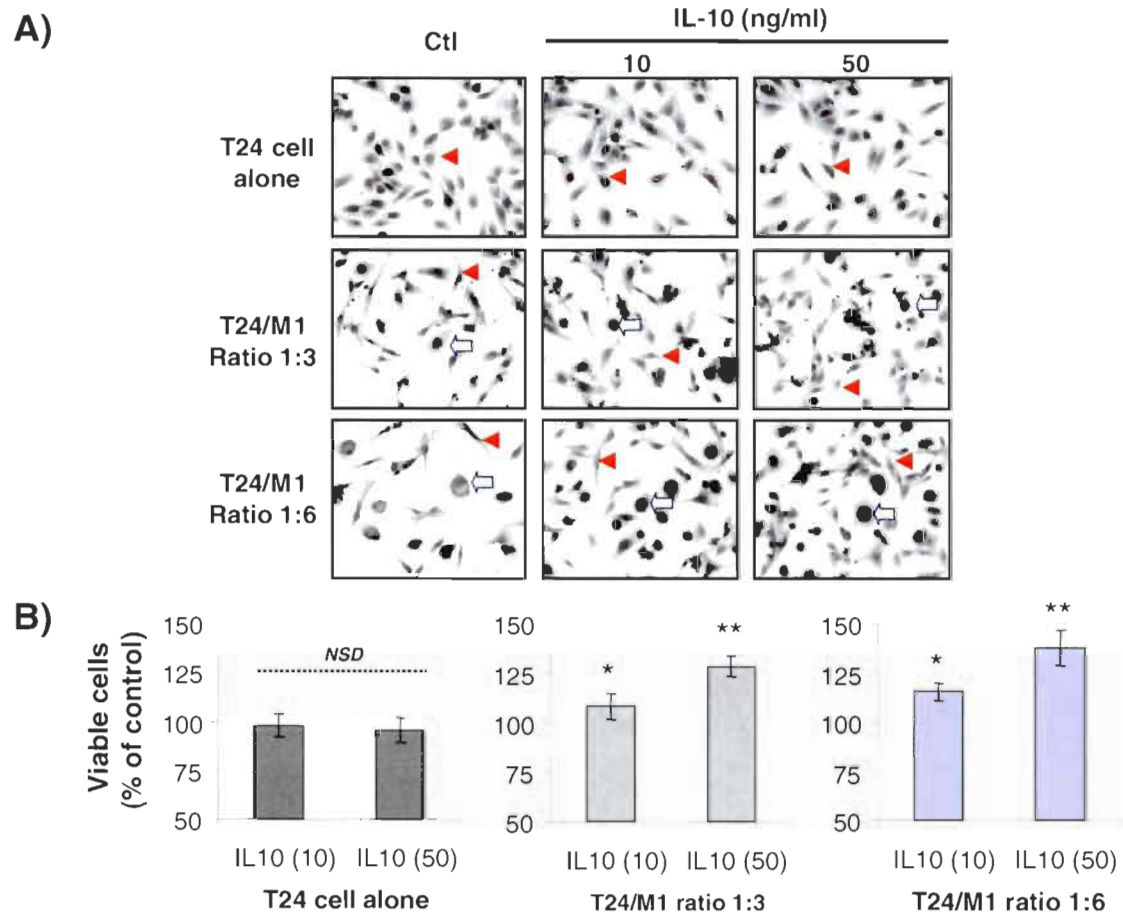


Figure 5.4: Influence of M2-derived factors on M1-mediated T24 cell growth arrest



**Figure 5.5: IL-10 weakens the cytotoxic effects of M1 cells in tumor cell/MØ cocultures**



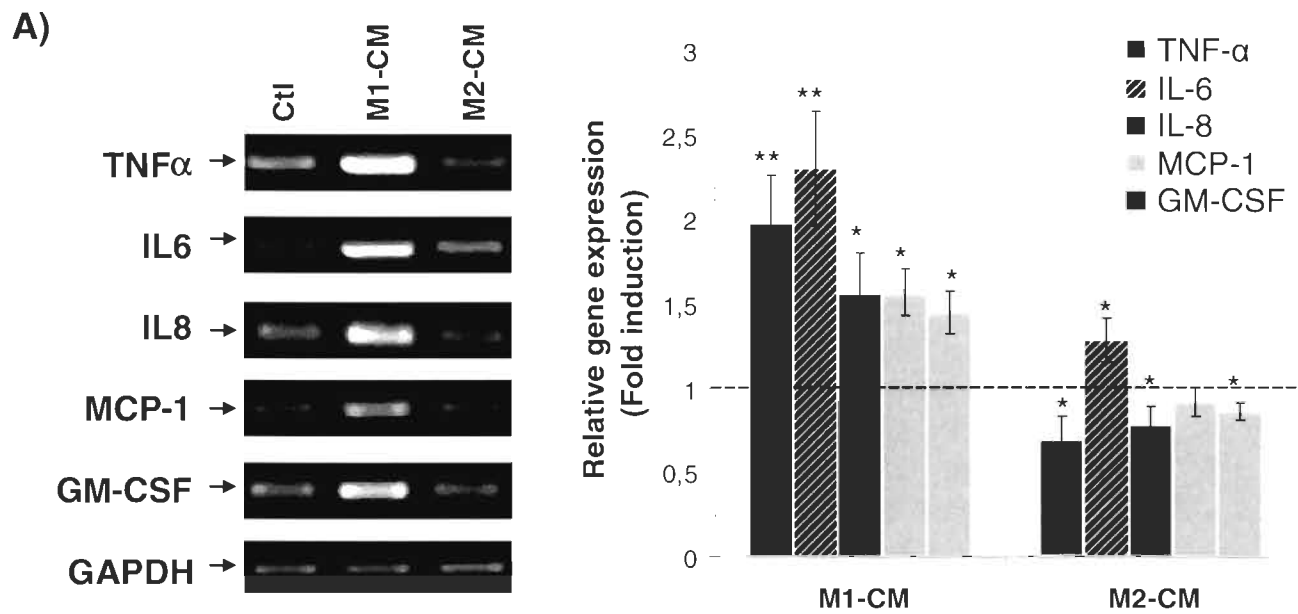
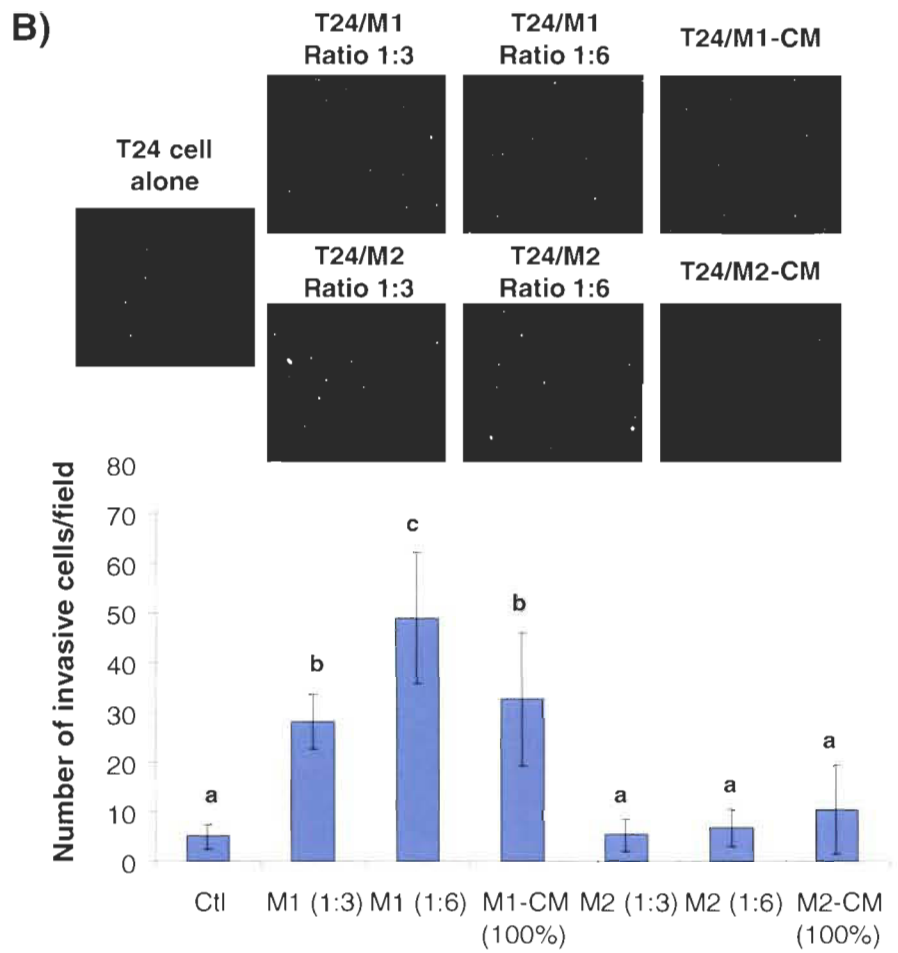


Figure 5.6A: M1 cells up-regulate gene expression and invasiveness of T24 cancer cells



**Figure 5.6B: M1 cells up-regulate gene expression and invasiveness of T24 cancer cells**

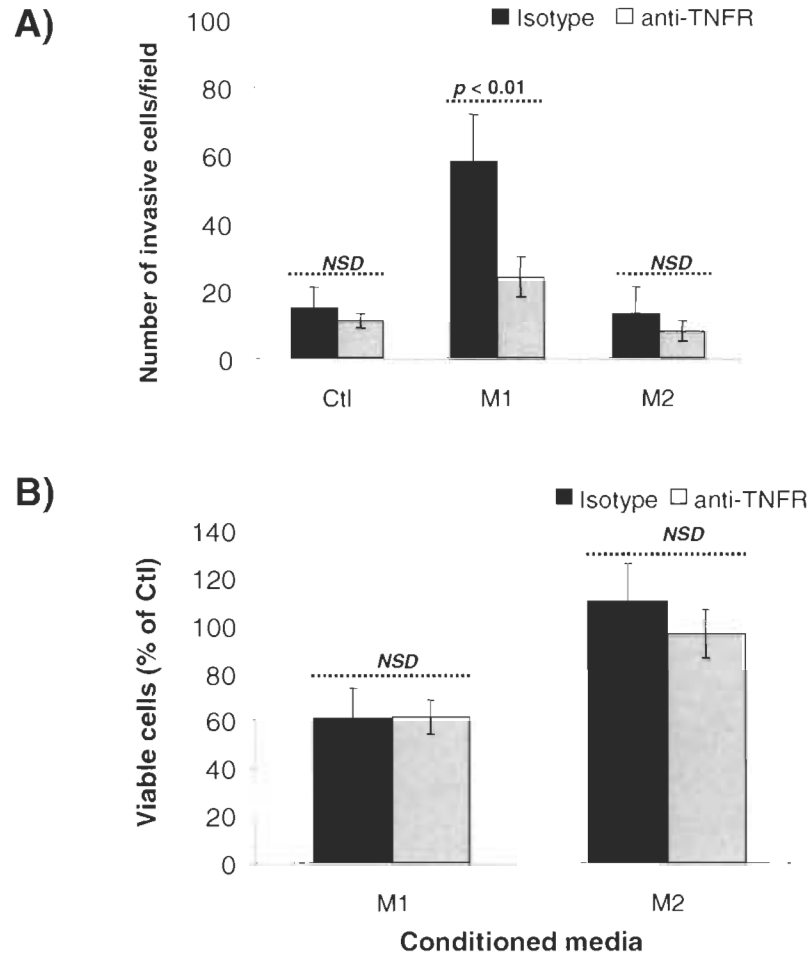


Figure 5.7: Influence of TNF-R1 function in T24 cell invasiveness and viability

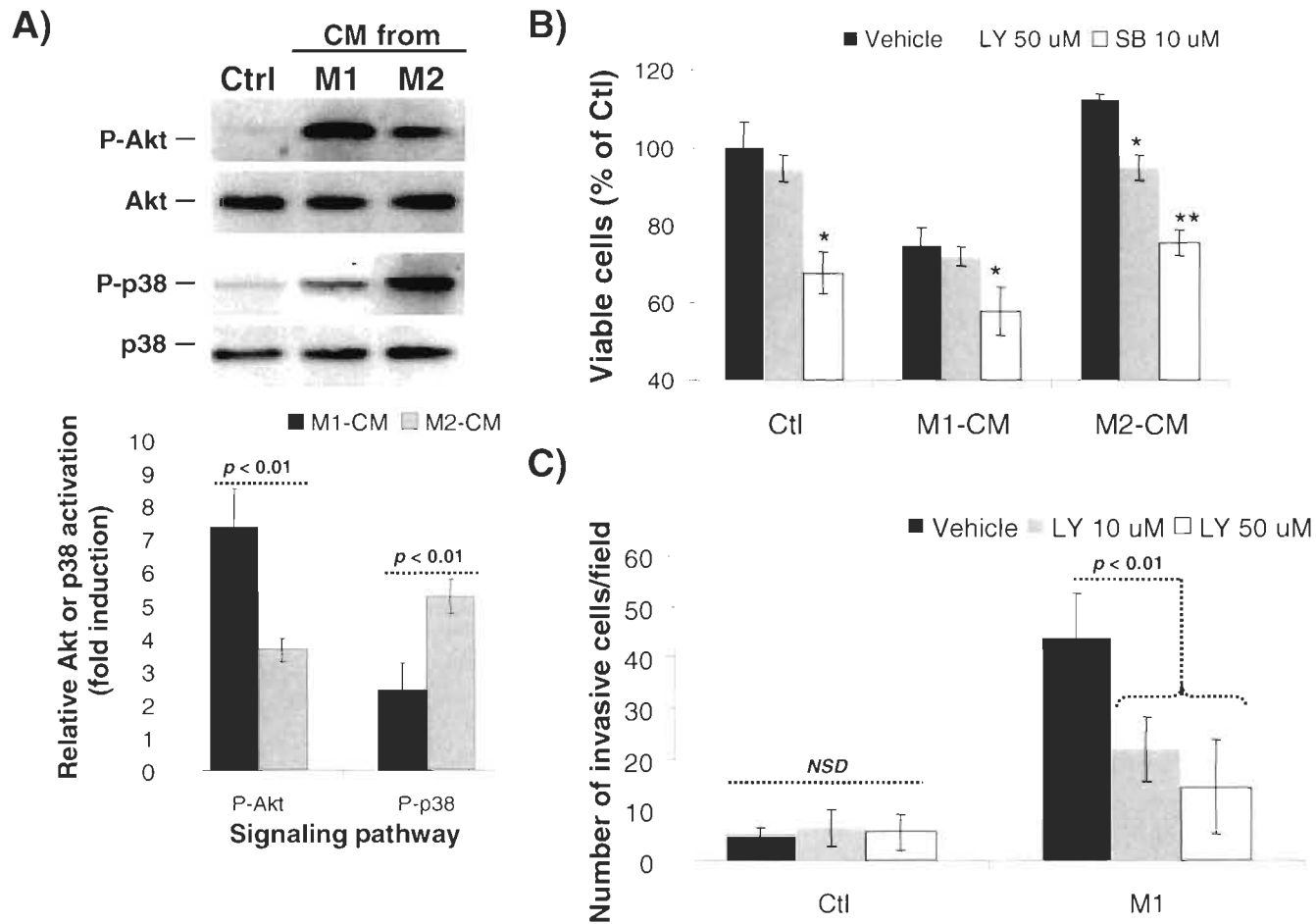


Figure 5.8: Akt and p38 signalling pathways in T24 cell survival and invasion

## CHAPITRE 6

### DISCUSSION

#### 6.1 Génération de MØs polarisés

Dans le but d'éclaircir l'influence des TAMs et leurs facteurs solubles sur la survie et l'invasion des cellules de cancer de la vessie, nous avons développé un modèle *in vitro* pour étudier les interactions entre les cellules tumorales et les MØs de type M1 et M2. Nous avons d'abord isolé des monocytes sanguins à partir d'échantillons de sang humain pour ensuite procéder à leur différenciation en MØ en les stimulant avec du M-CSF. Le M-CSF est une cytokine bien connue pour induire la différenciation des monocytes en macrophages [192]. La présence de M-CSF est d'ailleurs indispensable pour permettre le développement de MØs, car la délétion du gène *c-fms*, qui code pour le récepteur du M-CSF, entraîne une absence de MØs dans les tissus [193, 194]. Ainsi, le M-CSF est couramment utilisé pour la culture de monocytes/MØ *in vitro* [58]. Par la suite, nous avons procédé à la polarisation des MØ en M1 et en M2. En accord avec la littérature, nous avons généré des MØs M1 via une stimulation par l'IFN- $\gamma$  et le LPS, ils sont caractérisés par une faible expression d'IL-10 et une forte expression d'IL-12 et de CD14 (Figure 5.1) [58, 108, 160, 161]. Les MØs M2, quant à eux, sont générés suite à une stimulation par l'IL-4 et l'IL-10 et ils sont caractérisés par une forte expression d'IL-10 mais une faible expression d'IL-12 et de CD14 (Figure 5.1) [58, 108, 160, 161]. En plus de ces trois marqueurs, nous avons observé que la polarisation des MØs en M1 augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et GM-CSF, alors que chez les MØs polarisés en M2, les expressions de la cytokine anti-inflammatoire CCL22 et de la chemokine MCP-1 sont toutes deux augmentées (Figure 5.1). Le patron d'expression que nous avons observé chez les MØs

polarisés confirme les rôles pro-inflammatoire des MØs M1 et anti-inflammatoire des MØs M2 et vient valider l'utilisation de notre modèle pour tester l'effet des MØs polarisés sur les cellules tumorales de la vessie.

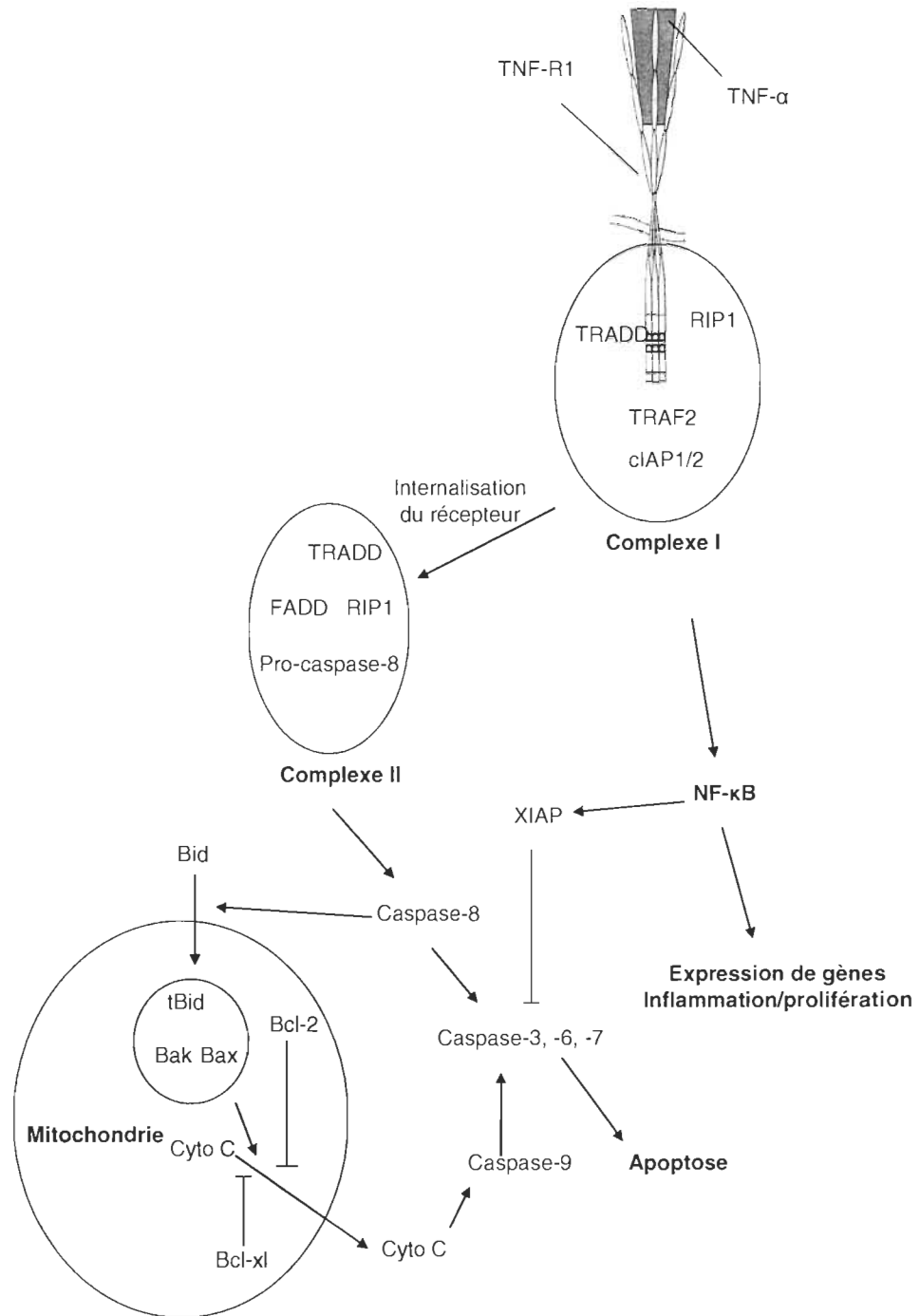
## 6.2 Influence des MØs polarisés sur la prolifération des cellules T24

Nous avons d'abord évalué l'effet des MØs polarisés en M1 et en M2 sur la prolifération des cellules T24 en co-culture. Nous avons observé que la prolifération des cellules T24 est fortement inhibée lorsqu'elles sont cultivées en présence de MØs M1 (Figure 5.2). Ce résultat concorde avec plusieurs études réalisées dans différents modèles de cancer où, tel que présenté au chapitre 1, des MØs activés via l'IFN- $\gamma$  et le LPS étaient en mesure de s'attaquer aux cellules cancéreuses. Nous avons par la suite observé que les facteurs solubles produits par les MØs M1 étaient en mesure d'inhiber la prolifération des cellules T24 sans que le contact cellule-cellule ne soit nécessaire (Figure 5.3).

Parmi les facteurs solubles sécrétés par les MØs M1, le TNF- $\alpha$  est considéré comme le plus important médiateur impliqué directement dans l'élimination des cellules cancéreuses [36]. D'ailleurs, il a déjà été rapporté que les cellules T24 sont sensibles à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  [195]. Tel que mentionné au premier chapitre, le mécanisme par lequel le TNF- $\alpha$  est capable d'induire la mort des cellules cibles implique qu'il se lie au récepteur TNF-R1, sa liaison au TNF-R2 n'étant pas en mesure d'induire la mort cellulaire [13]. Nous avons donc bloqué le récepteur TNF-R1 à l'aide d'anticorps spécifiques afin de déterminer si le TNF- $\alpha$  sécrété par les MØs M1 était responsable de l'inhibition de la prolifération des T24 par les facteurs solubles de MØs M1. Étonnamment, nous avons constaté que le blocage du TNF-R1 n'affecte en rien l'effet inhibiteur des facteurs solubles des MØs M1 sur la prolifération des cellules T24 (Figure 5.7). Cette observation concorde cependant avec une autre étude selon laquelle le TNF- $\alpha$  n'était pas en mesure d'induire l'apoptose chez les T24 [182]. D'ailleurs, malgré le fait qu'une inhibition de la prolifération soit observée en co-

culture ou en réponse aux facteurs solubles, nous n'avons pas détecté de caspase-3 clivée et aucun corps apoptotique n'était observable à la suite d'une exposition des cellules T24 aux facteurs solubles produits par les MØ M1 (Figure 5.3). Nous en concluons que les MØs M1 inhibent la croissance cellulaire des cellules T24 mais ne sont pas en mesure d'induire la mort cellulaire. Il est connu depuis longtemps que le TNF- $\alpha$  est cytotoxique *in vitro* mais que différentes lignées de cellules cancéreuses présentent différents niveaux de sensibilité à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  [180].

Nous devons d'abord comprendre le fonctionnement de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  pour bien comprendre les mécanismes conférant à une cellule la capacité d'y résister. Un schéma représentant la régulation de l'apoptose est présenté à la figure 6.1. La liaison du TNF- $\alpha$  au TNF-R1 induit la formation de différents complexes qui conduisent soit à l'apoptose, soit à la survie. La formation du complexe I (TRADD / TRAF2 / cIAP1/2 / RIP1) induit principalement l'activation du NF- $\kappa$ B et conduit à l'expression de gènes favorisant la survie cellulaire [17, 196]. La formation du complexe II (TRADD / FADD / RIP1 / pro-caspase-8) conduit à l'activation de la caspase 8. Une fois activé, la caspase 8 peut initier la cascade des caspases en activant les caspases 3 et 7 qui seront responsables de l'activation des facteurs impliqués dans la dégradation de l'ADN, il s'agit de la voie extrinsèque de l'apoptose [17, 197]. La caspase 8 peut également activer la voie intrinsèque de l'apoptose, c'est-à-dire l'initiation de la cascade des caspases médiée par la relâche de cytochrome C par les mitochondries. La régulation de la relâche de cytochrome C par les mitochondries est effectuée par les protéines de la famille *B-cell leukemia/lymphoma 2* (Bcl-2). La caspase 8 peut transformer un membre de cette famille, Bid, en sa forme active, tBid. Ce dernier sera ensuite transloqué vers la membrane mitochondriale où il interagira avec Bax et Bak (deux autres membres de la famille Bcl-2) pour permettre la relâche du cytochrome C [198, 199]. Ce processus est régulé négativement par les protéines Bcl-2 et Bcl-xL [198]. Le cytochrome C relâché dans le cytosol formera un complexe avec la



**Figure 6.1 : Régulation de l'apoptose.** La liaison du TNF- $\alpha$  induit la formation du complexe I qui provoque l'activation du NF- $\kappa$ B, conduisant à l'expression de gènes pro-inflammatoire et favorisant la survie cellulaire. Par la suite, on observe la formation du complexe II, qui provoque l'activation de la cascade des caspases et la relâche du cytochrome C par les mitochondries, ce qui ultimement conduira à l'apoptose.



pro-caspase 9 qui conduira à l'activation de la caspase 9 et qui pourra par la suite activer les caspases 3 et 7. Les caspases 9, 3 et 7 peuvent être inhibées par les protéines inhibitrices d'apoptose (XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2) [198]. De nombreux mécanismes conduisant à la résistance à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  ont été démontrés [15]. Par exemple, elle peut être provoquée par une perte de fonction de protéines pro-apoptotique (ex : Bak, Bax) ,ou encore, par une surexpression de protéines anti-apoptotiques (ex : Bcl-2, XIAP) [15].

Bien que le mécanisme à l'origine de la résistance des cellules T24 à l'apoptose induite par TNF- $\alpha$  n'est pas précisément identifié, il a été rapporté que l'inhibition de voie de signalisation PI 3-k/Akt sensibilisait les cellules T24 à l'apoptose induite via TRAIL [200]. Il est connu que Akt est en mesure d'inhiber l'apoptose en inhibant Bad, qui est lui-même un inhibiteur de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL [201]. Comme le TRAIL fait partie de la même famille que le TNF- $\alpha$  et qu'il induit l'apoptose via un mécanisme semblable (caspase 8-dépendant), nous avons vérifié le statut de l'activation d'Akt chez les T24 suite à leur stimulation par les facteurs solubles de MØs. Nous avons trouvé que les facteurs solubles sécrétés par les MØs M1 induisent fortement l'activation d'Akt. Nous avons cependant constaté que l'inhibition de la voie de signalisation de la PI 3-k/Akt n'avait aucun effet sur la viabilité des cellules T24 en réponse aux facteurs solubles sécrétés par les MØs M1 (Figure 5.8), ce qui suggère que les cellules T24 sont résistantes à l'apoptose induite par les facteurs solubles des MØs M1 indépendamment de l'activation d'Akt.

Deux études indépendantes ont démontré qu'une augmentation de l'activation de la voie de signalisation p38 MAP-kinase est impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  dans les cancers du sein et de la prostate [187, 188]. Lorsque les cellules T24 ont été prétraitées avec l'inhibiteur de p38 MAP-kinase SB203580 avant la stimulation par les facteurs solubles de MØs, une très forte inhibition de la croissance cellulaire a été observée, et ce, même dans les cellules contrôles et avec les facteurs solubles dérivés des MØs

M2 (Figure 5.8). Cela indique que l'activation de la voie de signalisation de la p38 MAP-kinase est essentielle pour soutenir la croissance cellulaire des T24 mais son effet ne semble pas relié au TNF- $\alpha$  puisque ce dernier n'est produit ni par les MØs M2, ni par les cellules contrôles. Il est possible que la résistance à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  soit due à une mutation au niveau du gène suppresseur de tumeur p53. En effet, les cellules T24 possèdent un allèle de p53 qui contient une délétion de la tyrosine 126 [202]. Il a été démontré que cette mutation est impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par la radiation [202]. p53 est connu pour pouvoir stopper le cycle cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN et ensuite initier l'apoptose si les dommages ne peuvent être réparés. En tant que facteur de transcription, p53 induit l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que Bax et Bid et réprime l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xL. Il peut également catalyser directement l'activation des protéines Bax et Bak [203]. L'apoptose induite par p53 implique donc la voie intrinsèque. Cependant, il semble que l'apoptose induite par la famille des récepteurs TNF ne nécessite pas la présence d'un gène de p53 fonctionnel [204]. Il est donc peut probable que la mutation du gène de p53 chez les T24 soit responsable de leur résistance à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$ . La piste la plus intéressante qui reste à explorer serait la surexpression de protéines anti-apoptotiques sous le contrôle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Il est connu que l'expression de protéines anti-apoptotiques tels que XIAP et A20 induite par NF- $\kappa$ B peut être à l'origine de la résistance à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  [205]. Il serait donc intéressant de vérifier le statut de l'activation du NF- $\kappa$ B et l'expression des protéines XIAP et A20 chez les T24 en réponse aux facteurs solubles produits par les MØ M1.

Les facteurs solubles produits par les MØs M2 augmentent significativement la prolifération des cellules T24 (Figures 5.1 et 5.2). Ce résultat démontre bien que les MØs M2 sont en mesure de favoriser la croissance tumorale en sécrétant des facteurs qui ont un effet direct sur les cellules

cancéreuses. Cependant, dans la littérature, l'influence indirecte que peuvent exercer les MØs M2 sur la croissance tumorale semble être un facteur beaucoup plus déterminant dans la promotion de la progression tumorale. En effet, dans un contexte *in vivo*, les MØs M2 sont en mesure de favoriser la croissance tumorale en atténuant la réponse immunitaire anti-tumorale [206]. Dans le cas du cancer de la vessie, nous savons que le traitement au BCG induit une réponse immunitaire qui est en mesure d'éliminer les tumeurs. Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas totalement compris, on sait que la production d'IL-12, de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  par les MØs et les cellules Th1 est impliquée [153, 155]. Cependant, il fut observé qu'une forte infiltration de TAMs au sein de la tumeur diminuait l'efficacité du traitement [156]. Cela suggère que les TAMs présents au sein de la tumeur affichent un phénotype immunosuppresseur et qu'ils sont en mesure d'empêcher l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

L'IL-10 produite par les MØs M2 pourrait s'avérer un facteur clé impliqué dans l'inhibition de la réponse immunitaire par les MØs. L'IL-10, qui a d'abord été identifiée comme un facteur étant produit par les cellules Th2, est connue pour inhiber la production de cytokines par les MØs et les cellules Th1 [171, 172, 176]. De plus, cette cytokine contribue à l'inhibition de la capacité des MØs et des cellules dendritiques à présenter l'antigène aux cellules T en inhibant l'expression du CMH II chez les cellules présentatrices d'antigène [177, 207]. L'IL-10 est produite spontanément par une grande variété de tumeurs et on croit qu'elle possède un rôle important dans la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale [178]. Au niveau du cancer de la vessie, il fut récemment découvert que l'environnement tumoral était dominé par la présence des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- $\beta$  [179]. Nos résultats confirment que l'ajout d'IL-10 prévient l'inhibition de la prolifération normalement observée dans les co-cultures T24/M1. Fait intéressant, l'IL-10 n'est pas en mesure de prévenir l'inhibition de prolifération des cellules T24 induite par les facteurs solubles des MØs M1, ce qui démontre que l'IL-10 agit sur les MØs M1

en atténuant leur potentiel cytotoxique mais n'affecte pas la résistance des cellules T24 aux facteurs solubles produits par les MØs M1 (Figures 5.4 et 5.5). Contrairement à l'IL-10 seule, l'ensemble des facteurs solubles produit par les MØs M2 étaient en mesure d'induire la résistance des cellules T24 à l'inhibition de la croissance cellulaire induite par les facteurs solubles produits par les MØs M1 (Figure 5.5). Cette résistance pourrait être conférée, du moins en partie, grâce à l'activation de la voie de signalisation p38 MAP-kinase chez les T24 en réponse aux facteurs solubles des MØs M2. La p38 MAP-kinase est associée à une augmentation de la croissance cellulaire dans le cancer de la vessie [208]. Le TGF- $\beta$ , qui est produit par les MØs M2, est connu pour activer la voie de la p38 MAP-kinase [209]. Il serait donc intéressant de vérifier si le TGF- $\beta$  est en mesure d'activer la p38 MAP-kinase chez les cellules T24 et s'il peut induire la résistance des cellules T24 à l'effet cytotoxique des facteurs solubles produits par les MØs M1. Quoiqu'il en soit, nous pouvons conclure que les MØs M2 sont en mesure de protéger les cellules T24 de l'effet des MØs M1, d'une part, en atténuant le potentiel cytotoxique des MØs M1, et d'autre part, en induisant la résistance des cellules T24 à l'effet cytotoxique des MØs M1.

### **6.3 Influence des MØs polarisés sur l'invasion des cellules T24**

On sait que les TAMs favorisent la formation de métastases dans plusieurs types de tumeurs et, tel que décrit au chapitre 2, de nombreux mécanismes par lesquels les MØs peuvent favoriser l'invasion des cellules tumorales ont été décrits dans plusieurs types de tumeurs [99-107]. Dans le cancer de la vessie, malgré le fait qu'il soit connu que la présence de TAMs au sein de l'environnement tumoral est associée à un plus grand potentiel métastatique [51], à notre connaissance, il n'existe aucune étude démontrant que les MØs sont en mesure de favoriser l'invasion des cellules tumorales de la vessie. Nos résultats indiquent que les facteurs solubles produits par les MØs M1 sont en mesure d'augmenter l'invasion des cellules T24 mais pas ceux produits par les MØs M2 (Figure 5.6). Les MØs M1 étant généralement

considérés comme anti-tumoraux alors que les MØs M2 sont considérés comme pro-tumoraux, ce résultat peut sembler quelque peu paradoxal. Cependant, plusieurs facteurs pro-inflammatoires produits par les MØs M1 ont déjà été associés à l'invasion tumorale. C'est notamment le cas du TNF- $\alpha$  [102]. Dans ce contexte, nous avons démontré que la ligation du TNF- $\alpha$  au TNF-R1 est requise pour permettre aux MØs M1 d'induire l'invasion des cellules T24 (Figure 5.7). En accord avec nos résultats, il a été rapporté que la coculture de MØs avec des cellules cancéreuses du sein ou de l'ovaire conduit à une augmentation de l'invasion des cellules tumorales *in vitro* [102, 103]. Dans cette étude, l'addition d'anticorps neutralisant le TNF- $\alpha$  a révélé que l'augmentation de l'invasion était dépendante de ce dernier. Les auteurs ont également démontré que le TNF- $\alpha$  induisait l'invasion des cellules cancéreuses en activant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et en induisant la sécrétion des MMP-2 et MMP-9 [102, 103].

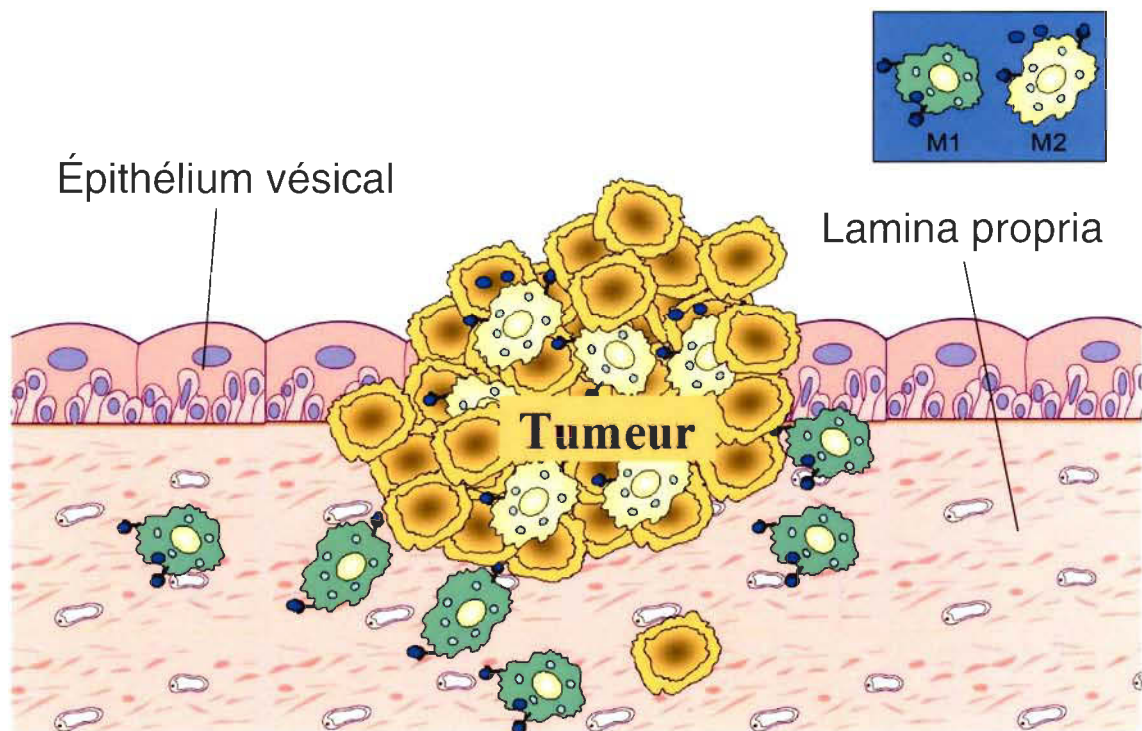
Nous avons également observé que l'invasion induite par les facteurs solubles produits par les MØs M1 est dépendante de l'activation de la voie de signalisation de la PI 3-kinase/Akt (Figure 5.8). En accord avec nos résultats, une étude récente a démontré que l'invasion de plusieurs lignées de cellules cancéreuses de la vessie, incluant les T24, est corrélée à une forte activation d'Akt et du récepteur de l'EGF (EGFR) [173]. En utilisant une approche expérimentale similaire à la nôtre, les auteurs ont montré que l'inhibition de la PI 3-kinase réduit l'invasion des lignées de cancer de la vessie qui expriment le EGFR [173]. Par contre, à notre connaissance, il s'agit de la première fois qu'il est rapporté que l'activation paracrine de la voie de signalisation de la PI 3-kinase/Akt par des MØs pro-inflammatoires est impliquée dans la régulation de l'invasion de cellules tumorales. Pour compléter cette observation, il serait nécessaire de vérifier si l'activation d'Akt est induite par le TNF- $\alpha$ . Il a déjà été observé que le TNF- $\alpha$  est en mesure d'activer Akt dans des lignées cellulaires de cancer du sein [210]. Cela dit, comme il a déjà été rapporté que l'augmentation de l'invasion de cellules cancéreuses par le TNF- $\alpha$  est médié par

le NF- $\kappa$ B [102, 103], il serait également nécessaire de vérifier si l'activation du NF- $\kappa$ B est requise pour permettre l'invasion des cellules T24.

#### 6.4 Conclusion

Pour remplir leurs rôles dans les réponses inflammatoires et immunitaires, les MØs ont la capacité d'adopter différents phénotypes, allant de pro-inflammatoire (M1) à anti-inflammatoire (M2). Alors que les MØs M1 sont plutôt impliqués dans l'initiation de la réponse inflammatoire et de la réponse immunitaire conduisant à l'élimination des pathogènes et des cellules tumorales, les MØs M2 sont impliqués dans l'arrêt de la réponse inflammatoire et de la réparation tissulaire subséquente [58]. Au sein de la majorité des tumeurs, les TAMs sont connus pour faciliter la progression tumorale en stimulant l'angiogénèse, en favorisant la formation des métastases et en supprimant la réponse immunitaire anti-tumorale. Devant ce constat, l'équipe de Mantovani et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que les TAMs, sous l'influence des facteurs présents dans l'environnement tumoral, sont appelés à adopter un phénotype M2 [77]. Plusieurs études ultérieures sont venues appuyer cette idée que les TAMs présentent un phénotype immunorégulateur apparenté aux MØs M2 [160, 211-213]. Dans ce contexte, les résultats de notre étude confirment que les MØs M2 sont en mesure de favoriser la croissance des cellules tumorales du cancer de la vessie, mais surtout, qu'ils sont en mesure de contrecarrer l'effet cytotoxique des MØs M1. Cependant, nous avons également mis en évidence le fait que les MØs M1, normalement considérés comme anti-tumoraux, sont en mesure de favoriser l'invasion des cellules cancéreuses de la vessie, notamment, via l'activation du TNF-R1 et de la voie de signalisation PI 3-kinase/Akt. Bien que les TAMs soient généralement considérés comme étant des MØs M2, certaines évidences laissent croire que les MØs présents à la périphérie de la tumeur présentent un phénotype M1. Cette hypothèse est appuyée par une étude réalisée dans le cadre du cancer de la vessie. Takayama et ses collaborateurs ont évalué l'efficacité du traitement au BCG en

fonction du nombre de TAMs infiltrant la tumeur. Ils ont découvert que lorsque la masse tumorale était fortement infiltrée par les TAMs, le traitement au BCG devenait moins efficace. Par contre, si la lamina propria entourant la tumeur était fortement infiltrée par les TAMs, le traitement au BCG devenait plus efficace. Ces résultats suggèrent que les TAMs présents au sein de la tumeur préviennent la réponse immunitaire induite par le BCG et présentent donc un phénotype immunosuppresseur de type M2. Les TAMs infiltrant la lamina propria pourraient, quant à eux, participer à la réponse immunitaire induite par le BCG et présenteraient un phénotype de type M1 (voir figure 6.2). Les auteurs ont par la suite déterminé que le meilleur moyen d'établir un pronostic fiable était de faire le rapport des TAMs infiltrant la tumeur sur les TAMs infiltrant la lamina propria [156].



**Figure 6.2 : Disposition des TAMs au sein de l'environnement tumoral.** On voit ici la tumeur (cellules tumorales en jaune). Les MØs M2 (jaune pâle) infiltrants la tumeur et les MØs M1 (vert) infiltrants la lamina propria entourant la tumeur.

Ce n'est pas la première étude qui suggère que les MØs présents à la périphérie de la tumeur présentent un phénotype pro-inflammatoire. En effet, une étude réalisée par Klimp et ses associés a montré que les MØs à la périphérie de tumeurs du tractus intestinal, du poumon et du sein exprimaient plus fortement l'enzyme iNOS, ce dernier étant exprimé par les MØs M1 [214]. Suite à ces observations, nos résultats suggèrent que les MØs M1 présents à la périphérie de la tumeur pourraient participer activement au processus de migration et d'invasion des cellules du cancer de la vessie dans la mesure où les MØs M2 sont présents en assez grand nombre au sein de la tumeur pour empêcher l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. À la suite de nos études, il apparaît que l'on pourrait cibler l'IL-10 de façon à inhiber l'effet immunosuppresseur des TAMs, ce qui pourrait augmenter l'efficacité de la thérapie au BCG.

À long terme, une plus grande connaissance des mécanismes conduisant le système immunitaire à favoriser la progression tumorale ou à contribuer à l'élimination de la tumeur pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles et donner naissance à de nouvelles stratégies permettant d'augmenter l'efficacité des traitements déjà existants.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F: A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311(5757):83, 2006.
2. Thomas JK, Goldsby RA, Osborne BA: *Immunologie*. Paris, Dunnod, 2008.
3. Den Otter W, Dullens HF, De Weger RA: Macrophages and antitumor reactions. *Cancer Immunol Immunother* 16(2):67, 1983.
4. Evans R, Alexander P: Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity. *Nature* 228(5272):620, 1970.
5. Elnemr A, Ohta T, Yachie A, al. e: N-ethylmaleimide-enhanced phosphatidylserine externalization of human pancreatic cancer cells and immediate phosphatidylserine-mediated phagocytosis by macrophages. *Int J Oncol* 16(6):1111, 2000.
6. Ichii SI, Y. Irimura, T.: Initial steps in lymph node metastasis formation in an experimental system: possible involvement of recognition by macrophage C-type lectins. *cancer Immunol Immunother* 49(1):1, 2000.
7. Sakamaki T, Imai Y, Irimura T: Enhancement in accessibility to macrophages by modification of mucin-type carbohydrate chains on a tumor cell line: role of a C-type lectin of macrophages. *J Leukoc Biol* 57(3):407, 1995.
8. Takano R, Nose M, Kanno H, Nishihira T, Hiraizumi S, Kobata A, Kyogoku M: Recognition of N-glycosidic carbohydrates on esophageal carcinoma cells by macrophage cell line THP-1. *Am J Pathol* 137(2):393, 1990.
9. Jeong JYJ, D. M.: Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Immunol* 158(10):4901, 1997.
10. Decker T, Lohmann-Matthes ML, Gifford GE: Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol* 138(3):957, 1987.
11. Monastra G, Cabrelle A, Zambon A, Rosato A, Macino B, Collavo D, Zanovello P: Membrane form of TNF alpha induces both cell lysis and apoptosis in susceptible target cells. *Cell Immunol* 171(1):102, 1996.
12. Balkwill F: Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9(5):361, 2009.

13. Tartaglia LA, Goeddel DV: Two TNF receptors. *Immunol Today* 13(5):151, 1992.
14. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV: A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *cell* 74(5):845, 1993.
15. Gaur U, Aggarwal BB: Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66(8):1403, 2003.
16. Luo JL, Kamata H, Karin M: IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 115(10):2625, 2005.
17. Andera L: Signaling activated by the death receptors of the TNFR family. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 153(3):173, 2009.
18. Balkwill FR, Lee A, Aldam G, Moodie E, Thomas JA, Tavernier J, Fiers W: Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer Res* 46(8):3990, 1986.
19. Brouckaert PG, Leroux-Roels GG, Guisez Y, Tavernier J, Fiers W: In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma. *Int J Cancer* 38(5):763, 1986.
20. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV: Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312(5996):724, 1984.
21. Talmadge JE, Phillips H, Schneider M, Rowe T, Pennington R, Bowersox O, Lenz B: Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 48(3):544, 1988.
22. Nawroth P, Handley D, Matsueda G, De Waal R, Gerlach H, Blohm D, Stern D: Tumor necrosis factor/cachectin-induced intravascular fibrin formation in meth A fibrosarcomas. *J Exp Med* 168(2):637, 1988.
23. Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, Sone H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I: Synergistic cytotoxic and antitumor effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia. *Cancer Res* 48(3):650, 1988.
24. Weigert A, Brune B: Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide* 19(2):95, 2008.

25. Drapier JC, Hibbs JB, Jr.: Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 140(8):2829, 1988.
26. Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Guissani A: EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *Faseb J* 7(12):1124, 1993.
27. Kroncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun* 200(2):1105, 1994.
28. Richter C, Gogvadze V, Schlapbach R, Schweizer M, Schlegel J: Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 205(2):1143, 1994.
29. Brune B: Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ* 10(8):864, 2003.
30. Brune B: The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxid Redox Signal* 7(3-4):497, 2005.
31. Li CQ, Wogan GN: Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett* 226(1):1, 2005.
32. Tendler DS, Bao C, Wang T, Huang EL, Ratovitski EA, Pardoll DA, Lowenstein CJ: Intersection of interferon and hypoxia signal transduction pathways in nitric oxide-induced tumor apoptosis. *Cancer Res* 61(9):3682, 2001.
33. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC: Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 3(4):276, 2003.
34. MacMicking J, Xie QW, Nathan C: Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323, 1997.
35. Jonjic N, Alberti S, Bernasconi S, Peri G, Jilek P, Anichini A, Parmiani G, Mantovani A: Heterogeneous susceptibility of human melanoma clones to monocyte cytotoxicity: role of ICAM-1 defined by antibody blocking and gene transfer. *Eur J Immunol* 22(9):2255, 1992.
36. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T: A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 44(2):143, 2002.

37. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA: Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 189(8):1343, 1999.
38. Whiteside TL: The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment. *Immunol Invest* 36(1):25, 2007.
39. Okubo A, Sone S, Tanaka M, Ogura T: Membrane-associated interleukin 1 alpha as a mediator of tumor cell killing by human blood monocytes fixed with paraformaldehyde. *Cancer Res* 49(2):265, 1989.
40. Kawase I, Komuta K, Ogura T, Fujiwara H, Hamaoka T, Kishimoto S: Murine tumor cell lysis by antibody-dependent macrophage-mediated cytotoxicity using syngeneic monoclonal antibodies. *Cancer Res* 45(4):1663, 1985.
41. Johnson WJ, Steplewski Z, Matthews TJ, Hamilton TA, Koprowski H, Adams DO: Cytolytic interactions between murine macrophages, tumor cells, and monoclonal antibodies: characterization of lytic conditions and requirements for effector activation. *J Immunol* 136(12):4704, 1986.
42. Pullyblank AM, Guillou PJ, Monson JR: Interleukin 1 and tumour necrosis factor alpha may be responsible for the lytic mechanism during anti-tumour antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Br J Cancer* 72(3):601, 1995.
43. Leu RW, Zhou AQ, Kennedy MJ, Shannon BJ: Exogenous C1q reconstitutes a secondary deficiency of C5-deficient AKR mouse macrophages for FcR-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis. *J Immunol* 146(4):1233, 1991.
44. Qi CF, Nieroda C, De Filippi R, Greiner JW, Correale P, Schlom J, Tsang KY: Macrophage colony-stimulating factor enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity against human colon carcinoma cells. *Immunol Lett* 47(1-2):15, 1995.
45. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR: Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83(2):435, 1994.
46. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, Sotto JJ, Leroux D, Bensa JC, Plumas J: In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101(3):949, 2003.
47. Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R: High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res* 13(5):1472, 2007.

48. Ohno S, Inagawa H, Dhar DK, Fujii T, Ueda S, Tachibana M, Suzuki N, Inoue M, Soma G, Nagasue N: The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients. *Anticancer Res* 23(6D):5015, 2003.
49. Talmadge JE, Donkor M, Scholar E: Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev* 26(3-4):373, 2007.
50. Hamada I, Kato M, Yamasaki T, Iwabuchi K, Watanabe T, Yamada T, Itoyama S, Ito H, Okada K: Clinical effects of tumor-associated macrophages and dendritic cells on renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 22(6C):4281, 2002.
51. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, Nomura T, Nasu N, Nomura Y: Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int J Urol* 7(7):263, 2000.
52. Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L, Bergh A: Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol* 17(3):445, 2000.
53. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M: Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Res* 24(5C):3335, 2004.
54. Salvesen HB, Akslen LA: Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 84(5):538, 1999.
55. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S: Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep* 14(2):425, 2005.
56. Gordon IO, Freedman RS: Defective antitumor function of monocyte-derived macrophages from epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 12(5):1515, 2006.
57. Nathan C: Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Inst Mitt* (88):200, 1991.
58. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25(12):677, 2004.
59. Anderson CF, Mosser DM: Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* 168(8):3697, 2002.

60. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA: Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 167(11):6533, 2001.
61. Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS: Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 204(1):19, 2000.
62. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L: The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 13(7):265, 1992.
63. Bottazzi B, Polentarutti N, Acero R, Balsari A, Boraschi D, Ghezzi P, Salmona M, Mantovani A: Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science* 220(4593):210, 1983.
64. Bottazzi B, Walter S, Govoni D, Colotta F, Mantovani A: Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *J Immunol* 148(4):1280, 1992.
65. Gu L, Tseng SC, Rollins BJ: Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol* 72:7, 1999.
66. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A: Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7(3):211, 2005.
67. Coussens LM, Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860, 2002.
68. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegue E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G: HIF1 $\alpha$  induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13(3):206, 2008.
69. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P: Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 131(3):463, 2007.
70. Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, Jugold M, Kiessling F, Heil M, Tchaikovski V, Waltenberger J, Shibuya M, Plate KH, Machein MR: Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth in vivo. *Cancer Res* 68(18):7342, 2008.

71. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW: Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193(6):727, 2001.
72. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE: Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104(8):2224, 2004.
73. Wu Y, Li YY, Matsushima K, Baba T, Mukaida N: CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. *J Immunol* 181(9):6384, 2008.
74. Balkwill F: Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4(7):540, 2004.
75. Pollard JW: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4(1):71, 2004.
76. Martin-Manso G, Galli S, Ridnour LA, Tsokos M, Wink DA, Roberts DD: Thrombospondin 1 promotes tumor macrophage recruitment and enhances tumor cell cytotoxicity of differentiated U937 cells. *Cancer Res* 68(17):7090, 2008.
77. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A: Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23(11):549, 2002.
78. Sica A, Sacconi A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van Damme J, Mantovani A: Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 164(2):762, 2000.
79. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE: Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 79(5-6):991, 1999.
80. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL: Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 56(20):4625, 1996.
81. Li C, Shintani S, Terakado N, Nakashiro K, Hamakawa H: Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 9(6):1219, 2002.
82. Lin EY, Gouon-Evans V, Nguyen AV, Pollard JW: The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7(2):147, 2002.



83. Onita T, Ji PG, Xuan JW, Sakai H, Kanetake H, Maxwell PH, Fong GH, Gabril MY, Moussa M, Chin JL: Hypoxia-induced, perinecrotic expression of endothelial Per-ARNT-Sim domain protein-1/hypoxia-inducible factor-2alpha correlates with tumor progression, vascularization, and focal macrophage infiltration in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 8(2):471, 2002.
84. Takanami I, Takeuchi K, Kodaira S: Tumor-associated macrophage infiltration in pulmonary adenocarcinoma: association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncology* 57(2):138, 1999.
85. Valkovic T, Dobrila F, Melato M, Sasso F, Rizzardi C, Jonjic N: Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch* 440(6):583, 2002.
86. Hildenbrand R, Jansen C, Wolf G, Bohme B, Berger S, von Minckwitz G, Horlin A, Kaufmann M, Stutte HJ: Transforming growth factor-beta stimulates urokinase expression in tumor-associated macrophages of the breast. *Lab Invest* 78(1):59, 1998.
87. Leek RD, Talks KL, Pezzella F, Turley H, Campo L, Brown NS, Bicknell R, Taylor M, Gatter KC, Harris AL: Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer Res* 62(5):1326, 2002.
88. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE: Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* 192(2):150, 2000.
89. Sivridis E, Giatromanolaki A, Papadopoulos I, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI: Thymidine phosphorylase expression in normal, hyperplastic and neoplastic prostates: correlation with tumour associated macrophages, infiltrating lymphocytes, and angiogenesis. *Br J Cancer* 86(9):1465, 2002.
90. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, Qian H, Xue XN, Pollard JW: Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 66(23):11238, 2006.
91. Aharinejad S, Sioud M, Lucas T, Abraham D: Target validation using RNA interference in solid tumors. *Methods Mol Biol* 361:227, 2007.
92. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z: MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103(3):481, 2000.



93. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D: Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33):12493, 2006.
94. Shojaei F, Singh M, Thompson JD, Ferrara N: Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7):2640, 2008.
95. Gorelik E, Wiltrout RH, Brunda MJ, Holden HT, Herberman RB: Augmentation of metastasis formation by thioglycollate-elicited macrophages. *Int J Cancer* 29(5):575, 1982.
96. Rolny C, Capparuccia L, Casazza A, Mazzone M, Vallario A, Cignetti A, Medico E, Carmeliet P, Comoglio PM, Tamagnone L: The tumor suppressor semaphorin 3B triggers a prometastatic program mediated by interleukin 8 and the tumor microenvironment. *J Exp Med* 205(5):1155, 2008.
97. Miselis NR, Wu ZJ, Van Rooijen N, Kane AB: Targeting tumor-associated macrophages in an orthotopic murine model of diffuse malignant mesothelioma. *Mol Cancer Ther* 7(4):788, 2008.
98. Oosterling SJ, van der Bij GJ, Meijer GA, Tuk CW, van Garderen E, van Rooijen N, Meijer S, van der Sijp JR, Beelen RH, van Egmond M: Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model. *J Pathol* 207(2):147, 2005.
99. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, Stanley ER, Segall JE, Condeelis JS: Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* 65(12):5278, 2005.
100. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J: A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64(19):7022, 2004.
101. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, Segall JE, Pollard JW, Condeelis J: Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 67(6):2649, 2007.
102. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C: Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25(8):1543, 2004.

103. Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C, Balkwill FR: Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J Immunol* 175(2):1197, 2005.
104. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M: MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2(4):289, 2002.
105. Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, Lewis CE: Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* 163(4):1233, 2003.
106. Luo JL, Tan W, Ricono JM, Korchynskiy O, Zhang M, Gonias SL, Cheresch DA, Karin M: Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Masp1. *Nature* 446(7136):690, 2007.
107. Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B, Shirai T, Matrisian LM, Futakuchi M: MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* 7(5):485, 2005.
108. Gordon S: Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3(1):23, 2003.
109. Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5(12):953, 2005.
110. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A: IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 28(1):359, 1998.
111. Bak SP, Alonso A, Turk MJ, Berwin B: Murine ovarian cancer vascular leukocytes require arginase-1 activity for T cell suppression. *Mol Immunol* 46(2):258, 2008.
112. Kusmartsev S, Gabrilovich DI: STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol* 174(8):4880, 2005.
113. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC: L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109(4):1568, 2007.

114. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quiceno DG, Ochoa JB, Ochoa AC: L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol* 171(3):1232, 2003.
115. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S: Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res* 65(24):11743, 2005.
116. Zea AH, Rodriguez PC, Culotta KS, Hernandez CP, DeSalvo J, Ochoa JB, Park HJ, Zabaleta J, Ochoa AC: L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cell Immunol* 232(1-2):21, 2004.
117. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Biccato S, Bronte V: Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* 116(10):2777, 2006.
118. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, Brumlik M, Cheng P, Curiel T, Myers L, Lackner A, Alvarez X, Ochoa A, Chen L, Zou W: B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 203(4):871, 2006.
119. Kryczek I, Wei S, Zhu G, Myers L, Mottram P, Cheng P, Chen L, Coukos G, Zou W: Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 67(18):8900, 2007.
120. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10(9):942, 2004.
121. Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, Nelli EE, Bastaki M, Molinari-Tosatti MP, Bonardi F, Parolini S, Albin A, Morbidelli L, Ziche M, Corallini A, Possati L, Vacca A, Ribatti D, Presta M: Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth Differ* 7(2):147, 1996.
122. Moran CJ, Arenberg DA, Huang CC, Giordano TJ, Thomas DG, Misek DE, Chen G, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash S, Beer DG: RANTES expression is a predictor of survival in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 8(12):3803, 2002.

123. Robinson SC, Scott KA, Wilson JL, Thompson RG, Proudfoot AE, Balkwill FR: A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res* 63(23):8360, 2003.
124. Ben-Baruch A: The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 25(3):357, 2006.
125. Luster AD, Leder P: IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 178(3):1057, 1993.
126. de la Cruz-Merino L, Grande-Pulido E, Albero-Tamarit A, Codes-Manuel de Villena ME: Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges. *Oncologist* 13(12):1246, 2008.
127. Song X, Voronov E, Dvorkin T, Fima E, Cagnano E, Benharroch D, Shendler Y, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, Apte RN: Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J Immunol* 171(12):6448, 2003.
128. Li Z, Chen L, Qin Z: Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cell Mol Immunol* 6(6):415, 2009.
129. Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S, Baccarani M, Lemoli RM: Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 100(1):230, 2002.
130. Feijoo E, Alfaro C, Mazzolini G, Serra P, Penuelas I, Arina A, Huarte E, Tirapu I, Palencia B, Murillo O, Ruiz J, Sangro B, Richter JA, Prieto J, Melero I: Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. *Int J Cancer* 116(2):275, 2005.
131. Lin Y, Huang R, Chen L, Li S, Shi Q, Jordan C, Huang RP: Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *Int J Cancer* 109(4):507, 2004.
132. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ: Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res* 54(12):3242, 1994.
133. Belardelli F, Ferrantini M: Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* 23(4):201, 2002.
134. Tsung K, Dolan JP, Tsung YL, Norton JA: Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Res* 62(17):5069, 2002.
135. Kanai T, Watanabe M, Hayashi A, Nakazawa A, Yajima T, Okazawa A, Yamazaki M, Ishii H, Hibi T: Regulatory effect of interleukin-4 and

- interleukin-13 on colon cancer cell adhesion. *Br J Cancer* 82(10):1717, 2000.
136. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, et al.: Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 362(6417):248, 1993.
  137. Skinnider BF, Kapp U, Mak TW: Interleukin 13: a growth factor in hodgkin lymphoma. *Int Arch Allergy Immunol* 126(4):267, 2001.
  138. Menetrier-Caux C, Thomachot MC, Alberti L, Montmain G, Blay JY: IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells. *Cancer Res* 61(7):3096, 2001.
  139. Mroczko B, Groblewska M, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Okulczyk B, Kedra B, Laszewicz W, Dabrowski A, Szmitkowski M: Serum macrophage-colony stimulating factor levels in colorectal cancer patients correlate with lymph node metastasis and poor prognosis. *Clin Chim Acta* 380(1-2):208, 2007.
  140. Gotzmann J, Fischer AN, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H, Jechlinger M, Waerner T, Weith A, Beug H, Mikulits W: A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene* 25(22):3170, 2006.
  141. Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, Lohela M, Wiig H, Salven P, Pajusola K, Eriksson U, Alitalo K: PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood* 104(10):3198, 2004.
  142. Tian M, Schiemann WP: The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Future Oncol* 5(2):259, 2009.
  143. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF: Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12(3-4):303, 1993.
  144. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55(18):3964, 1995.
  145. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P: L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol* 24(6):302, 2003.
  146. Chang CI, Liao JC, Kuo L: Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res* 61(3):1100, 2001.

147. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM, Antonia S, Ochoa JB, Ochoa AC: Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 64(16):5839, 2004.
148. Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A: Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 33(7):708, 2002.
149. Tang TC, Poon RT, Lau CP, Xie D, Fan ST: Tumor cyclooxygenase-2 levels correlate with tumor invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 11(13):1896, 2005.
150. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN: Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7):3336, 1997.
151. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS: Bladder cancer. *Lancet* 374(9685):239, 2009.
152. Rubben H, Lutzeyer W, Fischer N, Deutz F, Lagrange W, Giani G: Natural history and treatment of low and high risk superficial bladder tumors. *J Urol* 139(2):283, 1988.
153. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K: BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 353(9165):1689, 1999.
154. Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ: T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol* 150(3):1018, 1993.
155. O'Donnell MA, Luo Y, Chen X, Szilvasi A, Hunter SE, Clinton SK: Role of IL-12 in the induction and potentiation of IFN-gamma in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol* 163(8):4246, 1999.
156. Takayama H, Nishimura K, Tsujimura A, Nakai Y, Nakayama M, Aozasa K, Okuyama A, Nonomura N: Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation. *J Urol* 181(4):1894, 2009.
157. Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Takahashi M, Shinya E, Nishimura T, Takahashi H: A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 58(8):1245, 2009.



158. Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J: Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods* 288(1-2):123, 2004.
159. Witmer-Pack MD, Hughes DA, Schuler G, Lawson L, McWilliam A, Inaba K, Steinman RM, Gordon S: Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J Cell Sci* 104 ( Pt 4):1021, 1993.
160. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P: Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42(6):717, 2006.
161. Mantovani A, Sica A, Locati M: Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23(4):344, 2005.
162. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J: Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175(1):342, 2005.
163. Stout RD, Suttles J: Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 76(3):509, 2004.
164. Condeelis J, Pollard JW: Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124(2):263, 2006.
165. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE: The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196(3):254, 2002.
166. Jakse G, Hall R, Bono A, Holtl W, Carpentier P, Spaander JP, van der Meijden AP, Sylvester R: Intravesical BCG in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder: long-term results of EORTC GU Group phase II protocol 30861. *Eur Urol* 40(2):144, 2001.
167. Schamhart DH, de Boer EC, de Reijke TM, Kurth K: Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. *Eur Urol* 37 Suppl 3:16, 2000.
168. Luo Y, Chen X, O'Donnell MA: Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN-gamma production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. *Cytokine* 21(1):17, 2003.
169. Ayari C, LaRue H, Hovington H, Decobert M, Harel F, Bergeron A, Tetu B, Lacombe L, Fradet Y: Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells

and macrophages as predictors of response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Eur Urol* 55(6):1386, 2009.

170. Reyes-Moreno C, Girouard J, Lapointe R, Darveau A, Mourad W: CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes. *J Biol Chem* 279(9):7799, 2004.
171. Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P: Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med* 184(1):51, 1996.
172. Clarke CJ, Hales A, Hunt A, Foxwell BM: IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. *Eur J Immunol* 28(5):1719, 1998.
173. Wallerand H, Cai Y, Wainberg ZA, Garraway I, Lascombe I, Nicolle G, Thiery JP, Bittard H, Radvanyi F, Reiter RR: Phospho-Akt pathway activation and inhibition depends on N-cadherin or phospho-EGFR expression in invasive human bladder cancer cell lines(). *Urol Oncol*, 2008.
174. Toker A Y-LM: AKT signaling and cancer: Surviving but not moving on. *Cancer Res* 66 (8):3963, 2006.
175. Agarwal A, Verma S, Burra U, Murthy NS, Mohanty NK, Saxena S: Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer Immunol Immunother* 55(6):734, 2006.
176. Becker JC, Czerny C, Brocker EB: Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10. *Int Immunol* 6(10):1605, 1994.
177. Luscher U, Figueira L, Juretic A, Zuber M, Luscher NJ, Heberer M, Spagnoli GC: The pattern of cytokine gene expression in freshly excised human metastatic melanoma suggests a state of reversible anergy of tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 57(4):612, 1994.
178. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY: The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 18(10):493, 1997.
179. Loskog A, Ninalga C, Paul-Wetterberg G, de la Torre M, Malmstrom PU, Totterman TH: Human bladder carcinoma is dominated by T-regulatory cells and Th1 inhibitory cytokines. *J Urol* 177(1):353, 2007.
180. Old LJ: Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230(4726):630, 1985.



181. Van Themsche C, Lafontaine L, Asselin E: X-linked inhibitor of apoptosis protein levels and protein kinase C activity regulate the sensitivity of human endometrial carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Endocrinology* 149(8):3789, 2008.
182. Gao XD, Chen YR: Inhibition of telomerase with human telomerase reverse transcriptase antisense enhances tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in bladder cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 120(9):755, 2007.
183. Dumont P, Berton A, Nagy N, Sandras F, Tinton S, Demetter P, Mascart F, Allaoui A, Decaestecker C, Salmon I: Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer. *Lab Invest* 88(8):896, 2008.
184. Patsialou A, Wyckoff J, Wang Y, Goswami S, Stanley ER, Condeelis JS: Invasion of Human Breast Cancer Cells In vivo Requires Both Paracrine and Autocrine Loops Involving the Colony-Stimulating Factor-1 Receptor. *Cancer Res*, 2009.
185. Song G, Ouyang G, Mao Y, Ming Y, Bao S, Hu T: Osteopontin promotes gastric cancer metastasis by augmenting cell survival and invasion through Akt-mediated HIF-1alpha up-regulation and MMP9 activation. *J Cell Mol Med*, 2008.
186. Sun B, Nishihira J, Yoshiki T, Kondo M, Sato Y, Sasaki F, Todo S: Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor invasion and metastasis via the Rho-dependent pathway. *Clin Cancer Res* 11(3):1050, 2005.
187. Weldon CB, Parker AP, Patten D, Elliott S, Tang Y, Frigo DE, Dugan CM, Coakley EL, Butler NN, Clayton JL, Alam J, Curiel TJ, Beckman BS, Jaffe BM, Burow ME: Sensitization of apoptotically-resistant breast carcinoma cells to TNF and TRAIL by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Int J Oncol* 24(6):1473, 2004.
188. Ricote M, Garcia-Tunon I, Fraile B, Fernandez C, Aller P, Paniagua R, Royuela M: P38 MAPK protects against TNF-alpha-provoked apoptosis in LNCaP prostatic cancer cells. *Apoptosis* 11(11):1969, 2006.
189. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL: The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41(16):2502, 2005.
190. Li S, Takeuchi F, Wang JA, Fuller C, Pacheco-Rodriguez G, Moss J, Darling TN: MCP-1 overexpressed in tuberous sclerosis lesions acts as a paracrine factor for tumor development. *J Exp Med* 202(5):617, 2005.
191. Waugh DJ, Wilson C: The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14(21):6735, 2008.

192. Chitu V, Stanley ER: Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 18(1):39, 2006.
193. Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER: Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99(1):111, 2002.
194. Whitelaw DM: Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet* 5(4):311, 1972.
195. Kim DJ, Park C, Oh B, Kim YY: Association of TRAF2 with the short form of cellular FLICE-like inhibitory protein prevents TNFR1-mediated apoptosis. *J Mol Signal* 3:2, 2008.
196. Beg AA, Baltimore D: An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274(5288):782, 1996.
197. Ashkenazi A: Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 19(3-4):325, 2008.
198. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH: Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7(12):1166, 2000.
199. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ: tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14(16):2060, 2000.
200. Oka N, Tanimoto S, Taue R, Nakatsuji H, Kishimoto T, Izaki H, Fukumori T, Takahashi M, Nishitani M, Kanayama HO: Role of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in bladder cancer cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci* 97(10):1093, 2006.
201. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2):231, 1997.
202. Hinata N, Shirakawa T, Zhang Z, Matsumoto A, Fujisawa M, Okada H, Kamidono S, Gotoh A: Radiation induces p53-dependent cell apoptosis in bladder cancer cells with wild-type- p53 but not in p53-mutated bladder cancer cells. *Urol Res* 31(6):387, 2003.
203. Speidel D: Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol* 20(1):14.

204. Nagane M, Huang HJ, Cavenee WK: The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* 6(3):191, 2001.
205. Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G: NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle* 3(12):1524, 2004.
206. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, Sica A: Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 214(9-10):761, 2009.
207. Chan LL, Cheung BK, Li JC, Lau AS: A role for STAT3 and cathepsin S in IL-10 down-regulation of IFN- $\gamma$ -induced MHC class II molecule on primary human blood macrophages. *J Leukoc Biol*.
208. Kumar B, Sinclair J, Khandrika L, Koul S, Wilson S, Koul HK: Differential effects of MAPKs signaling on the growth of invasive bladder cancer cells. *Int J Oncol* 34(6):1557, 2009.
209. Galliher AJ, Schiemann WP: Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res* 67(8):3752, 2007.
210. Rivas MA, Carnevale RP, Proietti CJ, Rosemblyt C, Beguelin W, Salatino M, Charreau EH, Frahm I, Sapia S, Brouckaert P, Elizalde PV, Schillaci R: TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. *Exp Cell Res* 314(3):509, 2008.
211. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A: A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107(5):2112, 2006.
212. Mantovani A, Allavena P, Sica A: Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* 40(11):1660, 2004.
213. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A: Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18(5):349, 2008.
214. Klimp AH, Hollema H, Kempinga C, van der Zee AG, de Vries EG, Daemen T: Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer Res* 61(19):7305, 2001.