

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
GENEVIÈVE DUMAS

ACTIVATION DU RÉCEPTEUR CD40 CHEZ LES MACROPHAGES :
IMPLICATION DANS LA SURVIE ET L'INVASION DES
CELLULES CANCÉREUSES DE L'ENDOMÈTRE

SEPTEMBRE 2013

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 m'ont aidée et supportée au cours de ce projet. Particulièrement, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Carlos Reyes-Moreno, pour son support, ses idées et ses encouragements tout au long de mes études à la maîtrise. Je remercie également toute l'équipe du professeur Éric Asselin pour leurs conseils, leur temps et l'utilisation de leurs équipements durant toute la durée du projet. Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont travaillé avec moi au sein du laboratoire du professeur Reyes-Moreno pour leur soutien moral et technique ou encore pour l'ambiance stimulante qui était présente au sein de l'équipe.

Finalement, je voudrais remercier ma famille, rapprochée et élargie, pour son soutien, son intérêt et ses encouragements tout au long de mes études à la maîtrise, et ce, jusqu'au dépôt du présent mémoire.

RÉSUMÉ

Par le biais de l'infiltration de cellules immunitaires au sein des tumeurs solides, le système immunitaire est reconnu pour affecter le développement tumoral soit en éliminant la tumeur ou en promouvant son développement. Les macrophages sont capables d'éliminer les cellules cancéreuses mais, dans la plupart des cas, leurs fonctions pro-tumorales sont dominantes. Nos résultats précédents ont par ailleurs montré que les macrophages pro-inflammatoires M1 possédaient des activités à la fois pro- et anticancéreuses. Par contre, les macrophages anti-inflammatoires M2 sont strictement pro-tumoraux. Mieux comprendre les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires permettrait le développement et l'amélioration de l'immunothérapie. Une cible potentielle pour l'immunothérapie est le récepteur CD40, un récepteur présent entre autre à la surface des macrophages. Des études ont montré que l'activation du récepteur CD40 dans le système immunitaire pouvait induire une réponse antitumorale, mais aussi induire des fonctions immunosuppressives protumorales. Dans le cas du cancer de l'endomètre, l'efficacité thérapeutique visant l'activation du récepteur CD40 n'a pas encore été démontrée. Notre hypothèse de recherche est que l'activation du récepteur CD40 pourrait, d'une part, augmenter les fonctions antitumorales des macrophages M1 et, d'autre part, diminuer les fonctions protumorales des macrophages M1 et M2. Ainsi, l'objectif principal de l'étude était de déterminer si les macrophages pouvaient exercer une influence sur le cancer de l'endomètre en réponse à l'activation du récepteur CD40. Pour ce faire, un modèle de macrophages pro-inflammatoires et anti-inflammatoires a été développé et caractérisé. Ensuite, les rôles des macrophages activés via le récepteur CD40 ont été déterminés. Premièrement, un modèle *in vivo* de xénogreffes sous-cutanées du cancer de l'endomètre a été utilisé afin de vérifier si les macrophages différenciés pouvaient influencer le développement des tumeurs. Deuxièmement, des études *in vitro* ont été réalisées afin de déterminer si les macrophages pouvaient affecter la viabilité et l'invasion des cellules cancéreuses. Finalement, les mécanismes intracellulaires impliqués ont été étudiés, plus précisément la voie de signalisation de la PI3K/Akt. *In vivo*, les macrophages pro-inflammatoires activés par le récepteur CD40 entraînent une diminution de la taille des tumeurs, tandis que les macrophages anti-inflammatoires activés par le récepteur CD40 augmentent leur taille. *In vitro*, les résultats sont similaires à ceux obtenus *in vivo*. De plus, les macrophages pro-inflammatoires augmentent de façon importante l'invasion des cellules cancéreuses moins susceptibles à l'apoptose, ce qui pourrait augmenter le potentiel invasif de ces dernières. Ces effets sont amplifiés lorsque le récepteur CD40 est activé dans les macrophages pro-inflammatoires. Les résultats obtenus montrent que l'activation du récepteur CD40 dans les macrophages a des effets dualitaires sur le cancer de l'endomètre. Au meilleur de nos connaissances, l'étude présentée est la première qui montre les effets différentiels des macrophages activés par CD40 sur la croissance, la survie et l'invasion des cellules cancéreuses de l'endomètre.

Mots-clés : macrophages, cancer de l'endomètre, récepteur CD40, immunothérapie, interactions tumeur-stroma

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer de l'endomètre.....	1
1.1.1 Incidence et prise en charge.....	1
1.1.2 L'immunothérapie comme traitement potentiel du cancer de l'endomètre	2
1.2 Les rôles du système immunitaire dans la progression tumorale	4
1.2.1 L'immunosurveillance des tumeurs.....	4
1.2.2 L'évasion du système immunitaire	6
1.3 Les macrophages et la progression tumorale.....	8
1.3.1 Différenciation des macrophages.....	8
1.3.2 Polarisation des macrophages	9
1.3.2.1 Les macrophages pro-inflammatoires de type 1	10
1.3.2.2 Les macrophages anti-inflammatoires de type 2	11
1.3.3 Les macrophages associés à la tumeur	11
1.3.4 Rôles anti-tumoraux des macrophages	13
1.3.5 La progression de la polarisation des TAM.....	15
1.4 Le système CD40/CD40L	18
1.4.1 Le récepteur CD40 et son activation.....	18
1.4.2 L'activation du CD40 chez les macrophages	20
1.4.3 Le CD40 et le cancer	22
1.4.3.1 L'expression de CD40 sur les cellules cancéreuses	22
1.4.3.2 Le récepteur CD40 et la réponse anti-tumorale.....	22
1.4.3.3 Régulation de la survie des cellules cancéreuses par CD40/CD40L.....	23

1.4.3.4 L'impact de l'interaction CD40-CD40L sur la progression tumorale	24
CHAPITRE II	
PROJET DE RECHERCHE.....	30
2.1 Rappel du contexte	30
2.2 Ligne directrice et objectifs du projet de recherche.....	31
2.3 Méthodologie.....	32
CHAPITRE III	
CD40 PATHWAY ACTIVATION REVEALS DUAL FUNCTION FOR MACROPHAGES IN HUMAN ENDOMETRIAL CANCER CELL SURVIVAL AND INVASION	33
3.1 Contribution des auteurs.....	33
3.2 Résumé de l'article	33
3.3 Article	35
Abstract.....	35
Introduction	36
Material and Methods	38
Reagents, antibodies and chemicals.....	38
Monocyte-to-macrophage differentiation and activation	38
<i>In vitro</i> activation of tumor cells by polarized macrophages.....	39
Total RNA extraction and RT-PCR analyses	39
<i>In vivo</i> activation of tumor cells by polarized macrophages	39
Statistical analysis.....	40
Results	41
Polarized THP-1 cell is a valuable model of both type-1 and type-2 Mφs.....	41
Tumor cell growth is differentially influenced by polarized Mφs.....	41
CD40-activated Mφ-1 enhance invasiveness and gene expression in tumor cells.....	41
CD40-activated Mφ-1 increases invasiveness of tumor cells less susceptible to caspase-3 mediated apoptosis	42
IFN-γ is minimally required for CD40-activated Mφ-1 to promote tumor cell invasion.....	43

Macrophage-mediated tumor cell invasion involves PI3K/Akt2 signaling pathway	44
Discussion.....	44
Acknowledgments	48
Conflict of interest.....	48
References	49
Figure captions	54
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	63
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	74

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	La polarisation des macrophages en M ϕ -1 et M ϕ -2	10
1.2	Les macrophages et la progression tumorale	14
1.3	La polarisation des macrophages et la progression tumorale	17
1.4	Rôle du système CD40/CD40L dans l'activation du système immunitaire ..	20
1.5	Rôle de la force du signal dans le système CD40/CD40L.....	26
1.6	Le système CD40/CD40L et la présence d'IL-10.....	27
4.1	Effets immunologiques de la chimiothérapie	71

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADCC	<i>Antibody-dependant cellular cytotoxicity</i>
Akt	Protéine kinase B
CCL	Chémiokine de type CC
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD14	Récepteur du LPS
CD40L	Ligand du CD40
CD40/M ϕ -1	M ϕ -1 activé via CD40
CD40/M ϕ -2	M ϕ -2 activé via CD40
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FasL	<i>Apoptosis antigen 1 ligand</i>
HSP	Protéine de choc thermique
IFN	Interféron
IL	Interleukine
iNOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
Jak	Janus kinase
LPS	Lipopolysaccharide
M ϕ s	Macrophages
M ϕ -1	Macrophage pro-inflammatoire de type 1
M ϕ -2	Macrophage pro-inflammatoire de type 2
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MDCS	Cellule myéloïde suppressive
MIP	Protéine inflammatoire des macrophages
MMP	Métalloprotéase matricielle

MTC	<i>Macrophage-mediated tumor cytotoxicity</i>
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
NKs	Cellules tueuses naturelles
NO	Oxyde nitrique
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PI3-K	<i>Phosphoinositide 3 kinase</i>
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
shRNA	<i>Small hairpin ribonucleic acid</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TAM	Macrophages associés à la tumeur
TC	Lymphocytes T cytotoxiques
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Facteur de nécrose tumoral
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
ROI	Espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR	Transcription inverse et la réaction en chaîne par polymérase
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer de l'endomètre

1.1.1 Incidence et prise en charge

Le cancer de l'endomètre est au quatrième rang des cancers féminins les plus fréquents, représentant environ 6-10 % des cancers chez la femme [1, 2]. Ce type de cancer gynécologique touche environ 4 700 femmes par an au Canada (Statistiques canadiennes sur le cancer 2011). Seulement 5 % de nouveaux cas sont diagnostiqués avant l'âge de 40 ans et donc, il survient le plus souvent après la ménopause. Le traitement le plus utilisé pour traiter le cancer de l'endomètre est l'hystérectomie soit conservatrice ou totale, avec retrait des deux ovaires et des deux trompes de Fallope [1, 2]. Dans certains cas, par exemple chez les femmes préménopausées, la thérapie dite conservatrice peut être utilisée [1, 2]. Cette forme de thérapie vise à maintenir le système reproducteur de la patiente intact, ce qui lui permettra éventuellement d'avoir des enfants [1, 2]. Selon le stade de la maladie, le cancer de l'endomètre peut aussi être traité par radiothérapie, chimiothérapie et l'hormonothérapie seule ou en combinaison avec la chirurgie [1, 2].

Dans la majorité de cas, la maladie est guérissable par hystérectomie et radiothérapie. Cependant, selon les estimations actuelles, environ 750 femmes décèdent chaque année du cancer de l'endomètre au Canada, ce qui en fait le 8^e cancer le plus mortel chez les femmes (Statistiques canadiennes sur le cancer 2011). Bien que le taux de survie après 5 ans soit de 85 % pour les patientes souffrant d'un cancer de l'endomètre localisé, les formes avancées du cancer ont un mauvais pronostic [1]. Pour les cas avancés, les approches thérapeutiques conventionnelles entraînent plusieurs inconvénients tels que les risques d'hémorragies, l'apparition d'autres maladies, diverses

formes de toxicité et des problèmes gastro-intestinaux [1-4]. Malgré l'efficacité de certains traitements comme la radiothérapie et la chimiothérapie, ils n'ont pas d'impact sur la survie des patientes ou sur la récurrence de la maladie [1, 3, 5]. Pire encore, le risque de récurrence avec l'hormonothérapie peut atteindre 24 % [2]. Pour toutes ces raisons, il est important d'améliorer la prévention, la détection précoce de la maladie ainsi que les traitements dans le but de réduire la fréquence et d'augmenter la survie des patientes atteintes [3]. Cependant, l'amélioration des traitements pour les patientes présentant de hauts risques de récurrences locales ou distantes est encore un défi dans le cas du cancer de l'endomètre [1].

1.1.2 L'immunothérapie comme traitement potentiel du cancer de l'endomètre

L'immunothérapie est une forme de thérapie de plus en plus utilisée pour le traitement du cancer, car elle repose sur le fait que le système immunitaire possède la capacité d'éliminer autant les tumeurs en développement que les métastases [6-8]. De plus, l'immunothérapie a plusieurs avantages par rapport aux autres formes de traitements tels qu'une approche plus systémique ainsi qu'une diminution des effets secondaires causés par les traitements plus traditionnels [9, 10]. Dans la plupart des cas de cancers détectés cliniquement, les cellules cancéreuses n'induisent pas une réponse antitumorale efficace de la part du système immunitaire [6, 10, 11]. Donc, les stratégies visant à augmenter l'immunité antitumorale sont celles qui sont les plus encourageantes [11]. Plusieurs suggestions de traitements sont maintenant à l'étude ou en phase clinique pour les cancers gynécologiques, surtout le cancer de l'ovaire [12]. Autant les stratégies visant une activation non spécifique du système immunitaire, telle que l'utilisation de l'interféron (IFN)- γ , ou les stratégies spécifiques, telles que l'activation des lymphocytes T, sont à l'essai [12]. Une molécule potentielle pour l'immunothérapie spécifique est le récepteur *Cluster of differentiation* (CD) 40. Ce récepteur est présent à la surface des cellules immunitaires, mais aussi à la surface de certaines cellules cancéreuses. Son activation dans les cellules inflammatoires permet, entre autres, une stimulation du système immunitaire et la mise en place d'un programme antitumoral [13].

Un autre effet responsable de l'activité antitumorale de CD40 est le renversement du milieu immunosuppresseur présent autour de la tumeur et l'instauration d'une réponse antitumorale contre les métastases [14-16]. De plus, dans certains types de cancers tels que ceux de la vessie, du col de l'utérus et de l'estomac, l'activation de CD40 dans la cellule cancéreuse peut induire un effet toxique *in vitro* et *in vivo* [17]. Plusieurs études utilisant l'activation du récepteur CD40 sont en cours sur des modèles murins et humains pour différents types de cancer comme le cancer rénal, les lymphomes et le cancer du sein [17]. Dans ces études, les traitements utilisés ont pour but, entre autres, l'activation de CD40 sur les cellules immunitaires, la préparation de vaccins basés sur les interactions CD40 et son ligand (CD40L), et la combinaison de l'activation de CD40 et la chimiothérapie [17].

L'utilisation de l'immunothérapie dans le cas des cancers gynécologiques est basée sur le fait que ces cancers sont potentiellement immunogènes, c'est-à-dire, capables d'être reconnus et attaqués par le système immunitaire [12, 18, 19]. Dans le cas du cancer de l'endomètre, la tumeur est infiltrée par des cellules immunitaires, telles que les lymphocytes et les macrophages (Mφs) [9, 20-23]. De plus, les cellules de l'endomètre, cancéreuses ou non, expriment le récepteur CD40 et répondent à la stimulation par le ligand du récepteur CD40L [24-27]. Par exemple l'activation du récepteur CD40 par le CD40L induit une production importante de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8 chez les fibroblastes et les cellules périvasculaires de l'endomètre [42, 43]. Ces observations font du cancer de l'endomètre une pathologie potentiellement pertinente pour l'immunothérapie basée sur l'activation du récepteur CD40. Cependant, des études approfondies pour valider cette stratégie doivent d'abord être réalisées, telles que celles incluses dans le présent mémoire.

Dans les sections suivantes, les rôles du système immunitaire en lien avec le cancer et plus spécifiquement ceux des macrophages seront abordés. De plus, une section sur le récepteur CD40 permettra de comprendre l'importance de ce dernier dans l'immuno-oncologie. L'étude réalisée dans le cadre du projet sera présentée au chapitre III suivie d'une discussion.

1.2 Les rôles du système immunitaire dans la progression tumorale

1.2.1 L'immunosurveillance des tumeurs

En 1909, Paul Ehrlich proposait que le système immunitaire possède la capacité d'inhiber la croissance des cancers, car selon lui, si ce n'était pas le cas, les cancers surviendraient avec une fréquence plus élevée [6]. Depuis, le nombre d'études sur l'immunobiologie du cancer est en constante évolution. La surveillance des cellules cancéreuses par le système immunitaire est maintenant considérée comme un mécanisme important pour le maintien de l'homéostasie et l'inhibition de la carcinogenèse [6, 10]. En effet, durant la progression néoplasique de plusieurs types de cancer d'origine épithéliale, plusieurs cellules immunitaires sont attirées au site de la tumeur et permettent l'initiation d'une réponse immunitaire contre les cellules transformées [6, 10, 28]. D'ailleurs, il a été démontré que l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs augmentait le risque de développer un cancer [29, 30]. Ces observations sont en accord avec le fait qu'un système immunitaire altéré permet aux facteurs carcinogéniques d'agir sur les cellules normales et former des cellules néoplasiques [29].

Pour qu'il y ait une réponse immunitaire antitumorale, les différentes composantes du système immunitaire doivent être en mesure de faire la différence entre les cellules tumorales et les cellules normales et d'induire une réaction de rejet [29]. Par le passé, il était considéré que la transformation cellulaire n'induisait pas suffisamment de signaux pro-inflammatoires ou de signaux de danger pour alerter le système immunitaire [31, 32]. Par contre, récemment, il a été démontré que des signaux de danger, par exemple l'acide urique, et des ligands des *Toll-like receptors* (TLR), tels que les protéines de choc thermique (HSP) et des dérivés de la matrice extracellulaire, pouvaient provenir de l'activité biologique de la tumeur [6, 29]. Par exemple, dans le cas de la HSP-70, son expression induit une infiltration de Mφs, de cellules dendritiques (CDs) et de lymphocytes T dans la tumeur en plus de promouvoir l'expression de cytokines de type Th1 et d'augmenter l'immunogénicité [33, 34]. Les cellules tumorales peuvent aussi exprimer d'autres molécules à leur surface qui peuvent être des cibles pour le

processus d'immunosurveillance [6]. La reconnaissance et la caractérisation des antigènes tumoraux ont permis de comprendre comment le système immunitaire adaptatif fait la différence entre les cellules normales et les cellules néoplasiques [6].

L'inflammation aigüe, nécessaire à la mise en place d'une réponse antitumorale, est véhiculée en partie par les Mφs qui sécrètent divers médiateurs de l'inflammation, ce qui attire sur place et active les NKs et les CDs [35-37]. Pour leur part, les cellules NKs peuvent directement altérer la progression tumorale. En effet, en produisant des perforines, le ligand du CD95 (*Apoptosis antigen 1 ligand* (FasL)), et du *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), elles sont capables d'éliminer les cellules cancéreuses [29]. Il a aussi été démontré que l'élimination des cellules cancéreuses par les cellules NKs entraîne un relargage d'antigènes tumoraux qui activent la réponse immunitaire adaptative [29, 38]. Leur infiltration dans la tumeur est aussi reliée à la survie des patients dans certains types de cancer comme le cancer gastrique [39]. Quant aux CDs, elles phagocytent les cellules cancéreuses nécrotiques et, une fois matures, elles migreront dans les nœuds lymphatiques qui drainent la tumeur [29]. À cet endroit, elles présenteront les antigènes tumoraux aux lymphocytes T naïfs, ce qui provoquera l'expansion clonale des lymphocytes T cytotoxiques (TC) [29]. Les lymphocytes T spécifiques aux antigènes tumoraux seront ensuite recrutés au site de la tumeur et vont directement attaquer et tuer les cellules cancéreuses [29].

De plus, les cellules immunitaires qui sont attirées vers les sites d'inflammation vont produire d'autres cytokines pro-inflammatoires, telle que l'IFN- γ , qui est essentiel pour la promotion de la différenciation des lymphocytes de type Th1 et l'immunité antitumorale [6, 29]. En effet, l'IFN- γ protège l'hôte non seulement contre l'apparition spontanée de tumeurs, mais aussi contre les tumeurs transplantées ou induites de façon chimique [29, 40-43]. L'IFN- γ est impliqué dans la promotion d'une réponse immunitaire adaptative antitumorale [44]. De plus, l'IFN- γ exerce un effet cytotoxique via des effets antiprolifératifs et antiangiogéniques, et peut induire l'apoptose des cellules cancéreuses [45-47]. L'IFN- γ induit aussi la production d'IL-12 dans les NKs et les Mφs, une cytokine impliquée dans la différenciation et les fonctions des lymphocytes

TC ainsi que dans la réponse antitumorale [29]. L'IL-12 entraîne aussi l'activation de médiateurs cytotoxiques tels que les perforines, le TRAIL et les espèces réactives de l'oxygène (ROI) [29].

L'étape critique dans la surveillance immunitaire du cancer est associée à la génération des cellules NKs, des lymphocytes TC et des Mφs activés afin d'éliminer les cellules tumorales. Même si l'immunosurveillance permet l'éradication d'un grand nombre de cellules transformées, il y a des cellules cancéreuses qui sont résistantes à la grande pression exercée par le système immunitaire et ainsi, des tumeurs peuvent émerger [6]. De plus, les réponses immunitaires antitumorales mènent rarement à l'éradication des tumeurs déjà établies et plusieurs types de tumeurs pourraient être plus agressifs en présence d'inflammation reliée au cancer [6].

1.2.2 L'évasion du système immunitaire

Dans le but d'atteindre un phénotype hautement malin, les cellules tumorales primaires développent plusieurs mécanismes leur permettant de promouvoir leur survie et leur potentiel agressif [37, 48, 49]. Un de ces mécanismes vise à échapper au système immunitaire [50, 51].

Des études récentes montrent que le système immunitaire peut aussi être bénéfique pour la tumeur en croissance [6, 36, 37, 52]. La tumeur qui échappe à la phase d'immunosurveillance entre dans une période de latence durant laquelle elle n'est pas encore détectable cliniquement [6]. Durant cette période, les interactions dynamiques qui surviennent entre le système immunitaire et les cellules transformées entraînent l'apparition de nouvelles populations de cellules cancéreuses qui sont plus aptes à faire face à l'immunité [6]. En effet, il a été démontré que le système immunitaire favorise l'émergence de tumeurs avec une immunogénicité réduite ou avec la capacité d'inhiber la réponse antitumorale [6, 10]. Ces tumeurs sont donc capables d'échapper à la reconnaissance immunitaire et ainsi à leur destruction par le biais de différents mécanismes dont certains sont présentés dans les paragraphes suivants [6, 10, 53].

Tout d'abord, certaines tumeurs suppriment la production de signaux de danger et de stimuli pro-inflammatoires, ce qui empêche une maturation et une activation adéquate des CD_s [6]. Ces CD_s sont donc incapables d'activer les lymphocytes T naïfs, ce qui empêche la détection de la tumeur [6]. Les tumeurs pourraient aussi faciliter la génération de populations de lymphocytes T immunosuppresseurs tels que les lymphocytes T régulateurs (Treg) [54]. Les Treg sont impliqués dans le contrôle des lymphocytes T autoréactifs *in vivo* et dans la suppression de la réponse des lymphocytes T *in vitro* [55]. Deux études montrent que les Treg sont souvent responsables de l'échec de l'élimination de tumeurs transplantées dans les souris [56, 57]. Les Treg pourraient donc jouer un rôle important dans l'inhibition de la réponse immunitaire, naturelle ou induite, contre les tumeurs [6]. Des études récentes suggèrent que les Treg sont aussi détectés dans plusieurs cancers chez l'homme [6]. Un manque d'antigène à la surface des cellules tumorales, causé par des défauts dans les voies de présentation ou d'apprêtement, permet aussi d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire adaptatif [6, 29].

Ensuite, les tumeurs créent un microenvironnement immunosuppresseur causé par une production accentuée de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-10, le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), les prostaglandines E₂ (PGE₂) et le *Transforming growth factor* (TGF)- β [6, 7, 51, 58, 59]. Ces mêmes cytokines anti-inflammatoires peuvent aussi être produites par les M ϕ s, les lymphocytes Th2 et les Treg [29, 60-62]. Ces cytokines induisent des phénotypes immunosuppresseurs dans les cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur, mais aussi dans les nœuds lymphatiques locaux et la rate, ce qui permet la promotion de l'invasion et de la métastase ainsi que l'évasion du système immunitaire [9, 33, 62-65]. En effet, l'IL-10 entraîne l'inhibition de la présentation des antigènes, l'inhibition de la production de l'IL-12 et l'inhibition de la maturation et des fonctions des CD_s [33, 66]. Nous avons récemment démontré que l'IL-10 et d'autres facteurs dérivés des M ϕ s anti-inflammatoires de type 2 (M ϕ -2) protègent les cellules cancéreuses des effets cytotoxiques des M ϕ s pro-inflammatoires de type 1 (M ϕ -1) [67]. Pour sa part, le TGF- β inhibe l'activation, la prolifération et les activités des lymphocytes, et la maturation des CD_s [68]. De plus, le TGF- β peut aussi

induire la production d'IL-10 [33]. L'IL-10 et le TGF- β induisent la prolifération des Treg qui produisent à leur tour de l'IL-10 et du TGF- β [33]. Certaines de ces cytokines, telles que le VEGF et le TGF- β , sont directement impliquées dans la croissance, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse de la tumeur [60, 65, 69, 70].

Comme la surveillance immunitaire par rapport à la tumeur n'est pas toujours efficace, il est concevable que les activités des cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur soient redirigées vers un programme de type Th2 et qu'elles soient impliquées dans la progression néoplasique plutôt que de retarder la croissance tumorale. Ce changement de programme concerne majoritairement les M ϕ s, qui sont reconnus pour changer leur phénotype en réponse aux signaux présents dans le microenvironnement tumoral (voir chapitre suivant) [6, 28, 63, 71]. À ce stade, l'infiltration chronique de la tumeur par des cellules immunitaires, majoritairement des M ϕ s et des lymphocytes, est associée avec un mauvais pronostic [7, 9, 20, 23, 72]. En effet, malgré le fait que l'inflammation locale et contrôlée soit impliquée dans l'initiation de la réponse antitumorale, l'inflammation chronique et excessive est impliquée dans la transformation maligne des cellules saines et la progression tumorale [7, 8, 35, 51, 64, 65].

1.3 Les macrophages et la progression tumorale

1.3.1 Différenciation des macrophages

Les M ϕ s sont des cellules clés dans l'inflammation aiguë et celle reliée au cancer [7, 60, 63, 73]. En effet, une fois activés, les M ϕ s représentent une source importante de facteurs de croissance, d'enzymes et de cytokines [65, 74]. Les M ϕ s sont impliqués dans l'immunité innée et adaptative en sécrétant différents médiateurs de l'inflammation, en éliminant les pathogènes par phagocytose et en activant les lymphocytes. Les M ϕ s proviennent des monocytes qui, comme les autres globules blancs, sont issus des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Une fois générés, les monocytes sortent de la moelle osseuse et se retrouvent dans la circulation sanguine. En réponse à

l'inflammation, aux dommages tissulaires, aux infections ou pour le maintien de l'homéostasie, les monocytes vont quitter la circulation sanguine par extravasation pour se retrouver dans un tissu et effectuer leur différenciation en Mφs [63, 73].

1.3.2 Polarisation des macrophages

À la suite du contact avec leur environnement, les Mφs vont se polariser et exercer des fonctions qui dépendent des signaux qu'ils ont reçus [63, 73]. La polarisation des Mφs détermine leurs fonctions biologiques, l'expression de récepteurs et la production de chimiokines et de cytokines [61]. Il existe un continuum de polarisation, donc un continuum de fonctions biologiques chez les Mφs en réponse aux signaux de l'environnement [7, 61, 63]. Les deux extrêmes de ce spectre de polarisation sont les Mφ-1 et les Mφ-2, selon la dichotomie Th1/Th2 des réponses immunitaires (voir figure 1.1) [7, 61, 63]. Les Mφs sont des cellules polyvalentes et ils peuvent exercer une grande diversité de fonctions biologiques et avoir des caractéristiques des Mφ-1 et des Mφ-2 en même temps [52, 61, 63, 71, 75, 76]. De plus, un changement de signal dans l'environnement peut entraîner un changement de polarisation chez les Mφs [71, 75, 77].

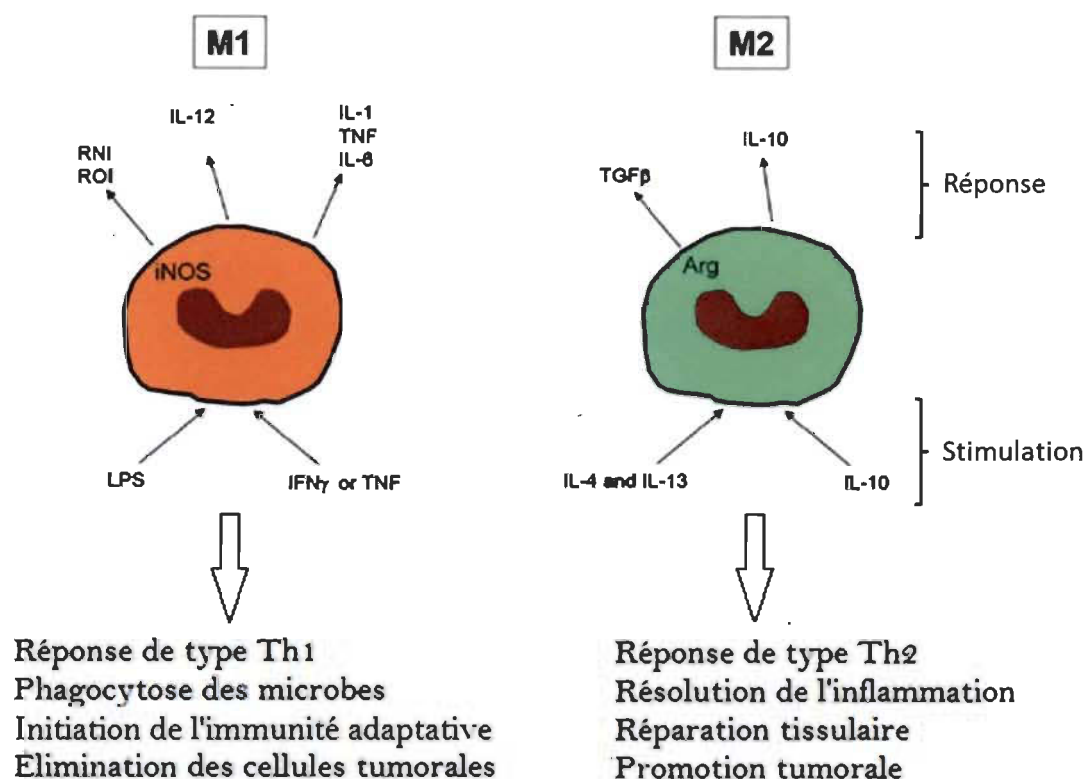


Figure 1.1 La polarisation des macrophages en M ϕ -1 et M ϕ -2.
 Les M ϕ -1 sont obtenus par la voie classique d'activation et exercent des fonctions pro-inflammatoires telles que l'initiation de l'immunité adaptative et l'élimination des cellules tumorales. Les M ϕ -2 sont obtenus par la voie alternative d'activation et sont impliqués dans les réponses de type Th2 telles que la résolution de l'inflammation. Adapté de [28].

1.3.2.1 Les macrophages pro-inflammatoires de type 1

Les M ϕ -1 sont obtenus par la voie classique d'activation : stimulation par l'IFN- γ , le facteur de nécrose tumorale (TNF), les produits microbiens comme le lipopolysaccharide (LPS) ou des signaux de dangers [52, 61, 63]. Les M ϕ -1 sont impliqués dans l'élimination des pathogènes intracellulaires et des cellules anormales ou cancéreuses [58, 61, 63]. En sécrétant divers médiateurs pro-inflammatoires et en possédant une capacité accrue pour la présentation des antigènes, ils jouent un rôle clé dans la promotion des réponses immunitaires de type Th1 [58, 61]. Ils sont antiprolifératifs, cytotoxiques et antiangiogéniques et peuvent causer des dommages aux tissus de l'hôte [36, 63]. Les M ϕ -1 sont caractérisés par une expression accrue de certains récepteurs comme le CD14 (le récepteur du LPS) et le CD40, le récepteur de

CD40L exprimé sur les lymphocytes T activés [61, 74]. Ces Mφs produisent des cytokines et des médiateurs de l'inflammation aiguë comme les ROI, les dérivés de l'azote comme l'oxyde nitrique (NO), le TNF- α , l'IL-12, l'IL-1 et l'IL-6 [61, 63].

1.3.2.2 Les macrophages anti-inflammatoires de type 2

Les Mφ-2 sont obtenus en réponse à des signaux anti-inflammatoires (voie alternative d'activation) tels que l'IL-10, l'IL-4 et l'IL-13 ainsi que le TGF- β [61, 63, 73]. Les Mφ-2 sont impliqués dans l'élimination des débris cellulaires et dans la promotion de la prolifération cellulaire [52, 61, 63]. Étant donné leur sécrétion de divers médiateurs anti-inflammatoires, les Mφ-2 jouent un rôle dans la suppression de l'inflammation aiguë en inhibant, entre autres, les fonctions des Mφ-1 et la prolifération des lymphocytes T [20, 61]. Les Mφ-2 ont une faible capacité pour la présentation des antigènes et sont impliqués dans le remodelage et la réparation des tissus en promouvant la migration des cellules épithéliales, le remodelage de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse [58, 61, 63]. Les Mφ-2 sont caractérisés par une expression accrue de récepteurs pour la phagocytose des débris, du récepteur au mannose et du récepteur de type galactose [58, 63]. Ils produisent aussi divers facteurs de croissance, des cytokines et des médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β [61].

La balance entre la population de Mφ-1 et de Mφ-2 au cours d'une réponse inflammatoire est importante pour le fonctionnement normal du système immunitaire, un mauvais équilibre pouvant entraîner soit des maladies découlant d'une inflammation chronique ou une immunosuppression sévère [20, 60, 63, 73].

1.3.3 Les macrophages associés à la tumeur

Les Mφs qui sont présents dans les tissus néoplasiques sont aussi appelés macrophages associés à la tumeur (TAM). Les Mφ-1 et les Mφ-2 ainsi que les monocytes, leurs progéniteurs, sont majoritairement recrutés dans le stroma tumoral en provenance de la circulation sanguine, mais aussi depuis les tissus environnants [50, 51,

60, 71]. Avec les lymphocytes, les Mφs sont les constituants majoritaires des leucocytes infiltrant presque toutes les tumeurs solides [7, 9, 36, 50]. De plus, les Mφs sont recrutés très tôt dans le développement de la tumeur [9, 58, 78, 79].

Les Mφs sont recrutés au site de la tumeur par les cellules cancéreuses elles-mêmes ou par les autres types de leucocytes qui ont infiltré la tumeur [9, 58]. En effet, les cellules cancéreuses et les leucocytes infiltrés sécrètent plusieurs chimiokines et cytokines qui attirent les Mφs. La liste inclut le *Monocyte chemotactic protein* (MCP)-1 les chimiokines de type CC comme CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-7 et CCL-8, le VEGF, la protéine inflammatoire des macrophages (MIP) et le *Macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) [7, 51, 58, 59]. En plus d'attirer les Mφs au site de la tumeur, certains de ces facteurs, tels que MCP-1 et M-CSF, ont aussi un rôle à jouer dans leur survie [7, 79]. Une fois au sein de la tumeur, les Mφs seront activés et polarisés par les différents signaux présents sur place [9, 50, 63, 80]. La localisation microanatomique des TAM influence leur polarisation, donc leurs fonctions biologiques [20, 58, 81]. Les TAM peuvent se retrouver dans le stroma, au centre de la tumeur, dans les foyers nécrotiques ou encore en périphérie de la tumeur [7, 65, 81].

De plus en plus d'évidences montrent qu'un haut niveau d'infiltration de la tumeur par les TAM est associé avec la promotion tumorale et la métastase et ce, dans la majorité des cancers [7, 9, 20, 23, 72]. Les TAM sont donc suspectés d'avoir un phénotype de type Mφ-2 orienté vers le remodelage des tissus, l'élimination des débris, la promotion de l'angiogenèse et la suppression de l'immunité [37, 58, 60, 82, 83]. Il est proposé que ce phénotype des TAM soit causé par leur exposition à des facteurs dérivés des tumeurs tels que l'IL-4, l'IL-10 le TGF-β et les PGE₂ [9, 29, 33, 62-65]. De plus, même si les Mφ-1 sont normalement capables d'éliminer les cellules tumorales, de produire des cytokines immunostimulatrices et de présenter les antigènes tumoraux pour stimuler la prolifération des lymphocytes T *in vitro*, les TAM ont une capacité réduite pour ces fonctions biologiques [9]. Les TAM impliqués dans le développement tumoral [36, 37, 50, 58-60, 80] exercent une influence de façon directe sur les cellules cancéreuses ou de façon indirecte en agissant sur les cellules présentes dans le stroma

tumoral (cellules épithéliales, mésenchymales, endothéliales et autres cellules immunitaires infiltrées) [7, 36, 65]. Ils auraient des rôles à jouer dans l'angiogenèse, la lymphangiogenèse, l'invasion et la métastase, la production de cytokines par les cellules cancéreuses, la croissance cellulaire et la régulation du cycle cellulaire [7, 20, 36, 65, 83] (voir figure 1.2). Ceci pourrait expliquer pourquoi un haut niveau de TAM est corrélé avec un mauvais pronostic dans différents types de cancer, incluant le cancer de l'endomètre, du sein, de l'ovaire, du col de l'utérus et de la vessie [7, 9, 20, 23, 36, 51, 72, 80].

1.3.4 Rôles anti-tumoraux des macrophages

Il y a des évidences provenant d'études génétiques dans des modèles murins montrant que les cellules de l'immunité adaptative surveillent et sont capables d'éliminer la tumeur en début de développement [6, 10]. L'accumulation de Mφs dans certains types de tumeurs est associée avec un pronostic favorable [84]. Dans de tels cas, il est possible de penser que les TAM soient plutôt de phénotype Mφ-1 car ces derniers possèdent la capacité d'éliminer les cellules cancéreuses en plus de pouvoir activer les lymphocytes T et monter une réponse antitumorale efficace [64, 80]. En effet, les Mφs, lorsqu'ils sont activés de façon appropriée (activation classique avec IFN-γ et LPS par exemple), peuvent tuer les cellules tumorales et avoir un phénotype antiangiogénique [9, 64, 80]. La fonction cytotoxique des TAM est de plus en plus associée avec leur localisation dans les îlots tumoraux, à l'intérieur de la masse tumorale [23, 84].

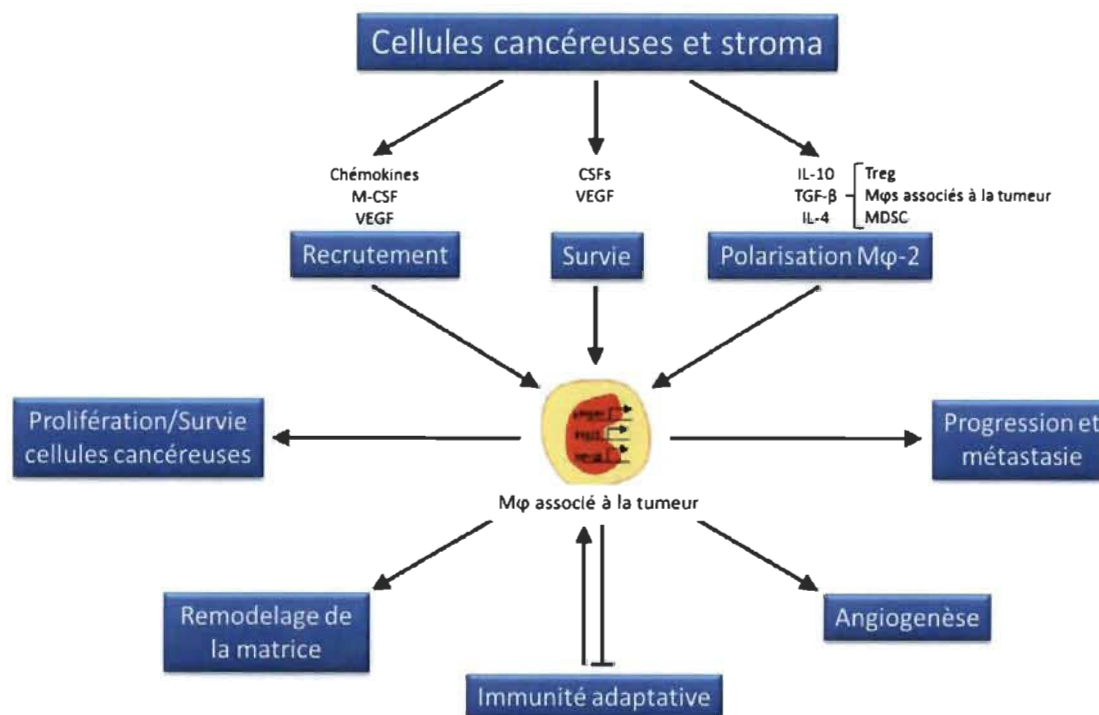


Figure 1.2 Les macrophages et la progression tumorale.

La tumeur sécrète des chimiokines et des cytokines qui recrutent, entraînent la survie et éduquent les Mφs qui l'infiltrent. Ces derniers produisent alors différents médiateurs de l'inflammation qui activent les cellules tumorales ou les autres cellules immunitaires infiltrées et entraînent la progression tumorale. Adapté de [50].

Les Mφ-1 sont capables d'éliminer les cellules cancéreuses de deux façons. Premièrement, les Mφ-1 exercent une cytotoxicité directe envers les cellules cancéreuses de façon indépendante des anticorps (MTC de *Macrophage-mediated tumor cytotoxicity*) ou dépendante des anticorps (ADCC de *Antibody-dependant cellular cytotoxicity*) [9]. Dans le premier cas, les Mφ-1 sécrètent des facteurs lytiques (TNF- α , protéases, espèces réactives de l'azote) qui entraînent la lyse des cellules cancéreuses [85-87]. Ce processus est généralement lent et prend environ trois jours pour être complété. L'ADCC est plus rapide et entraîne une élimination des cellules cancéreuses semblable à celle obtenue par MTC [9]. Par contre, l'ADCC requiert la présence d'anticorps à la surface des cellules cancéreuses pour l'activation des récepteurs Fc à la surface des Mφs. Les cellules cancéreuses doivent donc exprimer des antigènes du non-soi ou encore des antigènes de surface aberrants, ce qui est peu fréquent [9]. Deuxièmement, les Mφ-1 exercent une

cytotoxicité indirecte sur les cellules cancéreuses [9]. Ils sécrètent des facteurs qui stimulent les fonctions antitumorales et anti-métastatiques chez d'autres leucocytes qui, à leur tour, entraîneront l'élimination des cellules cancéreuses [6, 7]. Les Mφ-1 possèdent aussi des propriétés antiangiogéniques, ce qui permet la destruction des vaisseaux sanguins de la tumeur [88].

Par contre, la tumeur peut usurper le système immunitaire [52, 58]. En effet, les cellules cancéreuses sécrètent différentes chimiokines et cytokines qui modifient la polarisation des Mφs en les dirigeant vers un phénotype protumoral [20, 28, 89]. De plus, les cellules cancéreuses présentent des altérations génétiques, utilisent à leur avantage les voies de survie et sont capables d'outrepasser les effets toxiques de certains médiateurs tels que IL-1β et TNF-α [76, 90].

1.3.5 La progression de la polarisation des TAM

Le microenvironnement tumoral influence directement la polarisation des TAM [28, 59, 63]. De plus en plus d'études montrent que la polarisation des TAM change au fil de la progression tumorale à cause du dynamisme de cet environnement (voir figure 2.3) [63, 71]. En effet, les TAM sont de type 1 au moment de la transformation néoplasique (présence d'inflammation aigüe) et sont de type 2 dans les tumeurs établies [28, 60, 76, 91].

Au début de la maladie, durant les stades d'initiation de la carcinogenèse, les Mφs sont plutôt de type 1 lors de la phase d'élimination [6]. Durant cette phase, l'immunosurveillance impliquant les Mφ-1, entraîne l'élimination des cellules préneoplasiques et le milieu est caractérisé par une inflammation aigüe [76]. Ensuite, il y a une phase d'équilibre, une période de latence induite par le système immunitaire après une destruction incomplète de la tumeur durant la phase d'élimination [6]. À ce stade, il y a autant de cellules cancéreuses qui meurent que de cellules cancéreuses en prolifération. C'est durant cette phase qu'il y a sélection des cellules cancéreuses résistantes à l'effet toxique du système immunitaire en profitant de leur instabilité

génétique [6, 52]. Comme la phase d'équilibre implique l'élimination continue des cellules tumorales et la production de cellules tumorales résistantes, il est possible que cette phase soit la plus longue [29]. À cette étape, les cellules immunitaires favorables à la progression tumorale sont aussi sélectionnées [59]. Finalement, si la tumeur est capable d'échapper aux contraintes de la phase d'équilibre, elle entre dans la phase d'échappement [6]. Ces trois phases forment un processus dynamique appelé *Immunoediting* (voir figure 1.3) [6, 10].

Au cours de ce processus, les TAM deviendront de type M ϕ -2, ce qui permet la progression de la carcinogenèse [6, 10]. Ainsi, les nouveaux M ϕ s qui arrivent au site de la tumeur sont des M ϕ -1 qui changeront de phénotype au contact du microenvironnement tumoral. Le changement de polarisation peut être expliqué par différents mécanismes comme une activation défectueuse du Facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) dans les TAM, une activation persistante des TLR, la présence de facteurs anti-inflammatoires dans le microenvironnement tumoral ou la phagocytose de cellules apoptotiques [33, 62, 73, 76, 92-95].

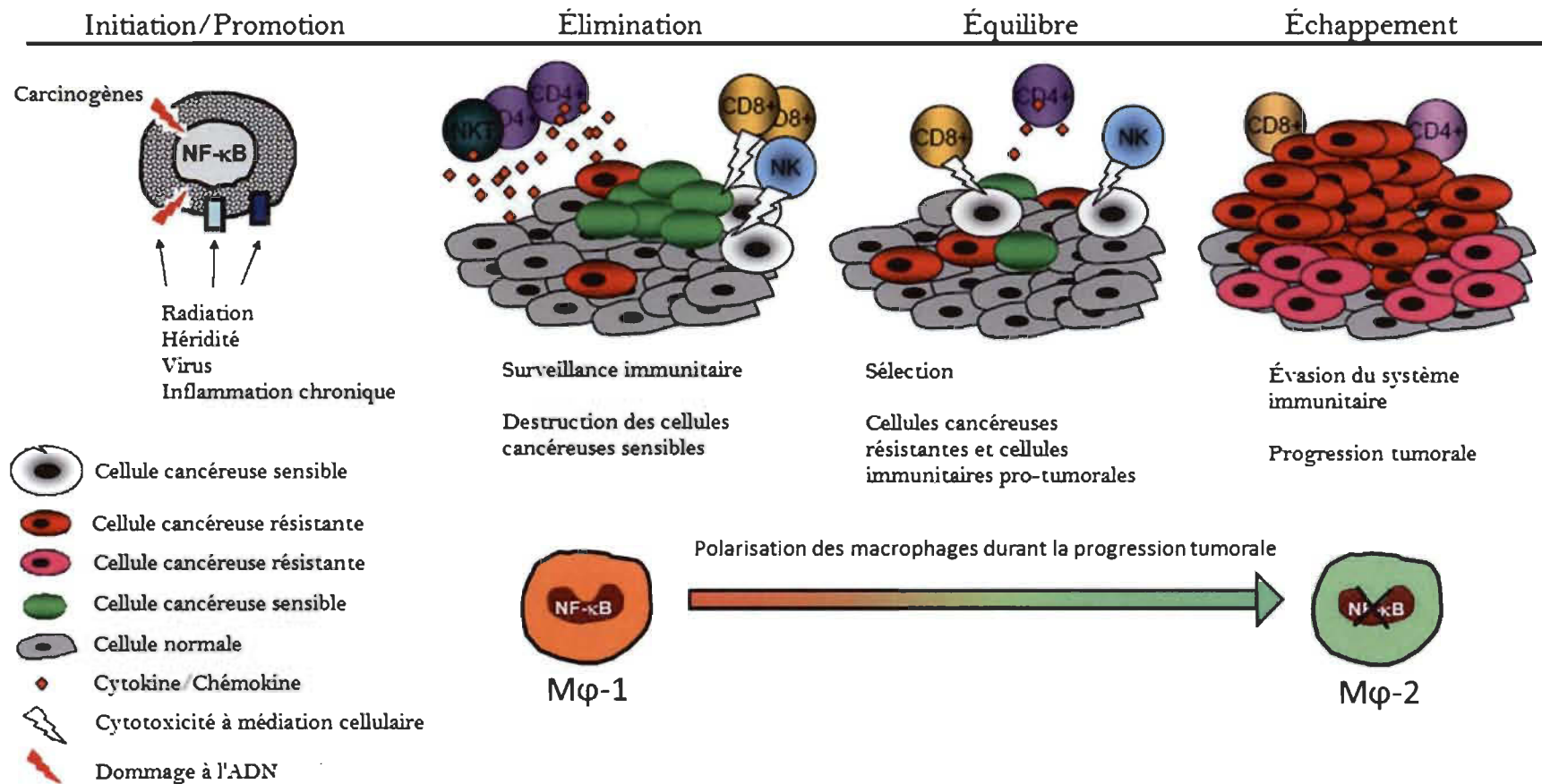


Figure 1.3 La polarisation des macrophages et la progression tumorale.

L'inflammation chronique est impliquée dans l'initiation et la promotion du cancer. Au début de la maladie, les cellules immunitaires sont impliquées dans la destruction des cellules cancéreuses en développement. Les cellules cancéreuses résistantes à l'effet toxique du système immunitaire survivent et entraînent la sélection et la survie des cellules immunitaires nécessaires à la progression tumorale. Finalement, la tumeur peut échapper au système immunitaire en utilisant à son avantage les fonctions des leucocytes qui sont dans son environnement. Adapté de [6, 28].

1.4 Le système CD40/CD40L

1.4.1 Le récepteur CD40 et son activation

Le CD40 est un récepteur transmembranaire de type 1 membre de la superfamille du récepteur au TNF [17]. Il est reconnu comme un puissant activateur cellulaire et un médiateur clé de plusieurs réponses immunitaires et inflammatoires [17]. Il est exprimé de façon constitutive dans les Mφs, les lymphocytes B et les CDs [11, 13, 96]. L'expression du CD40 peut être induite dans d'autres types de cellules inflammatoires, mais aussi dans les cellules endothéliales, épithéliales, les plaquettes et les cellules cancéreuses [11, 13]. Lorsque le récepteur CD40 est activé, il peut induire la prolifération, l'arrêt de prolifération, la différenciation et la mort cellulaire selon le type de cellules cibles et leur environnement [11, 17].

Le récepteur CD40 est activé par son ligand, le CD40L, aussi appelé CD154 [11, 13, 17]. Cette protéine est membre de la superfamille du TNF [11, 96]. Le CD40L est exprimé de façon transitoire par les lymphocytes T et B activés et par d'autres cellules (NKs, mastocytes, plaquettes, etc.) en présence d'inflammation [11, 17, 96]. Comme d'autres membres de la superfamille du récepteur au TNF, il a déjà été démontré que l'activation du récepteur CD40 est optimale lorsque le récepteur est dimérique ou trimérique et se retrouve dans des microdomaines de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques [17]. La forme dimérique est essentielle pour induire un signal dans la cellule cible tandis que la forme trimérique augmente la force de l'activation [17]. Le pontage (*crosslinking*) du couple CD40-CD40L permet la génération d'un signal encore plus fort [17]. Ces différentes formes d'activation permettent d'avoir le large spectre d'action biologique dans les cellules cibles décrit ci-haut. Une fois lié au CD40, le CD40L induit l'activation de plusieurs voies de signalisation comme celles de NF-κB, des *Mitogen activated protein kinase* (MAPK), de la *Phosphoinositide 3 kinase* (PI3-K)/Protéine kinase B (Akt) et de Janus kinase (Jak)/*Signal transducers and activators of transcription* (STAT) [26].

Dans le système immunitaire, l'activation de CD40 survient souvent après l'interaction entre la cellule présentatrice d'antigène (CPA) et le lymphocyte T [11]. En effet, les CPA fournissent deux signaux d'activation aux lymphocytes T spécifiques à l'antigène : 1) le complexe CMH-antigène-récepteur T et 2) un signal de costimulation, la liaison du CD40 exprimé sur la CPA avec son ligand exprimé sur le lymphocyte T [97]. Ceci active des voies de signalisation importantes pour les fonctions des lymphocytes T et de la CPA, souvent un Mφ ou une CD [11, 97]. La présence d'interactions CD40/CD40L est critique pour le développement des fonctions dépendantes des lymphocytes T CD4⁺ telles que la différenciation des lymphocytes B, la commutation isotypique des immunoglobulines, l'activation des Mφs et l'expression de molécules de costimulation pour l'initiation de la réponse immune à médiation cellulaire [24, 26, 97].

L'activation du récepteur CD40 dirige la réponse immunitaire vers le phénotype Th1 donc, si son activation est mal régulée, des dommages aux tissus causés par l'inflammation chronique peuvent alors survenir [97]. En effet, l'activation aberrante du récepteur CD40 est impliquée dans plusieurs maladies telles que les maladies neurodégénératives et la maladie inflammatoire de l'intestin. De plus, comme les Mφs sont une source majeure de médiateurs de l'inflammation, leur dysfonctionnement par le biais d'une activation persistante du récepteur CD40 semble être associé avec la pathogenèse de maladies reliées à l'inflammation comme l'athérosclérose et l'arthrite rhumatoïde [13].

L'activation de CD40 dans les cellules inflammatoires permet, en général, une stimulation du système immunitaire et la génération d'une réponse de type Th1 [44, 96-98]. Dans ces cellules, la liaison du récepteur par son ligand entraîne une activation et une différenciation cellulaire, la sécrétion de cytokines et de chimiokines, l'expression de molécules d'adhésion et l'expression d'enzymes et de molécules de costimulation comme les métalloprotéases matricielles (MMP) [26, 96]. De plus, l'activation du récepteur CD40 permet l'initiation et la progression de la réponse immunitaire adaptative, car il sert de signal d'activation entre le lymphocyte T et la CPA

suite à la présentation de l'antigène [11, 96-98] (voir figure 1.4). Cette costimulation permet de générer les réponses immunes adaptatives à médiation cellulaire et/ou humorale contre l'antigène présenté par la CPA.

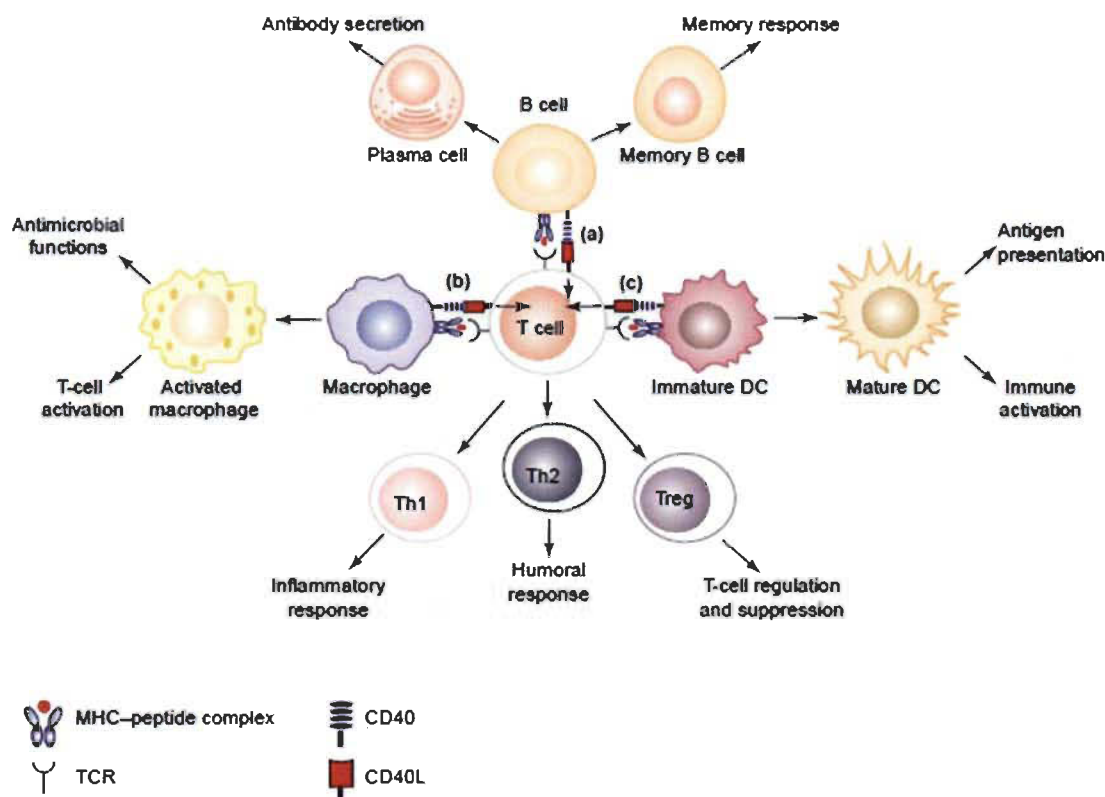


Figure 1.4 Rôle du système CD40/CD40L dans l'activation du système immunitaire.

L'interaction CD40-CD40L permet la costimulation et la différenciation des lymphocytes T (Th1, Th2 ou Treg) et active les Mφs et les CD. (a) Dans les lymphocytes B, l'interaction CD40-CD40L sert de signal de survie, stimule la production d'anticorps, la commutation de classe des Ig et la maturation d'affinité des anticorps. (b) Dans les Mφs, l'interaction CD40-CD40L augmente la production de facteurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-12, ROI, NO) et augmente la capacité de présentation des antigènes. (c) Dans les CD, l'interaction CD40-CD40L permet leur maturation et leur activation et la régulation des fonctions nécessaires pour la présentation des antigènes. Tiré de [97].

1.4.2 L'activation du CD40 chez les macrophages

L'activation du récepteur CD40 sur les Mφs entraîne une réponse à prédominance pro-inflammatoire [17, 97, 98]. Cette réponse est caractérisée par une augmentation de la

capacité de présentation des antigènes (augmentation du CMHII et des molécules d'adhésion) et une augmentation de la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-8, IFN- γ , MCP-1, etc) [44, 97, 98]. Les M ϕ s stimulés par le CD40L ont aussi une expression accrue de MMP (MMP-1, -2, -3 et -9) et une sécrétion accrue de NO en présence d'IFN- γ [98].

Les M ϕ s activés par le CD40 *in vitro* possèdent une activité antitumorale et ils ont donc des rôles à jouer dans l'immunité antitumorale induite par CD40 [17, 98]. De plus, des résultats semblables ont été obtenus *in vivo*. En effet, une étude chez la souris [99], montre que l'activation de CD40 dans les M ϕ s permet l'activation des NKs (indépendant des lymphocytes T) probablement causée par la sécrétion d'IL-12. Dans cette étude, les auteurs ont observé une réponse antitumorale et anti-métastatique chez les souris traitées. Une deuxième étude a montré que l'injection intrapéritonéale d'anti-CD40 chez les souris permettait une activation des M ϕ s indépendante des lymphocytes T et des NKs [44]. Les M ϕ s sécrètent alors de l'IL-12 qui entraîne la sécrétion d'IFN- γ par les M ϕ s eux-mêmes, mais aussi par d'autres cellules immunitaires [44]. L'IFN- γ est nécessaire pour l'activation des M ϕ s qui acquièrent alors la capacité d'inhiber la prolifération (par apoptose démontrée *in vitro*) des cellules cancéreuses murines (mélanome, lymphome et rénal) et humaines (mélanome, lymphome et ovaire). Les chercheurs ont aussi démontré que la présence de LPS augmentait l'activité antitumorale des M ϕ s et qu'ils produisaient aussi du NO et présentaient un phénotype de type 1 (IL-12, TNF- α , IFN- γ , CMHII, CD40) [44, 98].

Finalement, une étude sur le cancer du col de l'utérus utilise un anticorps anti-CD40 ou la forme soluble du CD40L pour activer les monocytes [100]. Cette activation entraîne la mise en marche de plusieurs processus liés à la présentation et à l'apprêtement de l'antigène dans le monocyte, ce qui permet de générer une réponse antitumorale dépendante des lymphocytes T [100].

1.4.3 Le CD40 et le cancer

1.4.3.1 *L'expression de CD40 sur les cellules cancéreuses*

Certaines cellules cancéreuses expriment de façon constitutive le récepteur CD40, le CD40L ou encore les deux sur leur membrane cytoplasmique. La liste inclut les mélanomes [101], les lymphomes [17], du sein [96], de l'ovaire [102] et du col de l'utérus [103]. Le rôle des interactions CD40-CD40L n'est pas encore bien défini dans le cas des cellules tumorales étant donné l'ambiguïté des résultats obtenus par rapport à la prolifération et par rapport au niveau d'expression des molécules dans la tumeur (tumeur primaire vs métastases et début de cancer vs cancer avancé) [17]. Par exemple, dans le cas du mélanome, le CD40 n'est pas toujours exprimé par toutes les cellules d'une même tumeur et n'est pas exprimé dans les métastases [104].

Des recherches ont aussi été réalisées sur les cancers gynécologiques. Dans le cas du cancer du sein par exemple, Tong et al [105] ont démontré que les cellules cancéreuses exprimaient CD40 et CD40L. Dans cette étude, le fait que la tumeur soit infiltrée par des lymphocytes T exprimant CD40 et CD40L pourrait avoir un rôle à jouer dans la modulation de la prolifération. D'autre part, l'incubation des cellules mammaires cancéreuses avec la forme soluble du CD40L entraîne l'inhibition de prolifération et potentialise l'effet inhibiteur de l'IFN- γ [106]. Dans le cas du cancer de l'ovaire, Hakkarainen et al [107] ont détecté l'expression de CD40 dans les cellules provenant de lignées cellulaires, mais aussi dans les cellules cancéreuses fraîchement isolées. Aucune étude n'a été faite à ce jour sur le rôle de CD40 dans ce contexte.

1.4.3.2 *Le récepteur CD40 et la réponse anti-tumorale*

L'interaction CD40-CD40L joue un rôle important dans les réponses immunitaires contre la tumeur [11, 17]. D'abord, les vaccins tumoraux ne sont pas efficaces dans les souris déficientes en CD40, ce qui suggère que l'interaction CD40-CD40L pourrait être critique dans l'induction de la réponse antitumorale contre les cellules cancéreuses humaines [11, 108]. Ensuite, l'interaction CD40/CD40L est impliquée, entre autres, dans

la maturation des CD_s et dans l'activation des Mφs [11, 17, 97, 109]. Deux évènements nécessaires à réponse antitumorale efficace et spécifique [17, 44, 98]. Cette réponse permet la potentialisation de la présentation des antigènes tumoraux par les cellules de l'hôte, ce qui mène à une activation de l'immunité adaptative et à la destruction de la tumeur [17]. Puis, une fois le lymphocyte T CD4⁺ activé par la CPA, ce qui nécessite CD40, il y a différenciation et production d'IL-12 par cette dernière [44, 98]. La CPA activée est alors en mesure de sensibiliser le lymphocyte T CD8⁺ à l'aide de la présentation de l'antigène sur le CMHI, l'IL-12 et d'autres molécules de costimulation qui ont été induites par l'activation de lymphocytes T CD4⁺ via CD40. Il y a ainsi génération d'une réponse antitumorale à médiation cellulaire [24, 26]. La liaison du CD40 a donc un rôle à jouer dans la reconnaissance immunitaire de la tumeur et dans la génération de CTL, ce qui permet la régression tumorale.

Un autre mécanisme impliqué dans l'activité antitumorale de l'interaction CD40-CD40L est le renversement du milieu immunosuppresseur entourant la tumeur et l'instauration d'une réponse antitumorale dans les métastases [14-16]. La combinaison IL-2 et anti-CD40 a été utilisée pour générer une augmentation de plusieurs chimiokines de type Th1 dans le microenvironnement tumoral en plus d'entraîner une diminution du nombre de Tregs et de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) qui infiltrent la tumeur [14, 15]. Cette stratégie combinatoire a aussi été associée à une diminution de chimiokines de type Th2 dans le microenvironnement. La combinaison IL-2/anti-CD40 permettrait donc de surmonter l'immunosuppression induite par la tumeur et de transformer le microenvironnement en un de type Th1 avec une infiltration de leucocytes, incluant les Mφ-1.

1.4.3.3 Régulation de la survie des cellules cancéreuses par CD40/CD40L

La régulation de la survie des cellules cancéreuses suite à l'interaction de CD40 avec CD40L repose principalement sur deux voies [17, 110]. La première voie, directe, est l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses elles-mêmes, directement stimulées par le CD40 [17, 96, 110]. La deuxième voie, indirecte, est l'induction d'une

réponse immunologique antitumorale causée par l'interaction CD40-CD40L sur les cellules immunitaires. Cette réponse est suivie de l'élimination des cellules cancéreuses par les cellules immunitaires [17, 96, 110]. Présentement, il y a peu de données sur les mécanismes impliqués dans ces deux voies [17]. Des études montrent que l'induction de l'apoptose par l'activation de CD40 dans les cellules cancéreuses pourrait être caspase dépendante ou indépendante [17, 111, 112]. D'autres mécanismes sont soupçonnés, comme l'apoptose spontanée ou induite par FasL, une inhibition de prolifération dépendante du récepteur du *Epidermal growth factor* (EGF) ou encore l'effet combiné de l'apoptose induite directement par l'activation de CD40 et une réponse immunitaire antitumorale [17].

1.4.3.4 L'impact de l'interaction CD40-CD40L sur la progression tumorale

En général, l'activation de CD40, de façon directe sur les cellules cancéreuses ou indirecte sur les cellules immunitaires, a un effet antitumoral, mais dans certains cas une stimulation de prolifération et un effet protumoral sont observés [17, 96]. Un mécanisme pour expliquer ce double rôle découle de l'activité de CD40 lui-même [97]. En effet, comme l'activation de CD40 dans les cellules de l'environnement tumoral induit une réponse pro-inflammatoire locale qui peut causer des dommages aux tissus, la régulation négative par des facteurs anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) est nécessaire [97, 113-115]. L'activation du récepteur CD40 sur les cellules inflammatoires qui infiltrent la tumeur induit aussi l'expression locale de plusieurs facteurs qui favorisent la progression tumorale tels que le TGF- β , l'IL-10, le MCP-1, le VEGF et les PGE₂ [14, 97, 109, 116]. L'activation de CD40 peut également promouvoir la métastase et l'angiogenèse [14]. En effet, l'activation du récepteur CD40 dans les cellules immunitaires induit une expression des MMPs qui favorisent l'invasion des cellules cancéreuses et dans la métastase. De plus, les interactions CD40-CD40L dans les cellules endothéliales et les M ϕ s induisent la production de VEGF et de TGF- β et de chimiokines proangiogéniques dans le microenvironnement tumoral [109]. Toutefois, l'angiogenèse est à double tranchant pour la tumeur [109]. D'une part, elle permet un apport en nutriment, la métastase et une infiltration de cellules immunitaires

protumorales donc, la progression tumorale. D'autre part, elle est une porte d'accès au cœur de la masse tumorale, ce qui permet l'arrivée au site de la tumeur de cellules immunocompétentes, un accès pour la chimiothérapie et l'utilisation d'anticorps ou autres molécules pour l'immunothérapie.

Ces fonctions dualitaires (pro- et anti-tumorales) des interactions CD40-CD40L pourraient être contrôlées par la force du signal [97]. Ainsi, chez les Mφs, une forte stimulation du CD40, par exemple en utilisant une forte concentration d'anti-CD40, induit une production d'IL-12 et de TNF- α tandis qu'une faible stimulation induit la production d'IL-10 et de TGF- β (voir figure 1.5) [97]. En effet, la force du signal que reçoit la cellule pour activer CD40 (niveau de pontage ou niveau d'expression du CD40L) a un effet sur la réponse de la cellule cible [97, 109, 116]. Le degré de pontage du récepteur CD40 lors de son activation affecte les voies de signalisation qui seront activées. Si le pontage est faible, il y aura activation de la MAPK *Extracellular signal-regulated kinase* (Erk) et production d'IL-10 et d'IL-4 et suppression de l'immunité. Par contre, si le pontage est fort, il y aura activation de la MAPK p38 et production d'IL-12 et d'IFN- γ , ce qui permettra une activation des lymphocytes TC et des Th1 et un développement tumoral altéré et moins rapide. Ces observations suggèrent que le niveau d'activation des CPA, qui dépend de la force de l'interaction CD40-CD40L avec les lymphocytes T CD4+, a un rôle important à jouer dans l'orchestration des différents effets de la réponse immunitaire [116].

L'environnement duquel sont issus les Mφs peut entraîner des différences dans la réponse au CD40L. En effet, les Mφs exposés à des stimuli pro-inflammatoires, tels que LPS et IFN- γ , ont une expression accrue du récepteur CD40 [61, 67]. Dans ce cas, la liaison du CD40L sur son récepteur entraînera un signal fort qui induira une réponse pro-inflammatoire chez les Mφs (voir figure 1.5) [97]. Lorsque les Mφs sont dans un environnement anti-inflammatoire (TGF- β , IL-4 et IL-10) ils ont une expression moindre du récepteur CD40, ce qui entraîne un signal faible et une réponse plutôt anti-inflammatoire (voir figure 1.5) [61, 67, 97]. De plus, l'activation de CD40 dans les CD

peut aussi entraîner la production d'IL-10, donc l'inhibition dépendante d'IL-10 de la réponse immunitaire antitumorale [109, 116] (voir figure 1.6).

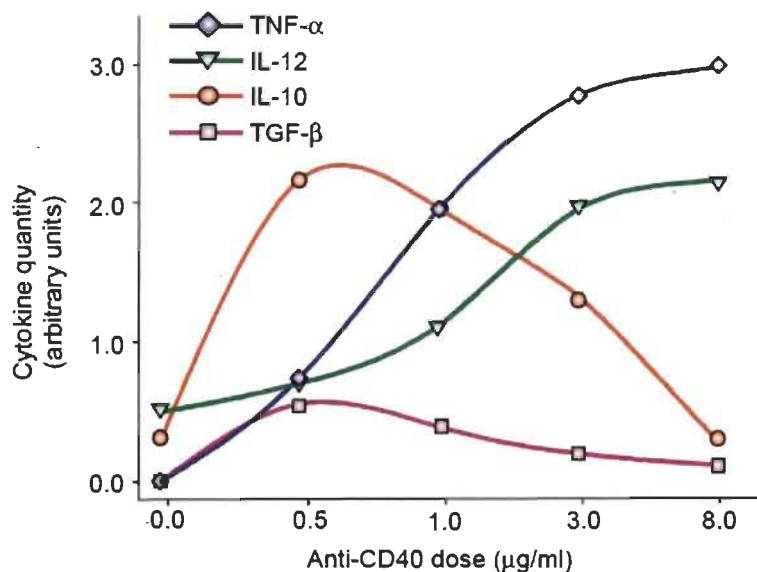


Figure 1.5 Rôle de la force du signal dans le système CD40/CD40L.

Les Mφs murins ont été stimulés avec des doses croissantes d'anti-CD40 et les gènes des cytokines TNF-α, IL-12, IL-10 et TGF-β ont été analysés par RT-PCR. Ce graphique montre que lorsque le signal est faible, la production d'IL-10 est augmentée tandis que si le signal est fort, c'est la production de TNF-α et d'IL-12 qui prévaut. Tiré de [97].

Une réponse immunitaire antitumorale altérée est associée avec une réduction d'expression du CD40L sur les lymphocytes T et du CD40 sur les CD. En effet, Murugaiyan et al [109, 116] ont démontré que les réponses pro- ou anti-tumorales des lymphocytes T peuvent être modulées par le niveau d'expression du CD40 dans les CD. À un faible niveau d'expression, le CD40 promeut la croissance tumorale et à un niveau d'expression plus élevé, il induit la régression tumorale dépendante des lymphocytes T.

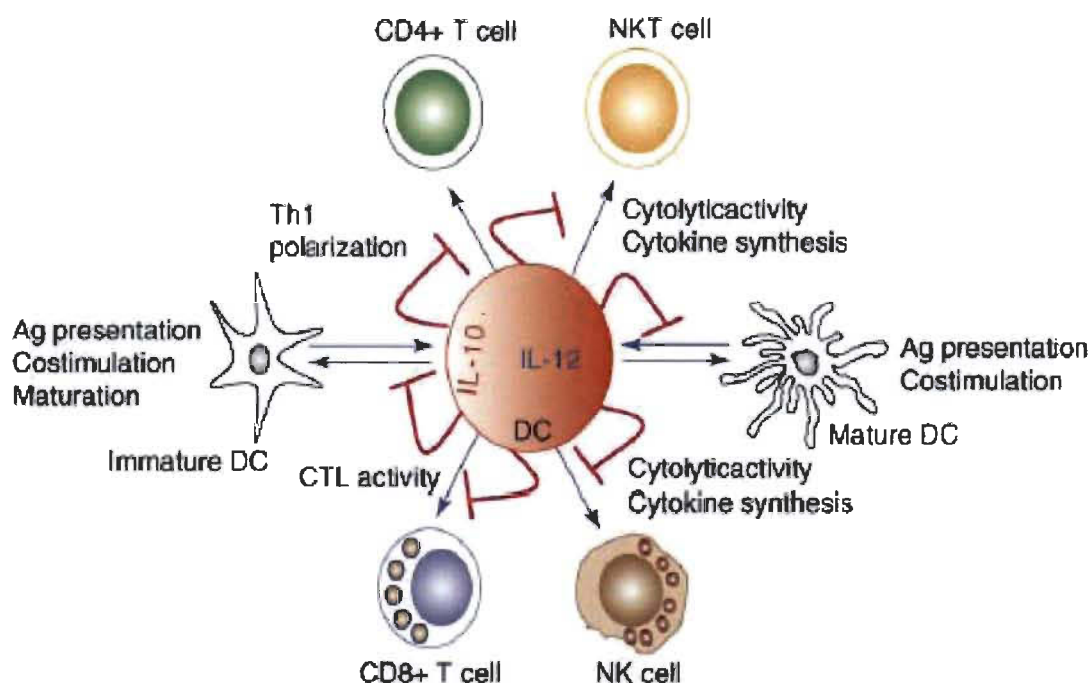


Figure 1.6 Le système CD40/CD40L et la présence d'IL-10.

L'activation du CD40 dans les DC et les Mφs induit la production d'IL-12, ce qui active les lymphocytes TC, les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules de l'immunité innée (flèches bleues). L'activation du CD40 promeut la maturation des CDs et la présentation des antigènes (flèches bleues). L'activation de CD40 induit aussi l'expression de la cytokine protumorale IL-10 qui exerce des effets immunosuppresseifs (flèches rouges). Tiré de [109].

Les lymphocytes Treg sont immunosuppresseifs et ont des rôles à jouer dans l'homéostasie et la progression tumorale [6, 29, 55] et l'interaction CD40-CD40L est aussi impliquée dans la régulation de la population de lymphocytes Treg [97]. En effet, les souris déficientes en CD40 ou traitées avec un anti-CD40L ont moins de lymphocytes Treg dans la circulation sanguine, le thymus et la rate, ce qui suggère que le CD40 est important dans la génération des lymphocytes Treg. De plus, les souris déficientes en CD40 ne peuvent pas maintenir en vie des lymphocytes Treg CD40⁺ de souris de type sauvage, ce qui implique que le CD40 est aussi important pour les lymphocytes Treg [97].

La tumeur sécrète des cytokines et des chimiokines qui peuvent affecter les fonctions des cellules immunitaires et la progression tumorale. En effet, la présence

d'IL-4 et d'IL-10 atténue l'influence pro-inflammatoire de la liaison à CD40L, ce qui diminue l'induction de gènes pro-inflammatoires tels que IL-1 β et *Nitric oxide synthase* (iNOS). La stimulation de certaines lignées cancéreuses avec le CD40L ou un anticorps anti-CD40 entraîne la sécrétion de cytokines telles que l'IL-8 et l'IL-6 dans les cellules du cancer de l'ovaire ou encore l'expression de MMP-9 dans celles du cancer de l'utérus [17, 109, 117]. De plus, l'activation de CD40 dans les cellules cancéreuses induit la production de TGF- β , qui induit à son tour la production de VEGF [17]. Dans un tel scénario, les leucocytes infiltrant la tumeur sont maintenus dans un mode protumoral, car le TGF- β est un facteur de croissance immunosuppresseur [109, 118]. La stimulation du récepteur CD40 dans des cellules de lymphomes non-Hodgkiniens et de cancer du sein entraîne aussi la résistance à plusieurs types de molécules anticancéreuses telles que la doxorubicine et l'étoposide [119]. Dans le cas de la stimulation directe des cellules cancéreuses avec le CD40L, la force du signal est aussi importante [109]. Les observations expérimentales et cliniques suggèrent qu'un haut niveau d'activation de CD40 de façon transitoire a un effet antiprolifératif dans les cellules cancéreuses exprimant le CD40 [116]. Par contre, dans le cas d'une tumeur qui exprime peu de CD40, le traitement avec le CD40L augmente la motilité cellulaire, ce qui est associé avec la métastase [17, 109]. Le stade d'avancement du cancer peut aussi influencer la réponse de l'environnement tumoral à l'activation du récepteur CD40. En effet, les cytokines et les chimiokines présentes au sein de la tumeur varient selon son niveau de progression, ce qui affecte le type, le nombre et le phénotype des leucocytes qui l'infiltrent. Selon leur environnement, les M ϕ s, et possiblement les autres leucocytes stimulés par le CD40, ne répondront pas de la même façon (voir section 4.4) [109].

La combinaison des différents événements résultant de la stimulation des CPA avec le CD40 permet de générer une réponse antitumorale robuste ou encore des fonctions immunosuppressives protumorales [97, 109]. De plus, la façon de stimuler le récepteur CD40 ainsi que l'environnement présent au sein de la tumeur, le stade du cancer et le type de cancer ont des conséquences variables, aggravantes ou protectrices, sur la progression de la maladie [17]. Dans certains types de cancers hématopoïétiques, tels que la leucémie myéloïde aigüe, la leucémie lymphoïde chronique et le myélome

multiple, il y a une augmentation du taux de CD40 soluble qui est associé avec un mauvais pronostic [17, 120]. Il est donc important de poursuivre les recherches sur le CD40 avant d'envisager une utilisation thérapeutique contre un cancer donné.

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Rappel du contexte

Parmi les cancers gynécologiques, le cancer de l'endomètre est le plus courant au Canada (Statistiques canadiennes sur le cancer 2011). Malgré un taux de survie après 5 ans de 85 % (Statistiques canadiennes sur le cancer 2011), le pronostic chez les patientes atteintes d'une forme avancée ou agressive demeure tout de même mauvais [1].

Il est maintenant accepté que le système immunitaire affecte le développement tumoral. En effet, le système immunitaire exerce un double rôle dans la progression tumorale. D'une part, il est capable d'éliminer les tumeurs en développement par l'immunosurveillance et la réponse antitumorale [6, 10, 29, 33]. D'autre part, le système immunitaire est aussi impliqué dans la progression tumorale en favorisant l'apparition de tumeurs avec une immunogénicité moindre et en sécrétant divers facteurs qui promeuvent la carcinogenèse [6, 7, 10, 60, 65]. Les cellules immunitaires ont ainsi un double rôle à jouer dans la progression tumorale. Les macrophages sont capables de tuer les cellules cancéreuses mais, dans la plupart des cas, leurs fonctions protumorales sont dominantes. Mieux comprendre les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires permettrait le développement et l'amélioration de l'immunothérapie [6, 10, 29, 64]. Une des cibles intéressantes pour l'immunothérapie est le récepteur CD40. Ce récepteur se retrouve à la surface des cellules immunitaires, mais aussi à la surface de certaines cellules cancéreuses. Son activation permet, entre autres, de générer une réponse antitumorale via l'activation de l'immunité de type 1. De plus, des études montrent que l'activation du CD40 permet le renversement du milieu immunosuppresseur présent autour de la tumeur, un obstacle à l'immunothérapie, et l'instauration d'une réponse antitumorale même dans les métastases [14-16]. Par contre, l'activation de ce récepteur induit aussi des fonctions immunosuppressives

protumorales, ce qui suggère que le récepteur CD40 joue un double rôle dans la réponse immunitaire face aux tumeurs [109]. Il est donc important de poursuivre les recherches sur le CD40.

2.2 Ligne directrice et objectifs du projet de recherche

Nous avons déjà démontré que les Mφs dérivés de monocytes sanguins et stimulés avec de l'IFN-γ et du LPS pouvaient exercer des activités cytotoxiques et cytostatiques contre les cellules cancéreuses [67]. Des études récentes ont montré que cette action antitumorale des Mφs pouvait être augmentée en activant le récepteur CD40 [121, 122]. L'efficacité thérapeutique du CD40 dans le cadre du cancer de l'endomètre n'a pas encore été démontrée. De plus, le récepteur CD40 est aussi exprimé par les cellules stromales de la tumeur, telles que les Mφs, les fibroblastes et les cellules endothéliales, et l'activation du CD40 à l'interface stroma-tumeur pourraient entraîner des effets multiples [17, 117, 123-125]. Notre hypothèse de recherche est que l'activation du récepteur CD40 pourrait, d'une part, augmenter les fonctions antitumorales des macrophages M1 et, d'autre part, diminuer les fonctions protumorales des macrophages M1 et M2. Afin de répondre à l'hypothèse proposée, l'objectif général de l'étude était de déterminer si et comment les Mφ-1 et les Mφ-2 étaient capables d'exercer une influence sur le cancer de l'endomètre en réponse à l'activation du récepteur CD40. Les objectifs spécifiques étaient les suivants :

1. Caractériser les macrophages activés via le récepteur CD40,
2. Déterminer les rôles des macrophages activés via le récepteur CD40 sur l'activation des cellules cancéreuses de l'endomètre *in vivo* et *in vitro*,
3. Déterminer les mécanismes intracellulaires impliqués dans l'activation des cellules cancéreuses de l'endomètre en réponse aux macrophages activés par le récepteur CD40.

2.3 Méthodologie

Pour étudier les interactions entre les M ϕ -1 ou les M ϕ -2 activés via CD40 avec les cellules cancéreuses de l'endomètre, des études *in vivo* et *in vitro* ont été effectuées. Les études *in vivo* ont été réalisées avec des xénogreffes de cellules cancéreuses de l'endomètre chez des souris nues femelles. Les M ϕ -1 et les M ϕ -2 activés ou non par le CD40 étaient injectés autour de la xénogreffe afin de déterminer leur influence sur la croissance des cellules cancéreuses. Les études *in vitro* ont permis de déterminer la viabilité, l'invasion et l'activation des cellules cancéreuses de l'endomètre en réponse aux facteurs solubles des M ϕ -1 et des M ϕ -2 activés ou non via CD40. La viabilité a été évaluée par des tests de prolifération, la détection de la caspase-3 via l'immunobuvardage de type Western et la détection des cellules mortes par cytométrie de flux. Pour déterminer le niveau d'invasion des cellules cancéreuses en réponse aux facteurs solubles des M ϕ s activés, les cellules ont été cocultivées dans une chambre de Boyden modifiée sans contact cellule-cellule. Le niveau d'activation des cellules cancéreuses en réponse aux facteurs solubles a été évalué de deux façons différentes. Premièrement, l'expression génique pour certaines cytokines pro-inflammatoires a été déterminée par la transcription inverse et la réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR). Deuxièmement, le niveau d'activation de la voie de la PI3-k/Akt a été déterminé par immunobuvardage de type Western. Afin de caractériser davantage les interactions entre les M ϕ s activés via CD40 et les cellules cancéreuses de l'endomètre, les M ϕ s ont été stimulés avec IFN- γ , LPS ou IFN- γ + LPS et la viabilité cellulaire a été étudiée via la cytométrie de flux et l'invasion par la coculture en chambre de Boyden modifiée. De plus, la voie de la PI3-k/Akt a été inhibée à l'aide de shRNA pour déterminer son rôle dans l'invasion des cellules cancéreuses de l'endomètre en réponse aux facteurs solubles des M ϕ s.

CHAPITRE III

CD40 PATHWAY ACTIVATION REVEALS DUAL FUNCTION FOR MACROPHAGES IN HUMAN ENDOMETRIAL CANCER CELL SURVIVAL AND INVASION

GENEVIÈVE DUMAS, MATHIEU DUFRESNE, ÉRIC ASSELIN, JULIE GIROUARD,
CHRISTIAN CARRIER, AND CARLOS REYES-MORENO

L'article a été accepté pour publication le 25 juin 2012 (Epub 18 août 2012) et paru dans le numéro 62 (volume 2) de la revue *Cancer Immunology Immunotherapy* en février 2013 aux pages 273 à 283.

3.1 Contribution des auteurs

Dans l'étude présentée, Mathieu Dufresne a effectué les études *in vivo* chez la souris. Christian Carrier et Mathieu Dufresne ont été impliqués dans la caractérisation phénotypique des macrophages polarisés. Julie Girouard a généré les cellules KLE exprimant de façon stable les *small hairpin ribonucleic acid* (shRNA) pour les trois isoformes d'Akt, soit Akt1, Akt2 et Akt3. En collaboration avec Geneviève Dumas, elle a participé à la réalisation des expériences avec ces cellules. Éric Asselin a procuré certains appareils nécessaires à la réalisation des études biochimiques. Geneviève Dumas a réalisé les autres expériences et participé à la rédaction et la révision du manuscrit avec le professeur Carlos Reyes-Moreno. Tous les auteurs ont accepté le manuscrit final avant qu'il ne soit soumis pour publication.

3.2 Résumé de l'article

Les cancers reproductifs sont une cause majeure de mortalité par le cancer chez les femmes en Amérique du Nord. Le CD40 est un récepteur membre de la famille du TNF

qui, lorsqu'activé, pourrait entraîner la régression tumorale. Par contre, malgré le potentiel important des agonistes du CD40, leur utilisation thérapeutique dans le cadre des cancers reproductifs n'a jamais été étudiée. Comme la liaison du CD40 est une voie d'activation importante pour les Mφs, un modèle *in vitro* de Mφ-1 et de Mφ-2 a été développé pour déterminer si et comment l'activation des Mφs par CD40 pouvait influencer les cellules cancéreuses de l'endomètre. L'analyse cinétique de la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffes du cancer de l'endomètre montre que, lorsqu'injectés une fois dans les tumeurs en croissance, les Mφ-1 activés par CD40 réduisent la tumeur alors que les Mφ-2 augmentent de façon modeste la grosseur de la tumeur par rapport aux Mφ-1 et Mφ-2 sans activation de CD40. Des essais *in vitro* montrent que les Mφ-2 activés par CD40 augmentent la viabilité cellulaire, mais ne promeuvent pas l'invasion cellulaire. Pour leur part, les Mφ-1 activés par CD40 diminuent la survie cellulaire, mais augmentent de façon importante l'invasion cellulaire dans les cellules moins susceptibles à l'apoptose. Ces Mφs induisent aussi l'expression de gènes pro-inflammatoires impliqués dans la promotion tumorale et la métastase tels que l'IL-6 et le TNF- α . La présence d'IFN- γ est un prérequis minimal pour que les Mφ-1 activés par CD40 promeuvent l'invasion des cellules cancéreuses, un processus dirigé en partie par l'activation de la voie de la PI3-K/Akt dans les Mφs et les cellules cancéreuses. À partir de ces résultats, il est évident que l'implication du CD40 dans les interactions entre l'hôte et la tumeur a besoin d'être davantage étudiée avant de recommander le CD40 pour des essais cliniques.

3.3 Article

CD40 pathway activation reveals dual function for macrophages in human endometrial cancer cell survival and invasion

GENEVIÈVE DUMAS^{1*}, MATHIEU DUFRESNE^{1*}, ÉRIC ASSELIN¹, JULIE GIROUARD¹,
CHRISTIAN CARRIER², AND CARLOS REYES-MORENO^{1†}

From ¹Research Group in Molecular Oncology and Endocrinology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières (PQ), Canada, G9A 5H7; ²Haemato-oncologic Service, Centre Hospitalier Régional de Trois-Rivières, Trois-Rivières (PQ), Canada, G8Z 3R9

†**Corresponding author:** Carlos Reyes-Moreno, Department of Chemistry-Biology, University of Quebec at Trois-Rivieres, 3351 boul. des Forges, C.P. 500, Trois-Rivieres, Canada, G9A 5H7. Tel: (819) 376-5011 Ext.: 3308; Fax: (819) 376-5084. E-mail: carlos.reyes-moreno@uqtr.ca

***These authors contributed equally to this work**

Abstract

Reproductive malignancies are a major cause of cancer death in women worldwide. CD40 is a TNF receptor family member which upon activation may mediate tumor regression. However, despite the great potential of CD40 agonists, their use as a therapeutic option for reproductive cancers has never been investigated. Because CD40 ligation is a potent pathway of macrophage activation, an *in vitro* model of pro-inflammatory type-1 (M ϕ -1) and anti-inflammatory type-2 (M ϕ -2) macrophages was developed to determine whether and how macrophage CD40 pathway activation might influence endometrial tumor cell behaviour. Analysis of tumor growth kinetic in the endometrial cancer xenograft model indicates that, when injected once into the growing

tumors, CD40-activated M ϕ -1 greatly reduced while CD40-activated M ϕ -2 increased tumor size when compared to control isotype-activated M ϕ -1 and M ϕ -2, respectively. *In vitro* assays indicated that CD40-activated M ϕ -2 increased cell viability but failed to promote cell invasion. CD40-activated M ϕ -1, in contrast, decreased cell survival but greatly increased cell invasion in tumor cells less susceptible to cell death by apoptosis; they also induced the expression of some pro-inflammatory genes, such as IL-6, LIF and TNF- α , known to be involved in tumor promotion and metastasis. The presence of IFN- γ is minimally required for CD40-activated M ϕ -1 to promote tumor cell invasion, a process that is mediated in part through the activation of the PI3K/Akt2 signaling pathway in tumor cells. From these results, we speculate that some functions of CD40 in tumor-associated M ϕ s might limit the therapeutic development of CD40 agonists in endometrial cancer malignancies.

Keywords: CD40 receptor, endometrial cancer, immunotherapy, polarized macrophages, tumor-stroma interaction.

Introduction

Endometrial cancer (EC) is the most common malignancy of the female genital tract in many countries with incidences increasing in these populations over the past two decades [1]. At initial diagnosis, the majority of these cancers (142,000 cases annually) are curable by means of hysterectomy and radiotherapy [1, 2]. However, because up to 26% of patients still succumb of the disease (about 42,000 related deaths annually worldwide), major efforts must be invested to find alternative therapeutic approaches and identify new therapeutic targets.

The CD40 receptor is a member of the TNF receptor superfamily, which is expressed on many different normal cells, such as macrophages (M ϕ), dendritic cells (DC), B cells, epithelial cells, endothelial cells, and fibroblasts, as well as on transformed cells [3-6]. Consequently, via activation of multiple signal transduction pathways, CD40 ligation mediates a broad variety of immune and inflammatory responses [3-6]. CD40 activation

plays an important role in anti-tumor immune responses [6-10]. Preliminary findings emerging from clinical trials indicate that agonist formulation as monoclonal antibodies (mAbs) to CD40 or soluble CD40 ligand (sCD40L) can enhance the anti-tumor immune response and induce clinical responses in cancer patients with solid and lymphoid malignancies [6-10]. As an alternative approach for novel tumor immunotherapy, CD40 agonists may mediate tumor regression mainly through generation of cytotoxic T cell (CTL) and natural killer (NK) cells responses, or directly by inducing pro-apoptotic and anti-proliferative signaling on CD40-expressing malignant cells [6-10]. We have previously established that monocyte-derived macrophages may direct cytotoxic/cytostatic activities against tumor cells under the influence of interferon (IFN)- γ and lipopolysaccharide (LPS) stimulations [11]. Recent studies indicated that this action can be potently enhanced by ligation of CD40 on M ϕ s *in vitro* [12, 13]. Furthermore, *in vivo* treatment with anti-CD40 mAbs resulted in M ϕ -mediated tumor cell death in immunocompetent and immunodeficient mice [14, 13].

Ongoing phase I clinical evaluation with CD40 agonists in advanced-stage cancer patients showed immune modulation and objective clinical responses [6-10]. The potential anti-tumor effect of CD40 agonists is thus a promising therapeutic approach in EC, but this remains to be established. However, because CD40 is present and functional in tumor cells and probably in tumor stromal cells such as M ϕ s, fibroblasts and endothelial cells as well, the implications of CD40 activation at the tumor-stroma interface are expected to be highly pleiotropic and should be evaluated carefully before targeting CD40 for anti-tumor strategies [17, 117, 123-125]. In this study, the main objective was to investigate whether and how pro-inflammatory type-1 (M ϕ -1) and anti-inflammatory type-2 (M ϕ -2) macrophages are able to influence EC cell behaviour in response to CD40 agonists.

Material and Methods

Reagents, antibodies and chemicals

All cell culture media, serum and cell culture reagents were from Wisent. The cytokines interleukin (IL)-4, IL-10 and interferon IFN- γ were purchased from Peprotech. The mouse anti-CD40 mAb G28.5 was purified from cell culture supernatants of hybridoma cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The isotype-matched IgG1 mAb was from R&D Systems. Human IgG and goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories. The anti-Akt3 was from Upstate Biotech. The HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG was from Bio-Rad Laboratories. BD Matrigel™ basement membrane matrix was from BD Biosciences. Boyden chambers were from Corning. LPS, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reagent, propidium iodide (PI) and all electrophoresis grade chemicals were from Sigma. Trizol reagent and PCR primers were from Invitrogen. Taq DNA polymerase and MMLV reverse transcriptase were from New England Biolabs.

Monocyte-to-macrophage differentiation and activation

Human monocytic cell line THP-1 cells (ATCC number TIB-202) 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). To induce M ϕ differentiation, THP-1 cells were gently washed and cultured for 48 h in serum-free culture media in the absence of cytokines to obtain control cells (M ϕ -O). Pro-inflammatory type-1 phenotype (M ϕ -1) was induced with 100 ng/ml LPS and 25 U/ml IFN- γ , and anti-inflammatory type-2 phenotype (M ϕ -2) was induced with 20 ng/ml IL-4 and 20 ng/ml IL-10. For CD40 activation, M ϕ -1 and M ϕ -2 were stimulated with 500 ng/ml of isotype-matched IgG1 antibody or anti-CD40 mAbs G28.5 (α CD40) as previously described [15-17]. To validate type-1 and type-2 polarization, THP-1 cells were collected after a 6-h stimulation period to evaluate specific gene expression by

RT-PCR analysis and after a 48-h stimulation period to evaluate the expression level of CD40 by flow cytometry and western blot analyses as described [11].

In vitro activation of tumor cells by polarized macrophages

Human EC cell lines Hec1A cells (ATCC number HTB-112), EN-1078D cells [18], KLE cells (ATCC number CRL-1622), and KLE cells stably expressing shRNA for Akt isoforms [19] were stimulated with control media or with conditioned media (CM) from isotype- or CD40-activated M ϕ -1 and M ϕ -2, as described [11]. EC cell viability was evaluated by MTT assays as described [11]. The inactive state of Akt isoforms, the activated state of Akt, and the cleaved form of the apoptosis marker caspase-3 were immunodetected by western blot using EC cells exposed to CM from M ϕ 1/isotype-CM and M ϕ 1/ α CD40-CM. To evaluate the number of dead cells, EC cells were washed and stained for 15 min with 2 μ g/ml PI solution before analysis by flow cytometry. The transwell invasion assay was conducted in a modified Boyden chamber with membrane inserts (8 μ m pore size) pre-coated with Matrigel at 2 mg/ml as described previously [11].

Total RNA extraction and RT-PCR analyses

Total RNA extraction from cultured EC cells, preparation of first strand cDNA by RT, and PCR amplifications were performed as described [11]. The sequences of PCR primers, the fragment length, the annealing temperature and the number of cycles are shown in Table 1. The PCR reaction conditions were chosen when amplification of mRNA was in the middle of the exponential amplification phase to avoid mRNA amplification close to plateau and saturation. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression was used as internal standard.

In vivo activation of tumor cells by polarized macrophages

The EC xenograft model of tumor implants was developed in 6-week-old nude mice (Charles River Laboratories) as previously described [18]. Mice were injected at both

flanks near the posterior legs. To monitor tumor growth, tumor volumes were calculated by caliper measurement twice each week using the formula $0.5 \times \text{length} \times (\text{width})^2$. The proportion of tumor cells into the tumor nodules was also determined using RFP-expressing Hec1A cells and an *in vivo* real-time imaging system (IVIS Imaging System; Caliper Life Sciences). Our pilot studies have determined that all nude mice developed tumors by subcutaneous injections of 2×10^6 RFP-Hec1A cells in 100 μL of 2 mg/mL Matrigel, and that tumor masses were palpable as soon as 7 days after injection. In order to investigate whether polarized M ϕ s could influence tumor cell growth and survival *in vivo*, THP-1-derived M ϕ -1 and M ϕ -2 were mixed with RFP-Hec1A cells before subcutaneous injection on both flanks near the posterior legs of female nude mice. We have established that a minimal ratio of EC cells-to-M ϕ s of 1:2 is compulsory to observe a significant influence of activated M ϕ s on EC growth *in vivo*. To investigate whether CD40-activated M ϕ s are able to regulate tumor cell proliferation *in vivo*, THP-1-derived M ϕ -1 and M ϕ -2 were treated for 24h with 500 ng/ml isotype-matched IgG1 Ab (control groups) or anti-CD40 mAb G28.5 and then injected (4×10^6 cells/100 μL in Matrigel) into the growing (palpable) tumor nodules on day 21 after tumor implantation. All procedures with animals were conducted in accordance with the UQTR animal care committee guidelines.

Statistical analysis

For *in vivo* studies, differences between groups ($n = 8$ mice per group) were determined using two-way ANOVA and the Tukey's and the Mann-Whitney tests (PRISM software version 2.0; GraphPad, San Diego, CA). For *in vitro* studies, data were subjected to one-way ANOVA and differences between experimental groups were determined by the Tukey's test. Values were presented as mean \pm SD from three independent experiments, and significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Polarized THP-1 cell is a valuable model of both type-1 and type-2 Mφs

Phenotypic analysis by flow cytometry using THP-1-derived Mφ-0 as control cells indicates that combined stimulation with LPS/IFN-γ increased the expression of CD40 in THP-1-derived Mφ-1 (Fig. 1A). In contrast, combined stimulation with IL-4/IL-10 slightly increased CD40 expression in THP-1-derived Mφ-2 (Fig. 1A). In accordance with previous studies [20-23], we found that gene expression of pro-inflammatory cytokines IL-12 and tumor necrosis factor (TNF)-α was preferentially high in Mφ-1, whereas gene expression of anti-inflammatory cytokines IL-10 and CCL22 was especially high in Mφ-2 (Online Resource 1). Functionally, CD40 receptor activation in THP-1-derived Mφs leads to the generation of Mφ-1 with an IL-10^{negative}IL-12^{high} profile and Mφ-2 with an IL-10^{high}IL-12^{negative} profile (Fig. 1B). Together these results confirm that polarized THP-1 cell is a valuable cell model to study the regulatory role of CD40-activated type-1 and type-2 Mφs in EC behaviour changes *in vivo* and *in vitro*.

Tumor cell growth is differentially influenced by polarized Mφs

Analysis of tumor growth kinetic indicates that CD40-activated Mφ-1 were more efficient than isotype-activated Mφ-1 to decrease the size of xenografted tumors developing from RFP-Hec1A cells (Fig. 2A). Injection of CD40-activated Mφ-2 at day 21, however, modestly increased tumor size when compared with isotype-activated Mφ-2 (Fig. 2A). Analysis of tumor cell fluorescence intensity by *in vivo* real-time imaging system at day 45 confirm that CD40-activated Mφ-2 discreetly enhanced while CD40-activated Mφ-1 significantly decreased tumor volume when compared to respective control isotype-activated cells (Fig. 2B).

CD40-activated Mφ-1 enhance invasiveness and gene expression in tumor cells

As assessed by MTT assays (Fig. 3A), the number of viable Hec1A cells was reduced when incubated in conditioned media (CM) from isotype-stimulated Mφ-1

(M ϕ 1/isotype-CM) and even more when stimulated with M ϕ 1/ α CD40-CM. The number of viable Hec1A cells increased when incubated in M ϕ 2-CM while significantly increased in M ϕ 2/ α CD40-CM (Fig. 3A). Data from micro-invasion assays (Fig. 3B) indicates that M ϕ -1 but not M ϕ -2 significantly increased tumor cell invasion. Co-incubation of Hec1A cells with THP-1-derived M ϕ -2 does not result in enhanced tumor cell invasion, even if M ϕ -2 were activated via CD40 ligation (Fig. 3B). In order to explore the possibility that tumor cells contribute to the inflammatory process in response to paracrine signals from polarized M ϕ s, we next investigated whether M ϕ -1 and M ϕ -2 have the ability to induce cytokine gene expression in Hec1A cells. Semi-quantitative RT-PCR analysis indicates that gene expression of IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF) and TNF- α was significantly enhanced in Hec1A cells in response to soluble factors from CD40-activated M ϕ -1 when compared with isotype-stimulated M ϕ -1 (Fig. 3C). Inconsistent results were obtained with CD40-activated M ϕ -2: the transcription level of IL-6 is increased while that of LIF is decreased and that of TNF- α is unchanged in response to CD40 ligation (Fig. 3C).

CD40-activated M ϕ -1 increases invasiveness of tumor cells less susceptible to caspase-3 mediated apoptosis

To explore the possibility that the dual influence of CD40-activated M ϕ -1 on tumor cell survival and invasion is not restricted to Hec1A cells, two other human EC cell lines, KLE and EN-1078D cells, were used as experimental models. As shown in figure 4A, the numbers of viable KLE cells and EN-1078D were significantly reduced in M ϕ 1/ α CD40-CM when compared with M ϕ 1/isotype-CM. In regard of Matrigel invasion of KLE cells, the basal level of invasive cells per field was significantly increased when co-cultured with CD40-activated M ϕ -1 (Fig. 4B). However, in contrast to Hec1A and KLE cells, the basal level of invasive EN-1078D cells was increased when co-cultured with isotype-stimulated M ϕ -1, but the level does not increase and remains stable in the presence of CD40-activated M ϕ -1 (Fig. 4B). Having that CD40-activated M ϕ -1 affect EC cell survival, we next investigate whether Hec1A, KLE, and EN-1078D cells are susceptible to apoptosis-inducing factors which are released from pro-inflammatory

M ϕ -1 [11]. Cells were thus exposed to M ϕ 1/isotype-CM and M ϕ 1/ α CD40-CM during 6 h, 24 h and 48 h; after that, the cells were processed for immunodetection of cleaved caspase-3, an apoptosis marker. Maximal effects were observed at 48h and the results are presented in figure 4C. Western blot analysis reveals that cytotoxic factors in both types of CM do not induce caspase-3-dependent apoptosis in Hec1A cells. However, the basal level of cleaved caspase-3 in KLE cells (expressed as cleaved caspase-3/ β -actin ratio) was significantly increased when exposed to M ϕ 1/ α CD40-CM when compared with M ϕ 1/isotype-CM. EN-1078D cells were more sensitive to caspase-3-mediated apoptosis (Fig. 4C).

IFN- γ is minimally required for CD40-activated M ϕ -1 to promote tumor cell invasion

We have previously established that anti-tumor response of M ϕ s can be induced by IFN- γ and/or LPS stimulation [11]. Other independent studies indicate that CD40 ligation increased M ϕ -mediated tumor cell cytotoxicity *in vitro* and *in vivo* through an IFN- γ -dependent mechanism [12-14]. To investigate the minimal requirement responsible for the pro-invasive effect of M ϕ -1 on EC tumor cells, we further examined the priming effects of IFN- γ and LPS toward a type-1 phenotype which causes EC tumor cell death and cell invasion upon CD40 stimulation on M ϕ s. Flow cytometry analysis showed that the basal level of CD40 expression in THP-1 cells gradually increases when stimulated as follows: vehicle (PBS) < LPS < IFN- γ < LPS/IFN- γ (Fig. 5A). In respect of the cytotoxic effects on EN-1078D cells, we found that the percent of dead cells gradually increased with CM from IFN- γ -stimulated THP-1 cells, from LPS-stimulated THP-1 cells, and even more with CM from IFN- γ /LPS-stimulated THP-1 cells (Fig. 5B). In the presence of α CD40 mAbs, the number of dead cells was higher and progressively increased with CM from THP-1 cells stimulated with IFN- γ , LPS, and combined IFN- γ /LPS (Fig. 5B). In regard of Matrigel invasion of Hec1A cells, no pro-invasive effects were observed when they were co-cultured with THP-1 cells which were primed with either PBS + isotype, PBS + α CD40, LPS + isotype, LPS + α CD40 and IFN- γ + isotype (Fig. 5C). In contrast, there is a significant increase in the number of invasive cells per field when THP-1 cells were activated with IFN- γ + α CD40. Activation of

THP-1 cells with IFN- γ and LPS results in an enhanced number of invasive cells, while together they exert a synergistic effect in EC tumor cell invasion after CD40 ligation (Fig. 5C).

Macrophage-mediated tumor cell invasion involves PI3K/Akt2 signaling pathway

We have previously reported that increased invasiveness of bladder cancer T24 cells in response to M ϕ -1-derived factors is in part dependent on tumor cell PI3K/Akt signaling pathway activation [11]. Western blot analysis indicate that paracrine activation of this signaling pathway is also induced by isotype-activated M ϕ -1 and even more by CD40-activated M ϕ -1 in KLE cells, but not in Hec1A and EN-1078D cells (Fig. 6A). Here, we used a well-established model of KLE cells stably expressing shRNA plasmids for Akt1, Akt2 and Akt3 isoforms [19] to further investigate the mechanism by which M ϕ -1 enhance tumor cell invasion via paracrine cell interactions. Micro-invasion assays (Fig. 6B) indicate that there is no difference in the number of invasive cells using Akt1-, Akt2- and Akt3-deficient KLE cells in response to isotype-activated M ϕ -1. However, the increased invasiveness of tumor cells induced in response to CD40-activated M ϕ -1 was completely impeded by Akt2 knockdown, but not by either Akt1 or Akt3 knockdown, in KLE cells (Fig. 6B). Cell signaling studies indicate that Akt2 expression and activation is in part required for CD40-activated M ϕ -1 to increase cell invasiveness in KLE cells (Fig. 6C).

Discussion

Compelling clinical and experimental data suggest that CD40 agonists can be exploited to offer, in one therapy, different anti-cancer approaches: inhibition of tumour cell proliferation, sensitisation to other cytotoxic drugs, improving immunogenicity of tumors, and stimulation of anti-tumor immune responses via activation of DC, CTL, NK cells and M ϕ s [6-10, 12-14]. Engagement of CD40 on pro-inflammatory M ϕ -1 induces the expression of several factors, such as nitric oxide and TNF- α , which are involved in the cytotoxic effector mechanisms of M ϕ s [3, 4]. As expected, we found that injection of

polarized M ϕ s have opposing effects on the growth of tumor xenografts. These results are consistent with previous observations that injection of type-1 cytokine-activated human M ϕ s inhibit while type-2 cytokine-activated human M ϕ s increase the growth of human tumors implanted subcutaneously in immunodeficient mice [24, 25]. We show for the first time that CD40 activation in M ϕ -1 results in efficient tumor growth inhibition but fail to reverse the proliferative effects of M ϕ -2. Indeed, tumor size and fluorescence in the presence of CD40-activated M ϕ s were modestly decreased with M ϕ -1 or increased with M ϕ -2 pointing out on the necessity to sustain their effects by repetitive injections into the tumor mass. Of note, repetitive injections of polarized M ϕ s once a week is expected to imitate a chronic M ϕ -mediated inflammatory response. Thus, although the functional role in cancer development still remains unclear and controversial, CD40 pathway activation may provide an attractive option for future clinical trials in gynecological malignancies [7-10]. However, for several considerations, further investigations are needed in regard of host-tumor interactions prior to recommending clinical trials with CD40 agonists.

First, in advanced-stage EC patients, a subset of invasive tumors were found to be highly enriched with M ϕ s, but the exact role that such inflammatory cells are playing in EC is poorly understood [26-28]. For instance, high number of tumor-infiltrating M ϕ s was significantly associated with clinical manifestations, such as deep myometrial invasion, angiogenesis, and the presence of lymph node metastasis [26-28]. Indeed, tumor-infiltrating M ϕ s are able to exert pro- and anti-tumor effects in the tumor microenvironment depending on their activation state [20-23]. In this context, we have previously established that differentiation of peripheral blood monocytes with IFN- γ and LPS results in pro-inflammatory M ϕ -1 that decreased cell viability of urothelial bladder carcinoma cells while significantly increased their invasiveness [11]. Conversely, after differentiation with combined IL-4 and IL-10, M ϕ -2 support tumor cell survival/proliferation and suppresses the cytotoxic activities of M ϕ -1 via secretion of IL-10 and other soluble factors [11]. In line with our data, a previous study demonstrated that IFN- γ is required to shift CD40-induced cytokine profiles in human DC toward high IL-12 and low IL10 production [29]. In addition, CD40 expression and CD40-triggered

antigen-presentation function in DC are down-regulated via tumor cell-derived IL-10 [30]. Moreover, it was established that CD40-induced IL-10 expression in DC can result in the inhibition of the anti-tumor immune response [31, 32]. From these results and our finding that CD40 receptor activation leads to the generation of M ϕ -2 with an IL-10^{high}IL-12^{negative} profile, it is tempting to presume that some functions of CD40 in tumor-associated M ϕ s [20-23] might limit the therapeutic potential of CD40 agonists to inhibit human EC growth.

Second, CD40 ligation on M ϕ s leads to the production of inflammatory mediators known to be involved in tumor cell motility and invasion, a phenomenon associated with metastatic spread of malignant cells. The listed factors include the cytokines IL-6, TNF- α , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, and transforming growth factor (TGF)- β 1, and the matrix-metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 [3, 4, 6, 8]. This could explain why CD40 activation in M ϕ -1 can boost their cytotoxicity but do not reverse their pro-invasive effects on EC tumor cells. In fact, we have established that CD40-activated M ϕ -1 enhance cell invasion mainly in tumor cells highly resistant to caspase-3-mediated apoptosis. In addition, they enhance expression of tumor cell pro-inflammatory genes known to be involved in tumor promotion, invasion, and metastasis, such as IL-6, LIF and TNF- α [33-35]. Mechanistically, our study provides evidence that CD40-activated M ϕ -1 differentially modulate cell survival and invasion through a synergistic effect of IFN- γ and LPS. Of note, CD40, LPS, and IFN- γ are major ways to induce extracellular matrix degradation via the expression of MMPs by M ϕ s [3, 36-38]. Moreover, it demonstrated that EC cell PI3K/Akt2 pathway activation is partially required during these processes. In one hand, KLE and EN-1078D cells, but not Hec1A cells, are susceptible to apoptosis-inducing factors which are released from pro-inflammatory M ϕ -1; because KLE cells express Akt, but not EN-1078D and Hec1A cells, this effect is probably independent of the PI3K/Akt signaling pathway, but it is probably due to the balance of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors that such cells express [18, 19]. On the other hand, this suggests that the pro-invasive function of CD40-activated M ϕ -1 is independent of the PI3K/Akt2 signaling pathway in Hec1A and EN-1078D cells, and that other pathways could be involved. In this context, our

preliminary data actually shown that soluble factors released from pro-inflammatory M ϕ -1 are able to induce other signaling pathways involved in cell motility and invasion such as the JAK/STAT (Janus-Activated Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription), as well as the MAP kinases p38, ERK, and JNK signaling pathways. Certainly, our study further supports our previously published data suggesting that paracrine activation of the PI3K/Akt signaling pathway in tumor cells by pro-inflammatory M ϕ s is involved in the regulation of tumor cell invasion [11].

Third, CD40-activated M ϕ s are known to be major producers of inflammatory mediators at sites of acute and chronic inflammation [3, 4]. In a pathological setting, the deregulation of CD40 signaling has been associated with M ϕ dysfunction and the pathogenesis of chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and atherosclerosis [39, 40]. Mature M ϕ s are characterized by their plasticity [41] and as observed in chronic inflammatory diseases [39, 40] their normal function could be subverted during tumor development under the influence of activating factors from the tumor microenvironment [20-23].

Finally, normal human endometrium expresses functional CD40 receptor and CD40L, and CD40 activation via CD40L induces uterine fibroblasts and perivascular cells to produce large amounts of the inflammatory cytokines IL-6, IL-8, and MCP-1 [42, 43]. CD40 has been detected in cervical and ovarian carcinoma, with CD40L expressed by infiltrating T cells or the tumor itself [44, 45]. CD40 ligation induces the expression of MCP-1 and MMP-9 in cervical carcinomas, and the expression of IL-6 and IL-8 in ovarian carcinomas [44, 45]. In line with our observation that CD40-activated M ϕ -1 enhance the expression of pro-inflammatory genes in EC cells, these findings further supports the hypothesis that tumor cells contribute to the inflammatory process and that CD40 agonists might play a dual role in pathogenesis and treatment of EC [7, 8, 10].

In conclusion, our study emphasizes the duality of CD40-activated M ϕ s in the immune response to tumors. In the EC xenograft model, CD40 activation in M ϕ -1 results in efficient tumor growth inhibition but fails to reverse the proliferative effects of M ϕ -2.

The presence of IFN- γ is minimally required for CD40-activated M ϕ -1 to promote tumor cell invasion, and the PI3K/Akt2 pathway activation in EC cells may play an important role in this process. To the best of our knowledge, this is the first report showing the dual effects of CD40-activated M ϕ s on the survival and the invasion of reproductive cancer cells. Subsequently, before recommending immunotherapy with CD40 agonists, further studies should be made in order to eliminate the putative pro-tumorigenic effects while preserving the capacity of stimulating anti-tumor immune responses.

Acknowledgments

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 C.R.M. G.D. was supported by the Research Awards Program of the NSERC. J.G. holds a postdoctoral fellowship from the FRSQ. E.A. is holder of the Canada research chair in Molecular Gyneco-Oncology.

Conflict of interest

The authors declare no financial conflict of interest.

References

1. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I (2005) Endometrial cancer. *Lancet* 366:491-505. doi:10.1016/S0140-6736(05)67063-8
2. Sohaib SA, Houghton SL, Meroni R, Rockall AG, Blake P, Reznek RH (2007) Recurrent endometrial cancer: patterns of recurrent disease and assessment of prognosis. *Clin Radiol* 62:28-34; discussion 35-26. doi:10.1016/j.crad.2006.06.015
3. Stout RD, Suttles J (1996) The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today* 17:487-492
4. Schonbeck U, Libby P (2001) The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 58:4-43
5. Peters AL, Stunz LL, Bishop GA (2009) CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin Immunol* 21:293-300. doi:10.1016/j.smim.2009.05.012
6. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ (2009) Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229:152-172. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x
7. Costello RT, Gastaut JA, Olive D (1999) What is the real role of CD40 in cancer immunotherapy? *Immunol Today* 20:488-493
8. Eliopoulos AG, Young LS (2004) The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 4:360-367
9. Vonderheide RH (2007) Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy. *Clinical Cancer Research* 13:1083-1088. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1893
10. Bereznaya NM, Chekhun VF (2007) Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy. *Exp Oncol* 29:2-12
11. Dufresne M, Dumas G, Asselin E, Carrier C, Pouliot M, Reyes-Moreno C (2011) Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells. *Mol Immunol* 48:1556-1567. doi:10.1016/j.molimm.2011.04.022

12. Buhtoiarov IN, Lum H, Berke G, Paulnock DM, Sondel PM, Rakhmilevich AL (2005) CD40 ligation activates murine macrophages via an IFN-gamma-dependent mechanism resulting in tumor cell destruction in vitro. *J Immunol* 174:6013-6022
13. Rakhmilevich AL, Buhtoiarov IN, Malkovsky M, Sondel PM (2008) CD40 ligation in vivo can induce T cell independent antitumor effects even against immunogenic tumors. *Cancer Immunol Immunother* 57:1151-1160. doi:10.1007/s00262-007-0447-4
14. Lum HD, Buhtoiarov IN, Schmidt BE, Berke G, Paulnock DM, Sondel PM, Rakhmilevich AL (2006) In vivo CD40 ligation can induce T-cell-independent antitumor effects that involve macrophages. *J Leukoc Biol* 79:1181-1192. doi:10.1189/jlb.0405191
15. Reyes-Moreno C, Girouard J, Lapointe R, Darveau A, Mourad W (2004) CD40/CD40 Homodimers Are Required for CD40-induced Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Expression of B7.2 by Human B Lymphocytes. *J Biol Chem* 279:7799-7806
16. Girouard J, Reyes-Moreno C, Darveau A, Akoum A, Mourad W (2005) Requirement of the extracellular cysteine at position six for CD40/CD40 dimer formation and CD40-induced IL-8 expression. *Mol Immunol* 42:773-780
17. Reyes-Moreno C, Sharif-Askari E, Girouard J, Leveille C, Jundi M, Akoum A, Lapointe R, Darveau A, Mourad W (2007) Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J Biol Chem* 282:19473-19480
18. Dery MC, Van Themsche C, Provencher D, Mes-Masson AM, Asselin E (2007) Characterization of EN-1078D, a poorly differentiated human endometrial carcinoma cell line: a novel tool to study endometrial invasion in vitro. *Reproductive Biol Endocrinol* 5:38. doi:10.1186/1477-7827-5-38
19. Rouette A, Parent S, Girouard J, Leblanc V, Asselin E (2012) Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells. *Int J Cancer* 130:1755-1767. doi:10.1002/ijc.26183
20. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196:254-265
21. Mosser DM (2003) The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73:209-212

22. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964. doi:10.1038/nri1733
23. Condeelis J, Pollard JW (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263-266
24. Chakraborty NG, Okino T, Stabach P, Padula SJ, Yamase H, Morse E, Sha'afi RI, Twardzik DR, Shultz LJ, Mukherji B (1991) Adoptive transfer of activated human autologous macrophages results in regression of transplanted human melanoma cells in SCID mice. *In Vivo* 5:609-614
25. Craig M, Ying C, Loberg RD (2007) Co-inoculation of prostate cancer cells with U937 enhances tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Cell Biochem* 103:1-8
26. Salvesen HB, Akslen LA (1999) Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 84:538-543
27. Fujimoto J, Aoki I, Khatun S, Toyoki H, Tamaya T (2002) Clinical implications of expression of interleukin-8 related to myometrial invasion with angiogenesis in uterine endometrial cancers. *Ann Oncol* 13:430-434
28. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M (2004) Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Res* 24:3335-3342
29. Conzelmann M, Wagner AH, Hildebrandt A, Rodionova E, Hess M, Zota A, Giese T, Falk CS, Ho AD, Dreger P, Hecker M, Luft T (2010) IFN-gamma activated JAK1 shifts CD40-induced cytokine profiles in human antigen-presenting cells toward high IL-12p70 and low IL-10 production. *Biochem Pharmacol* 80:2074-2086. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.040
30. Shurin MR, Yurkovetsky ZR, Tourkova IL, Balkir L, Shurin GV (2002) Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *Int J Cancer* 101:61-68. doi:10.1002/ijc.10576
31. Murugaiyan G, Agrawal R, Mishra GC, Mitra D, Saha B (2006) Functional dichotomy in CD40 reciprocally regulates effector T cell functions. *J Immunol* 177:6642-6649

32. Murugaiyan G, Martin S, Saha B (2007) Levels of CD40 expression on dendritic cells dictate tumour growth or regression. *Clin Exp Immunol* 149:194-202. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03407.x
33. Balkwill F (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9:361-371
34. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41:2502-2512
35. Mylonas I, Makovitzky J, Shabani N, Richter DU, Kuhn C, Jeschke U, Briesse V, Friese K (2005) Leukaemia inhibitory factor (LIF) is immunohistochemically expressed in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 118:101-108
36. Lu Y, Wahl LM (2005) Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKK α /NF- κ B pathway. *J Leukoc Biol* 78:259-265. doi:10.1189/jlb.0904498
37. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA (1996) Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol* 156:3952-3960
38. Zhou M, Zhang Y, Ardans JA, Wahl LM (2003) Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor- α and caspase 8. *J Biol Chem* 278:45406-45413. doi:10.1074/jbc.M309075200
39. Phipps RP (2000) Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6930-6932
40. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Feldmann M, Paleolog E (2004) T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Current drug targets* 3:35-42
41. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175:342-349. doi:10.1189/1/342 [pii]
42. Kelly RW, King AE, Critchley HO (2002) Inflammatory mediators and endometrial function--focus on the perivascular cell. *J Reprod Immunol* 57:81-93

43. King AE, Kelly RW, Critchley HO, Malmstrom A, Sennstrom M, Phipps RP (2001) Cd40 expression in uterine tissues: a key regulator of cytokine expression by fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 86:405-412
44. Altenburg A, Baldus SE, Smola H, Pfister H, Hess S (1999) CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma. *J Immunol* 162:4140-4147
45. Gallagher NJ, Eliopoulos AG, Agathangelo A, Oates J, Crocker J, Young LS (2002) CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. *Mol Pathol* 55:110-120

Figure captions

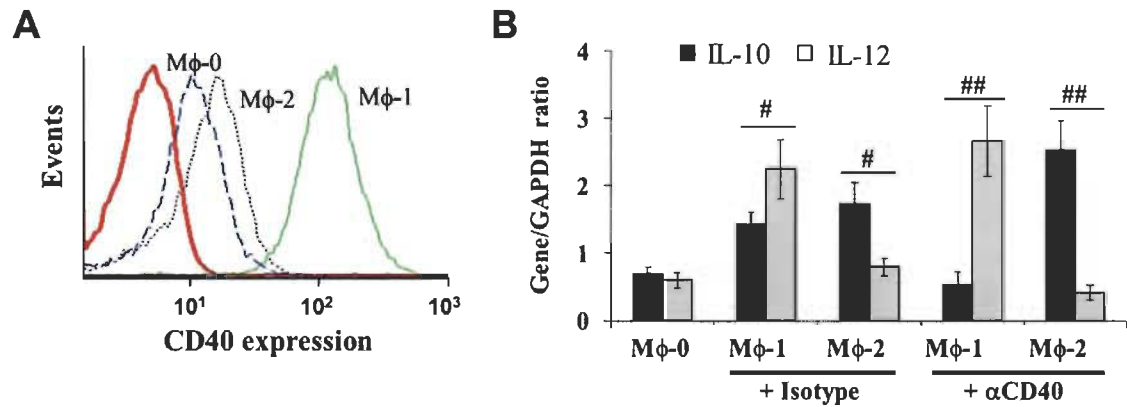


Figure 1

Functional features of polarized Mφs.

(A) Flow cytometry analysis. CD40 expression is higher in Mφ-1 than in Mφ-2 and in control cells. (B) RT-PCR analysis. CD40 activation leads to the generation of Mφ-1 with negative-IL-10 and high-IL-12 expression profile and Mφ-2 with high-IL-10 and negative-IL-12 expression profile. The relative mRNA expression of gene of interest was expressed as gene/GAPDH ratio; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ denote significant difference between groups.

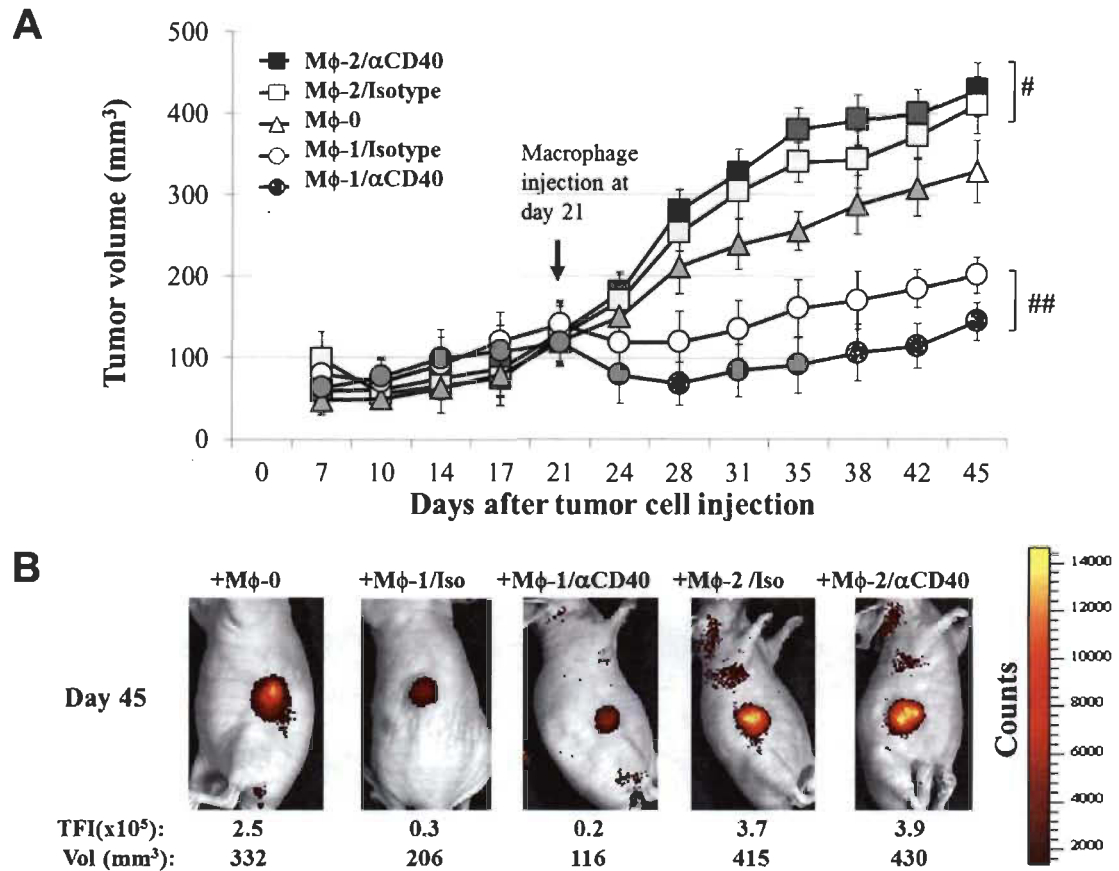
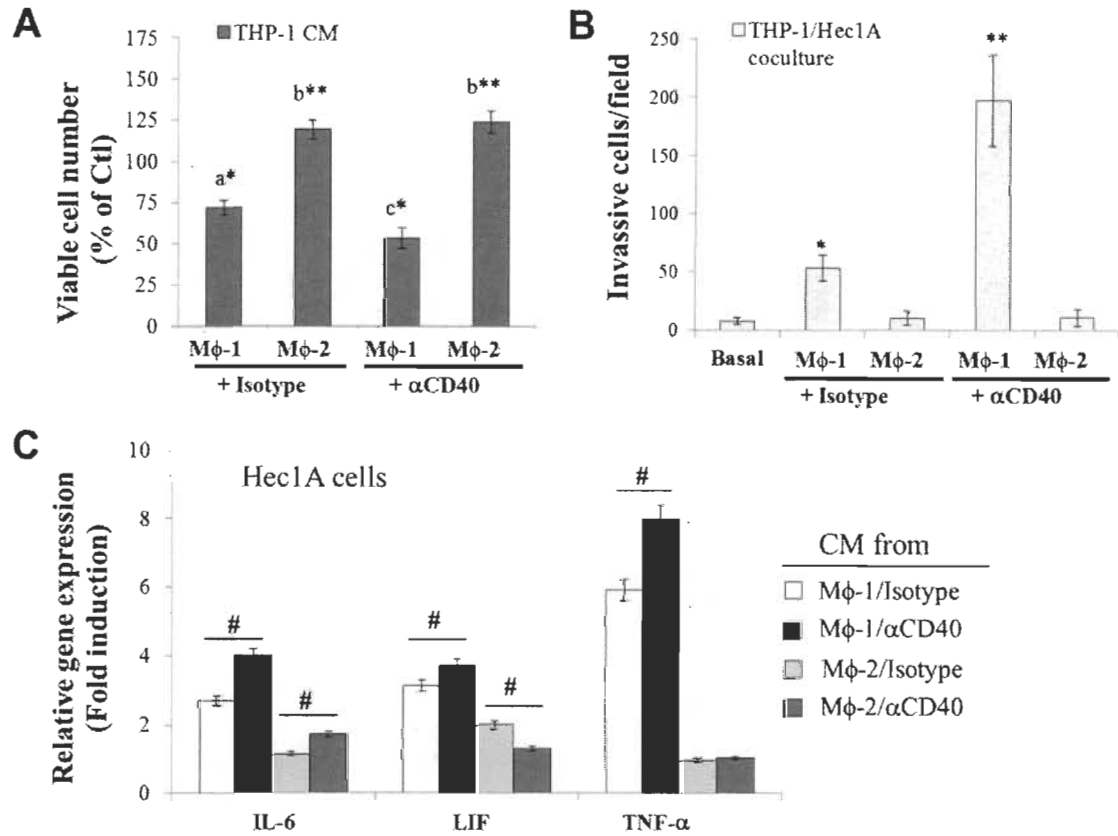


Figure 2 Influence of polarized Mφs on the growth of xenografted endometrial tumors.

(A) Tumor growth kinetic analyses. Control (Mφ-0) and polarized Mφs were injected into the tumor mass on day 21 after implantation of RFP-expressing Hec1A cells. Injection of CD40-activated Mφ-1 decrease tumor size more efficiently than isotype-activated Mφ-1, and CD40-activated Mφ-2 significantly increase tumor size when compared to isotype-activated Mφ-2; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ denote significant difference between groups. (B) Visualisation of tumours cells at the end of the experiment confirm that CD40-activated Mφ-2 enhance while CD40-activated Mφ-1 decrease tumor size compared to respective control isotype-activated cells; representative images of tumour fluorescence intensity are shown.

**Figure 3*****In vitro* activation of Hec1A cells by polarized Mφs.**

(A) MTT assays. Result shows the relative number of viable Hec1A cells which were stimulated for 48 h with CM from polarized Mφs (Mφ1/isotype-CM, Mφ1/αCD40-CM, Mφ2/isotype-CM or Mφ2/αCD40-CM). Different superscripts denote significant differences between groups; * $p < 0.05$, significantly decreased when compared with control mean; ** $p < 0.05$, significantly increased when compared with control mean. (B) Invasion assays. Result shows the number of invasive cells/field after a 48 h co-culture period of Hec1A cells with isotype- and CD40-activated Mφ-1 or Mφ-2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly increased when compared to basal level. (C) RT-PCR analysis. Results show regulation of mRNA expression levels of IL6, LIF and TNFα in Hec1A cells by soluble factors present in Mφ1/isotype-CM, Mφ1/αCD40-CM, Mφ2/isotype-CM and Mφ2/αCD40-CM. The relative mRNA expression of gene of interest (gene/GAPDH ratio) was expressed as fold induction of basal level; # $p < 0.05$, denote significant difference between groups.

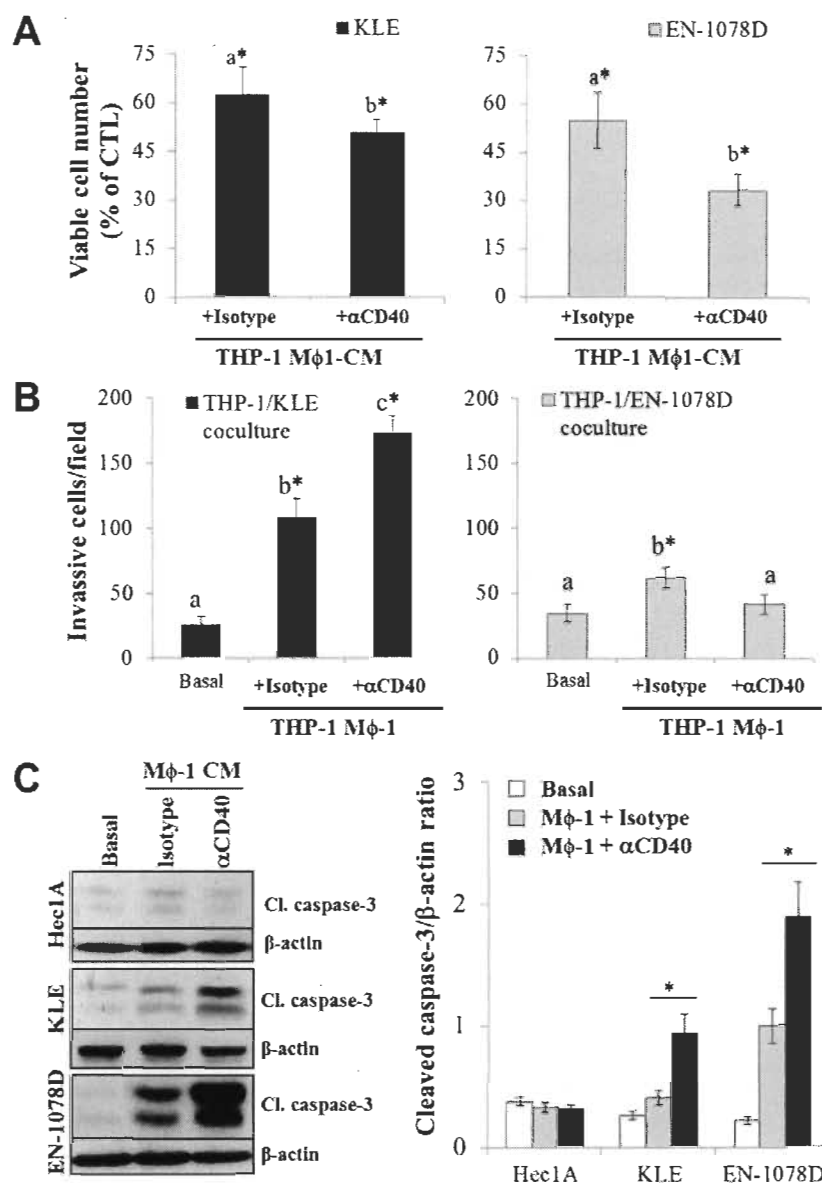


Figure 4 Enhancement of cell invasion by CD40-activated Mφ-1 depends on tumor cell susceptibility to apoptosis.

(A) MTT assays. KLE cells and EN-1078D cells were stimulated for 48 h in control media or with soluble factors from Mφ1/isotype-CM or Mφ1/αCD40-CM. Result shows viable cell number in percent of control mean. Different superscripts denote significant differences between groups; * $p < 0.05$, significantly decreased when compared with control mean (B) Invasion assays. Result shows the number of invasive cells/field alone (basal) or after a 48h co-culture period of KLE cells or EN-1078D cells with isotype- and CD40-activated Mφ-1. Compared with KLE cells, EN-1078D cells are no responsive to the invasiveness induced by Mφ-1/αCD40 macrophages. Different superscripts denote significant differences between groups; * $p < 0.01$, significantly increased when

compared with the basal level of invasive cells. (C) Apoptosis assays. Hec1A, KLE, and EN-1078D cells were stimulated with CM from M ϕ 1/isotype or M ϕ 1/ α CD40 macrophages for 48 h. Results from western blot analysis show expression of cleaved caspase-3 (left panel). The protein β -actin was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments. Relative level of cell apoptosis was expressed as cleaved caspase-3/ β -actin ratio (right panel). Compared with KLE cells, EN-1078D cells are highly sensitive to the apoptosis induced by M ϕ 1/isotype and even more by M ϕ 1/ α CD40 macrophage; * $p < 0.01$, denote significant difference between groups.

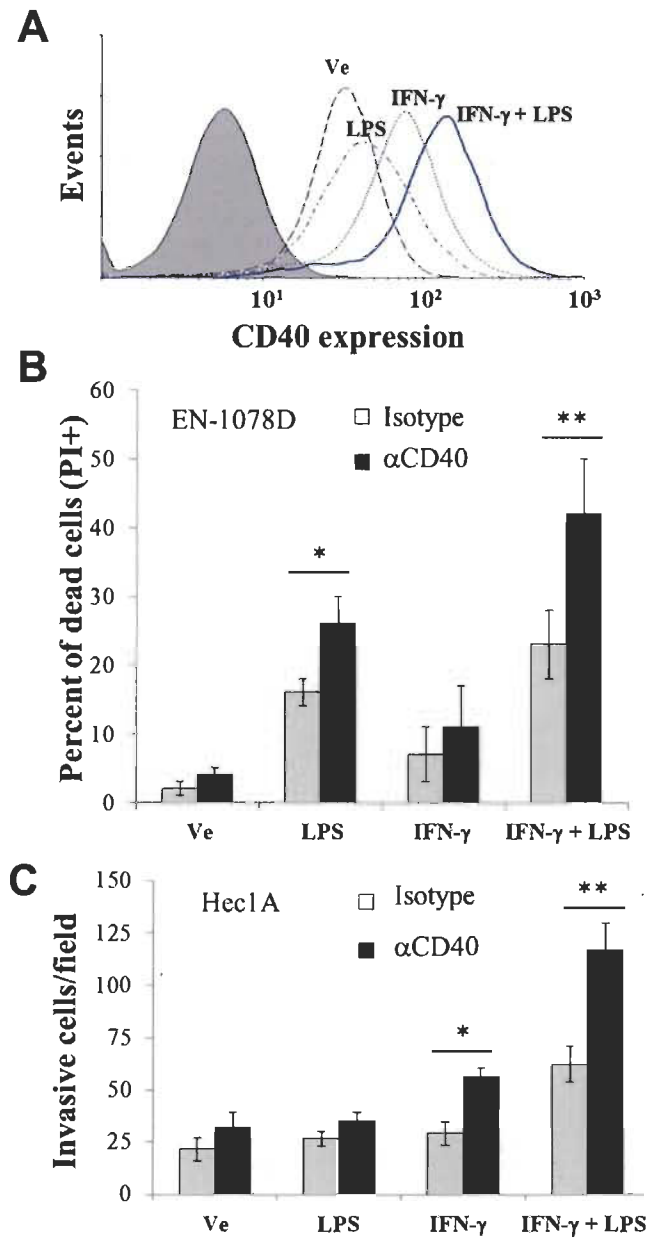


Figure 5 IFN- γ is minimally required for CD40-activated M ϕ -1 to promote tumor cell invasion.

(A) Result from flow cytometry analysis shows the expression level of CD40 in THP-1 cells treated for 48 h with vehicle (Ve), LPS, IFN- γ , and IFN- γ + LPS, in the presence of G8.5 (α CD40) or isotype-matched antibody. Compared with the effects of LPS and IFN- γ alone, combined IFN- γ /LPS induced higher expression levels of CD40. (B) Result from flow cytometry analysis shows the level of cell death (percent of PI positive cells). EN-1078D cells were stimulated for 48 h with control media or CM from THP-1 cells treated with PBS (Ve), LPS, IFN- γ , and IFN- γ + LPS, in the presence of α CD40 or isotype-matched antibody, and then stained with propidium iodide (PI) solution. (C) Result from

invasion assays shows the number of invasive cells/field after 48 h of co-culture of Hec1A cells with THP-1 cells treated with PBS (Ve), LPS, IFN- γ , and IFN- γ + LPS, in the presence of α CD40 or isotype-matched antibody. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denote significant difference between groups.

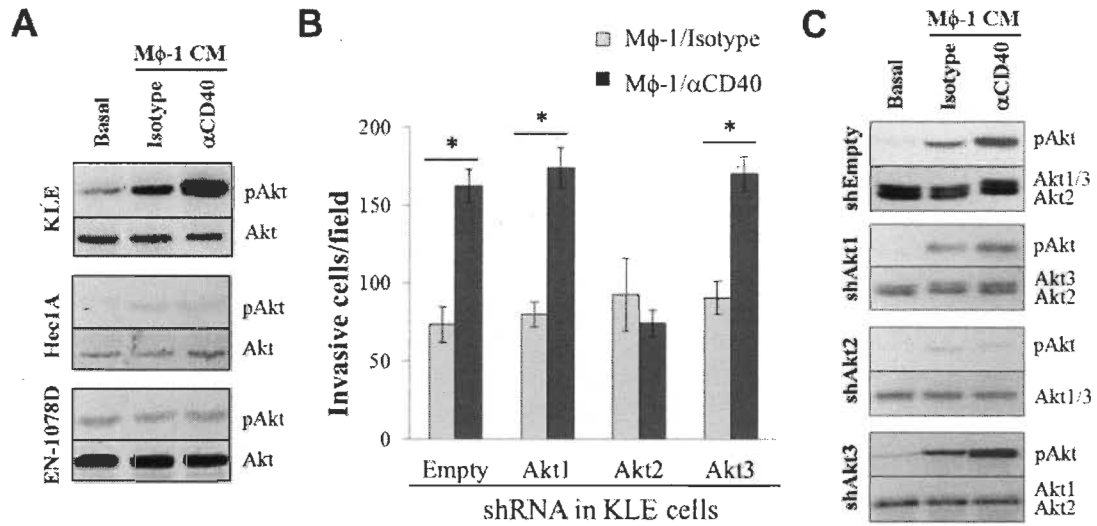
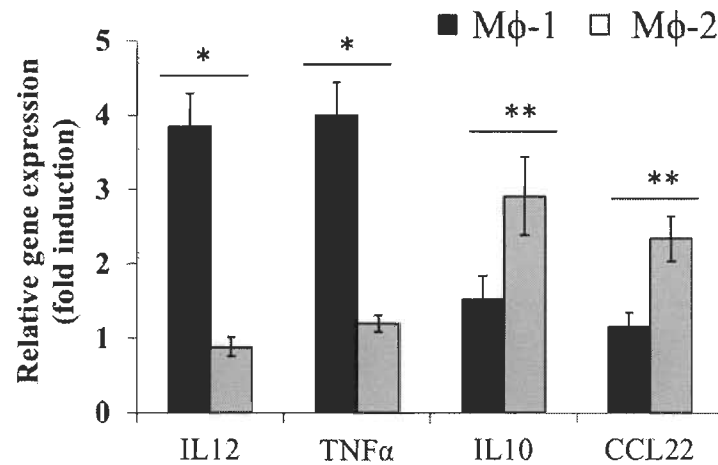


Figure 6

Mφ-1 induced tumor cell invasion via tumor cell PI3K/Akt2 signaling pathway activation.

(A) KLE, Hec1A, and EN-1078D cells were stimulated with control media (basal) or CM from Mφ1/isotype or Mφ1/αCD40 macrophages for 15 min. Result from western blot analysis shows representative expression of phosphorylated/active form of Akt (pAkt) and total Akt, from three independent experiments. (B) KLE cells were transfected with plasmids expressing scramble shRNA (empty) or shRNA against Akt1, Akt2 and Akt3 mRNA. Result shows the number of invasive cells/field after a 48-h co-culture period. * $p < 0.01$ denote significant difference between groups. (C) Control KLE cells (shEmpty) and KLE deficient for Akt1 (shAKt1), Akt2 (shAKt2), and Akt3 (shAkt3) were stimulated with control media (basal) or CM from Mφ1/isotype or Mφ1/αCD40 macrophages for 15 min. Result from western blot analysis shows representative expression of phosphorylated/active form of Akt (pAkt) and total Akt from three independent experiments.



Online Resource 1 Specific gene expression of polarized M ϕ s.

Results from RT-PCR analysis show that mRNA levels of pro-inflammatory cytokines IL-12 and TNF- α are higher in M ϕ -1 while the mRNA levels of anti-inflammatory cytokines IL-10 and CCL22 are higher in M ϕ -2 compared with M ϕ -0 control cells. The relative mRNA expression of gene of interest was expressed as gene/GAPDH ratio. * $p < 0.01$ denote significant difference between groups.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les interactions CD40-CD40L sont importantes pour l'établissement d'une réponse antitumorale en permettant une stimulation du système immunitaire et en dirigeant la réponse immunitaire vers un type Th1 [11, 13, 17]. Les études avec le CD40 en phase clinique 1 dans les cas de plusieurs types de cancers avancés montrent qu'il y a une réponse clinique impliquant une modulation immunitaire [17, 117, 123-125]. Par contre, l'activation du CD40 dans le système immunitaire induit une réponse à prédominance pro-inflammatoire et il a été démontré que l'inflammation est associée au risque de développer un cancer et aussi à la progression du cancer [7, 35, 36, 51, 65, 97, 115]. L'activation du CD40 dans le système immunitaire serait aussi impliquée dans la métastase et dans l'angiogenèse [14]. Le récepteur CD40 est présent sur les membranes des cellules tumorales et dans les cellules stromales de la tumeur, telles que les cellules endothéliales, ce qui pourrait générer des réponses multiples à la suite de la stimulation du récepteur dans la tumeur [17, 117, 123-125]. Nos résultats précédents [67] ont montré que les Mφ-1 obtenus par stimulation avec de l'IFN-γ et du LPS possédaient des activités cytotoxiques/cytostatiques contre les cellules cancéreuses de la vessie. Par contre, ces mêmes macrophages entraînaient une augmentation de l'invasion ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes protumoraux des cellules cancéreuses de la vessie. De plus, il a été démontré que les propriétés antitumorales des Mφ-1 pouvaient être augmentées par l'activation de CD40 [121, 122]. Étant donné l'incidence du cancer de l'endomètre chez les femmes et le mauvais pronostic associé avec les formes avancées de ce cancer, il est important de développer de nouvelles thérapies. En tenant compte des effets dualitaires de l'activation de CD40, l'objectif de l'étude présentée était de déterminer si et comment les Mφ-1 et les Mφ-2 sont capables d'exercer une influence sur le cancer de l'endomètre en réponse à l'activation du récepteur CD40.

Pour atteindre cet objectif, nous avons commencé par démontrer que la lignée cellulaire THP-1 était un modèle valable pour l'étude sur la fonction de CD40 chez les Mφ-1 et les Mφ-2 dans l'activation des cellules cancéreuses de l'endomètre. Dans la littérature, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), une molécule immunomodulatrice, est souvent utilisé pour induire la différenciation des THP-1 en monocytes/macrophages [126-128]. Lors de nos essais préliminaires, nous avons utilisé le PMA pour différencier les THP-1, mais la cytotoxicité était trop élevée même en utilisant de faibles concentrations. Si cette toxicité était souhaitable pour le modèle Mφ-1, elle ne l'était pas pour les Mφ-2 qui ne favorisaient plus la croissance tumorale, mais diminuaient la survie des cellules cancéreuses. Nous avons donc différencié les THP-1 uniquement avec du LPS et de l'IFN-γ pour obtenir des Mφ-1 et avec de l'IL-10 et de l'IL-4 pour obtenir des Mφ-2. Nos résultats montrent que les Mφs ainsi obtenus possèdent des propriétés caractéristiques des Mφ-1 ou des Mφ-2 en plus de pouvoir répondre à l'activation du récepteur CD40.

En accord avec la littérature, nos résultats indiquent que les Mφs polarisés peuvent exercer des effets anti- ou pro-tumoraux *in vivo* et *in vitro* selon leur polarisation [60, 61, 63, 67, 129, 130]. En effet, la présence des Mφ-1 et, de façon plus importante, la présence des Mφ-1 activés via CD40 (CD40/Mφ-1) diminue la taille des xénogreffes sous-cutanées de cellules Hec-1A dans les souris athymiques. Des résultats similaires sont obtenus *in vitro* avec les facteurs solubles des Mφ-1 et des CD40/Mφ-1. Les Mφ-2 et les Mφ-2 activés via CD40 (CD40/Mφ-2) augmentent la taille des xénogreffes de cellules Hec-1A et leurs facteurs solubles augmentent la viabilité des cellules Hec-1A *in vitro*. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent que l'injection de Mφ-1 inhibe tandis que l'injection de Mφ-2 augmente la croissance de tumeurs humaines implantées de façon sous-cutanée chez des souris immunodéficientes [129, 130]. Les résultats obtenus montrent aussi que l'activation du récepteur CD40 dans un Mφ-1 augmente sa capacité antitumorale par rapport au Mφ-1 non stimulé via CD40 [121, 122]. Nous démontrons, pour la première fois, que l'activation du CD40 chez les Mφ-2 ne renverse pas l'effet positif sur la prolifération des cellules tumorales. Les CD40/Mφ-2 ne semblent pas non plus posséder des capacités antitumorales accrues,

mais semblent plutôt avoir des capacités protumorales plus importantes. Les résultats obtenus viennent appuyer l'idée selon laquelle la force du signal que reçoit le récepteur CD40 a un effet sur la réponse de la cellule cible (figure 1.5 dans l'introduction et [97, 109, 116, 131]). En effet, une étude montre qu'une dose élevée de ligand induit une forte activation du récepteur CD40 et entraîne l'activation de la MAPK p38 et une production d'IL-12, une cytokine antitumorale, chez les Mφs [131]. De l'autre côté, une dose faible de ligand induit une activation minimale du récepteur CD40 chez les Mφs et active les MAPK Erk1 et Erk2 et entraîne l'expression d'IL-10, une cytokine protumorale. La même équipe a démontré que ce phénomène se produit également en fonction du niveau d'expression de CD40 à la surface des Mφs [116]. Nos résultats précédents ainsi que ceux présentés dans ce mémoire montrent que les Mφ-1 expriment un niveau de CD40 plus élevé que les Mφ-2, ce qui pourrait expliquer, en partie, pourquoi l'activation de CD40 génère des Mφ-1 avec un profil IL-10^{negatif}IL-12^{haut} et des Mφ-2 avec un profil IL-10^{haut}IL-12^{negatif} [67].

Alors que la présence des CD40/Mφ-2 ou des Mφ-2 n'a pas d'effet sur le niveau d'invasion des cellules Hec-1A, les Mφ-1 et les CD40/Mφ-1 augmentent les capacités invasives ainsi que la production de médiateurs de l'inflammation dans cette lignée cellulaire. Ces résultats indiquent que, même si les Mφ-1 ont des effets antitumoraux, ils ont la capacité d'augmenter le niveau d'invasion des cellules cancéreuses, ce qui avait déjà été démontré dans notre étude sur le cancer de la vessie et dans d'autres études notamment sur le cancer du sein [67, 132, 133]. Ces résultats montrent aussi que le fait de suractiver les Mφ-1 par le CD40 n'est pas suffisant pour augmenter leur cytotoxicité et ainsi inhiber l'augmentation d'invasion dans les cellules Hec-1A. Ces résultats sur l'invasion montrent que les Mφ-1 sont aussi impliqués dans la progression tumorale, ce qui est contraire à plusieurs études qui montrent que les TAM ont plutôt un phénotype de type 2 [60]. Par contre, de nouvelles études montrent que les TAM ont des propriétés combinées des Mφ-1 et des Mφ-2 [33, 52, 63, 74, 76, 134, 135]. Ainsi les propriétés de type Mφ-1 chez les TAM sont la destruction de la matrice extracellulaire par la production des MMPs, et la production de TNF-α, d'IL-6, et d'IL-8 [52, 67, 73, 136-138]. Alors que les fonctions biologiques de type Mφ-2 chez les TAMs sont la

promotion de la survie et de l'angiogenèse, peu de production de NO, de ROI et d'IL-12, l'augmentation de la production d'IL-10 et la suppression de l'immunité antitumorale [60, 62, 139]. D'autres études montrent que les M ϕ -1 seraient probablement en périphérie de la tumeur tandis que les M ϕ -2 infiltreraient la masse tumorale [52, 58, 73]. Cette distribution microanatomique pourrait être expliquée en partie par la présence d'un gradient d'IL-10 dans la tumeur (peu d'IL-10 en périphérie et une forte concentration d'IL-10 au centre de la tumeur) [58]. Les facteurs solubles des M ϕ -1 et, de façon plus importante, ceux des CD40/M ϕ -1 augmentent la production de médiateurs de l'inflammation dans les cellules Hec-1A, ce qui montre qu'ils peuvent contribuer à l'inflammation reliée au cancer.

Les effets observés *in vitro* sur les cellules Hec-1A activées par les M ϕ s polarisés sont aussi observés chez d'autres lignées cellulaires du cancer de l'endomètre. En effet, la stimulation des cellules EN-1078D et des KLE avec les facteurs solubles des M ϕ -1 diminue la viabilité des cellules et cette diminution est plus importante avec les facteurs solubles des CD40/M ϕ -1. Ceci confirme que les M ϕ -1 ont des propriétés antitumorales comme l'indique la littérature et que l'activation du CD40 augmente leur efficacité antitumorale [44, 63, 67, 122]. La présence des M ϕ -1 augmente aussi l'invasion des cellules EN-1078D et des KLE. Ces résultats confirment que les M ϕ -1 ont aussi des effets protumoraux par l'augmentation du niveau d'invasion des cellules cancéreuses. L'activation du CD40 dans les M ϕ -1 augmente l'effet pro-invasif des M ϕ s sur les cellules KLE, mais pas chez les cellules EN-1078D. Dans le but de déterminer si la mortalité cellulaire pouvait être impliquée dans l'incapacité des CD40/M ϕ -1 à augmenter l'invasivité des cellules EN-1078D, nous avons déterminé si ces cellules étaient sensibles à l'apoptose induite par les M ϕ s. Les résultats montrent que les cellules cancéreuses utilisées n'ont pas toutes le même degré de sensibilité à l'apoptose induite par les facteurs toxiques des M ϕ -1. Les cellules Hec-1A sont les moins sensibles et les cellules EN-1078D sont les plus sensibles tandis que les cellules KLE sont de sensibilité intermédiaire en termes de clivage de caspase-3. Lorsque les Hec-1A sont soumises aux facteurs solubles des CD40/M ϕ -1, leur sensibilité à l'apoptose ne change pas par rapport à celle induite par les facteurs solubles des M ϕ -1 même si l'effet cytostatique est plus

important. Bien que les facteurs solubles des M ϕ -1 induisent peu d'apoptose dans les cellules Kle, ceux produits par les CD40/M ϕ -1 augmentent de façon plus importante le niveau d'apoptose, ce qui est en accord avec la littérature [121, 122]. Les mêmes effets sont observés avec les cellules EN-1078D, mais de façon encore plus prononcée. Le fait que les cellules EN-1078D soient très sensibles aux effets toxiques et cytostatiques des CD40/M ϕ -1 pourrait expliquer pourquoi ces derniers n'augmentent pas le niveau d'invasion des EN-1078D par rapport aux M ϕ -1 mais semble plutôt le diminuer. Ces résultats montrent qu'il y a un niveau variable de sensibilité des cellules cancéreuses aux effets antitumoraux des M ϕ -1 et des CD40/M ϕ -1 qui pourrait être causé par une différence entre les médiateurs pro- et anti- prolifératifs/apoptotiques qui sont exprimés par les cellules cancéreuses utilisées.

Ensuite, nous avons déterminé que les M ϕ s stimulés avec une combinaison d'IFN- γ et le LPS ont un niveau d'expression de CD40 plus élevé que lorsqu'ils sont seulement stimulés avec l'INF- γ ou le LPS séparément. L'analyse de la survie des cellules EN-1078D indique que la présence de LPS et d'IFN- γ potentialise l'effet toxique de l'activation du CD40 dans les M ϕ s. D'autres études montrent aussi que la présence d'IFN- γ est importante pour la réponse antitumorale des M ϕ s stimulés par CD40 [14, 15, 44, 121, 122, 140]. Les résultats obtenus avec la présence du LPS sont aussi en accord avec une étude qui montre que la présence du LPS est importante pour les effets antitumoraux des M ϕ s stimulés par CD40 [44]. L'effet pro-invasif des M ϕ s stimulés par CD40 sur les Hec-1A est aussi plus important lorsque les M ϕ s sont stimulés avec l'IFN- γ ou avec l'INF- γ et le LPS. Ces résultats montrent que le niveau d'expression de CD40 est important pour les effets observés, ce qui est en accord avec la littérature [97, 109, 116]. En effet, l'activation du récepteur CD40 dans les M ϕ s permet d'augmenter la production de médiateurs toxiques tels que l'IFN- γ , le TNF- α et le NO, mais aussi de facteurs impliqués dans l'invasion tels que les MMP et le TNF- α [11, 44, 97, 98].

Finalement, l'invasion des cellules cancéreuses induite par les M ϕ s implique en partie l'activation de la voie de la PI3-K/Akt. La kinase Akt qui est impliquée dans la

prolifération cellulaire, la survie, la différenciation, l'invasion et l'angiogénèse dans plusieurs types de cancer [67, 141-144]. De plus, la voie de la PI3-K/Akt promeut la résistance à divers traitements contre le cancer [67, 141-143, 145]. Pour toutes ces raisons, les thérapies ciblant la kinase Akt semblent prometteuses. En effet, l'inhibition de cette voie de signalisation entraîne l'apoptose et inhibe la croissance et l'invasion de plusieurs types de cellules cancéreuses telles que celles de l'ovaire, de la vessie, du sein et de l'endomètre [67, 145-147]. Il y a trois isoformes d'Akt, appelées Akt1, Akt2 et Akt3 et qui ont des actions spécifiques, mais aussi des actions qui se recoupent [144]. Des études à l'aide de souris knockout montrent qu'Akt1 serait impliqué dans la survie et la migration cellulaire, Akt2 dans l'homéostasie du glucose et Akt3 dans le développement du cerveau [144]. De plus en plus d'indications pointent vers des rôles spécifiques de certains isoformes dans le cancer [144]. Par exemple, des études *in vivo* et *in vitro* montrent qu'Akt1 atténue et qu'Akt2 augmente la migration des cellules cancéreuses [144]. Nos résultats montrent que la stimulation des cellules KLE avec les facteurs solubles des Mφ-1, et de façon plus importante ceux des CD40/Mφ-1, induit l'activation d'Akt. L'utilisation d'un modèle déficient pour l'un ou l'autre des trois isoformes d'Akt dans les KLE a permis d'identifier l'isoforme Akt2 comme étant responsable de l'augmentation de l'invasion lorsque les cellules sont stimulées par les CD40/Mφ-1. L'inhibition d'Akt2 dans ce modèle entraîne aussi une diminution de l'activation d'Akt lorsque les cellules sont stimulées avec les facteurs solubles des Mφ-1 et des CD40/Mφ-1. Par rapport à la prolifération, des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer le rôle des isoformes d'Akt sur la prolifération des KLE stimulés par les Mφ-1 et les CD40/Mφ-1. Les cellules EN-1078D et les KLE sont sensibles aux facteurs pro-apoptotiques des Mφ-1 et des CD40/Mφ-1, mais pas les Hec-1A. Cet effet est probablement causé par la balance des facteurs pro- et anti-prolifératifs/apoptotiques qui sont exprimées par ces cellules [18,19]. Les résultats obtenus montrent que les effets pro-invasifs des CD40/Mφ-1 et des Mφ-1 sont indépendants de la voie de la PI3K/Akt chez les cellules EN-1078D et les Hec-1A et que d'autres voies de signalisation sont probablement impliquées. Nos résultats préliminaires montrent que les facteurs solubles des Mφ-1 sont capables d'activer d'autres voies de signalisation telles que la voie JAK/Stat et la voie des MAPK (p38, Erk et JNK).

D'autres études seront nécessaires afin de déterminer les rôles de ces voies dans l'activation des cellules EN-1078D et Hec-1A par les Mφs.

En conclusion, même si l'utilisation d'un agoniste du CD40 comme approche thérapeutique dans le cancer de l'endomètre demeure intéressante car elle augmente les effets anti-tumoraux des Mφ-1, d'autres études seront nécessaires étant donné certaines considérations [17, 117, 124, 125]. En premier lieu, l'activation du CD40 induit l'expression de cytokines, telles que l'IL-6, qui sont impliquées dans le développement du cancer [148]. En deuxième lieu, les Mφs activés via CD40 sont une source majeure de médiateurs de l'inflammation aux sites d'inflammation aiguë et d'inflammation chronique [17, 24, 44, 97, 98]. L'inflammation chronique augmente le risque de cancer et promeut le développement tumoral [7, 35, 36, 51, 64, 65, 149]. De plus, un dysfonctionnement des Mφs causé par une dérégulation de la signalisation du CD40 est associé à certaines maladies découlant de l'inflammation chronique telle que l'arthrite rhumatoïde [150]. Troisième point important, chez les patientes atteintes d'une forme avancée du cancer de l'endomètre, les tumeurs invasives sont hautement infiltrées par les Mφs [21-23, 151]. L'état d'activation des Mφs, qui dépend des signaux perçus dans leur environnement, fera en sorte qu'ils auront des activités pro ou antitumorales [9, 20, 28, 63, 84]. Par contre, la tumeur, en sécrétant différents médiateurs, modifie le microenvironnement, ce qui modifie l'état d'activation des Mφs en le dirigeant vers un phénotype protumoral [6, 28, 52, 58, 67, 71]. Quatrième et dernière considération, l'activation du CD40 dans les Mφs entraîne la production de médiateurs impliqués dans la motilité cellulaire et l'invasion des cellules cancéreuses (MMP, TNF- α , TGF- β , MCP-1, IL-6), ce qui peut entraîner l'apparition de métastases [14, 44, 96-98, 117]. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'activation des Mφ-1 via CD40 peut augmenter leur cytotoxicité tout en augmentant leur capacité pro-invasive.

Au meilleur de nos connaissances, cette étude est la première qui montre les effets dualitaires des Mφs activés via CD40 sur la survie et l'invasion des cellules cancéreuses de l'endomètre. En tenant compte des résultats obtenus, avant de recommander l'immunothérapie avec le CD40, d'autres études sont nécessaires dans le but d'éliminer

les effets protumoraux tout en préservant les effets antitumoraux de l'activation du CD40. Une des approches intéressantes est la thérapie combinatoire. Une des combinaisons présentement étudiée est l'activation du récepteur CD40 avec une autre forme d'immunothérapie. Par exemple, un groupe de chercheurs utilise une combinaison IL-2 et anti-CD40 pour la génération d'une réponse antitumorale dans un modèle murin de cancer rénal [14, 15]. Cette combinaison a pour avantage de renverser le milieu immunosuppresseur entourant la tumeur et l'instauration d'une réponse antitumorale dans les métastases. En effet, les chercheurs ont observé une augmentation de cytokines de type Th1 dans le microenvironnement tumoral, une diminution des cytokines de type Th2 et des Tregs en plus d'une augmentation des lymphocytes CT, des NKs, des lymphocytes B et des Mφs dans la tumeur. Cette thérapie combinatoire met en jeu les Mφs dans les effets anti-métastatiques observés. Le mécanisme anti-métastatique est dépendant de la sécrétion de NO par les Mφs dans la tumeur primaire. Cette sécrétion de NO permet de diminuer l'expression de MMP-2 et -9. Les potentiels métastatiques et invasifs de la tumeur sont ainsi diminués. Cette approche thérapeutique est intéressante, car, en plus d'avoir des effets anti-métastatiques, elle permet de renverser l'immunosuppression, un facteur limitant pour l'immunothérapie [14, 15, 33].

Une deuxième approche est l'activation de CD40 combinée avec la chimiothérapie conventionnelle. Il devient de plus en plus évident que la chimiothérapie a des effets immunologiques importants et, en fait, pourrait dépendre de l'activation de divers mécanismes immunitaires afin d'exercer sa pleine efficacité (voir figure 4.1) [12]. En effet, des études utilisant des modèles murins de tumeurs solides montrent qu'une augmentation de l'inflammation dans la tumeur suivant l'administration de la chimiothérapie prédit un meilleur pronostic alors que les tumeurs dans les souris immunodéficientes ne répondent pas à la chimiothérapie [12, 152, 153]. Ces observations ont permis de mettre en évidence un rôle pour le système immunitaire dans le traitement du cancer par chimiothérapie [12, 152, 153]. Des études sur le cancer du sein proposent que des événements similaires puissent survenir chez l'humain [154, 155]. En effet, il a été démontré que l'infiltration de la tumeur par des lymphocytes prédit une réponse complète chez les patients atteints de cancer du sein traités par

chimiothérapie avant la chirurgie; de plus, la thérapie par le taxol entraîne une augmentation des lymphocytes qui infiltrent la tumeur [154, 155]. Les effets immunomodulateurs de la chimiothérapie reposent sur la présentation des antigènes tumoraux une fois les cellules cancéreuses tuées, l'activation des CPA et la déléation des cellules immunitaires immunosuppressives (voir figure 4.1) [12]. Ces mécanismes demeurent complexes et peu connus pour le moment, mais semblent dépendre du type de chimiothérapie et du type de cellules immunitaires [12].

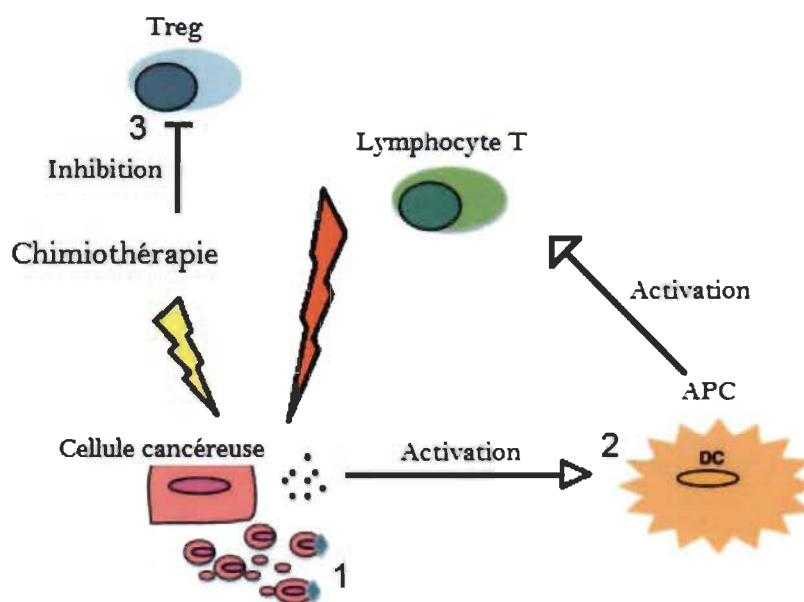


Figure 4.1 Effets immunologiques de la chimiothérapie.

1) La chimiothérapie permet la présentation des antigènes tumoraux une fois les cellules cancéreuses mortes et phagocytées par les cellules immunitaires. 2) La mort des cellules cancéreuses entraîne le relargage de diverses molécules telles que les motifs moléculaires associés au danger qui activent les cellules CPA (Mφs et CD). 3) La chimiothérapie permet l'inhibition des cellules immunosuppressives telles que les Treg. Adapté de [12].

Comme la chimiothérapie utilisée pour le traitement des cancers gynécologiques permet de stimuler le système immunitaire, elle peut être utilisée pour augmenter les propriétés immunologiques d'une autre thérapie, telle l'activation du CD40, ou pour induire une réponse antitumorale *de novo* [12]. Cette approche a été étudiée dans un modèle murin de mésothéliome [156]. Dans cette étude, l'administration de gemcitabine, un analogue de la cytidine, jumelée à l'administration de CD40L permettait

l'élimination des tumeurs, mais aussi une protection à long terme grâce à la génération d'une mémoire immune antitumorale [156].

Finalement, en se basant sur nos résultats déjà publiés [67] et sur ceux de l'étude présentée dans ce mémoire, une approche combinatoire avec le CD40 et un inhibiteur d'Akt pourrait être efficace. En effet, nos résultats montrent que les M ϕ -1 et, de façon plus importante, les CD40/M ϕ -1 ont des propriétés cytotoxiques ou cytostatiques face aux cellules cancéreuses de la vessie et de l'endomètre [67]. Par contre, les M ϕ -1 et, de façon plus prononcée, les CD40/M ϕ -1, entraînent aussi l'augmentation du potentiel invasif de ces cellules cancéreuses [67]. Dans les deux cas, ce mécanisme est médié en partie par l'activation de la voie de la PI3K/Akt [67]. En jumelant l'activation du CD40 et l'inhibition de la voie de la PI3K/Akt, les M ϕ -1 devraient être davantage antitumoraux et leurs effets protumoraux devraient être diminués. De plus, nous avons déjà démontré que, dans le cas du cancer de la vessie, l'inhibition d'Akt n'affecte pas les propriétés cytostatiques des M ϕ -1 [67]. Ces observations montrent que cette approche combinatoire permet d'outrepasser en partie les effets protumoraux induits par l'activation du CD40 sans affecter les propriétés antitumorales.

Les recherches futures devraient viser, entre autre, l'amélioration du modèle murin utilisé. Une façon de faire serait d'injecter de façon répétitive les M ϕ s polarisés autour de la tumeur en développement. De cette façon, le modèle serait plus efficace, car les effets d'une seule injection sont plutôt faibles. Ainsi, une éradication accentuée de la tumeur par les CD40/M ϕ -1 pourrait être espérée. De plus, il serait possible d'espérer un renversement des effets protumoraux avec les CD40/M ϕ -2. Par contre, un modèle murin orthotopique permettrait d'étudier les interactions entre les cellules cancéreuses de l'endomètre et l'hôte de façon plus approfondie [157]. Dans le modèle orthotopique, l'invasion du myomètre, la dispersion des cellules cancéreuses par le système vasculaire et le développement de métastases sont semblables à ce qui est observé chez les patientes atteintes du cancer de l'endomètre [157]. Ces processus sont impossibles dans le modèle sous-cutané. Le modèle orthotopique pourrait ainsi être utilisé pour déterminer le rôle de l'inflammation dans la progression du cancer de l'endomètre. En

effet, en administrant de façon intrapéritonéale de l'acide acétylsalicylique ou du thioglycolate chez les souris il serait possible de moduler l'inflammation et ainsi de déterminer son rôle dans la progression du cancer de l'endomètre. Ce modèle permettrait aussi d'approfondir les résultats *in vivo* obtenus avec les CD40/M ϕ -1 et les M ϕ -1 en ce qui a trait à la croissance des tumeurs en plus d'étudier le rôle de ces M ϕ s dans la métastase du cancer de l'endomètre. Les résultats ainsi obtenus pourraient fournir plus d'informations sur les effets pro- et antitumoraux de l'activation du CD40 dans le cas du cancer de l'endomètre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Marnitz, S. and C. Kohler, *Current therapy of patients with endometrial carcinoma. A critical review*. Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al], 2012. **188**(1): p. 12-20.
2. Garrett, A. and M.A. Quinn, *Hormonal therapies and gynaecological cancers. Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 2008. **22**(2): p. 407-21.
3. Hogberg, T., *What is the role of chemotherapy in endometrial cancer?* Current oncology reports, 2011. **13**(6): p. 433-41.
4. Elit, L., *Endometrial cancer. Prevention, detection, management, and follow up*. Canadian family physician Medecin de famille canadien, 2000. **46**: p. 887-92.
5. Creutzberg, C.L. and R.A. Nout, *The role of radiotherapy in endometrial cancer: current evidence and trends*. Current oncology reports, 2011. **13**(6): p. 472-8.
6. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
7. Balkwill, F., K.A. Charles, and A. Mantovani, *Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease*. Cancer Cell, 2005. **7**(3): p. 211-7.
8. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
9. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies*. J Pathol, 2002. **196**(3): p. 254-65.
10. Smyth, M.J., G.P. Dunn, and R.D. Schreiber, *Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity*. Advances in immunology, 2006. **90**: p. 1-50.
11. Kuwashima, N., et al., *CD40 ligand immunotherapy in cancer: an efficient approach*. Leukemia & lymphoma, 2001. **42**(6): p. 1367-77.

12. Kandalaft, L.E., et al., *The emergence of immunomodulation: combinatorial immunochemotherapy opportunities for the next decade*. Gynecologic oncology, 2010. **116**(2): p. 222-33.
13. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. Journal of leukocyte biology, 2000. **67**(1): p. 2-17.
14. Weiss, J.M., et al., *Macrophage-dependent nitric oxide expression regulates tumor cell detachment and metastasis after IL-2/anti-CD40 immunotherapy*. The Journal of experimental medicine, 2010. **207**(11): p. 2455-67.
15. Weiss, J.M., et al., *Successful immunotherapy with IL-2/anti-CD40 induces the chemokine-mediated mitigation of an immunosuppressive tumor microenvironment*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(46): p. 19455-60.
16. Murphy, W.J., et al., *Synergistic anti-tumor responses after administration of agonistic antibodies to CD40 and IL-2: coordination of dendritic and CD8+ cell responses*. Journal of immunology, 2003. **170**(5): p. 2727-33.
17. Bereznaya, N.M. and V.F. Chekhun, *Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy*. Experimental oncology, 2007. **29**(1): p. 2-12.
18. Modugno, F., et al., *Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(12): p. 2840-7.
19. Wallace, A.E., et al., *Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma*. J Endocrinol, 2010. **206**(2): p. 141-57.
20. Condeelis, J. and J.W. Pollard, *Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis*. Cell, 2006. **124**(2): p. 263-6.
21. Salvesen, H.B. and L.A. Akslen, *Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas*. Int J Cancer, 1999. **84**(5): p. 538-43.
22. Fujimoto, J., et al., *Clinical implications of expression of interleukin-8 related to myometrial invasion with angiogenesis in uterine endometrial cancers*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO, 2002. **13**(3): p. 430-4.

23. Ohno, S., et al., *Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer*. Anticancer Res, 2004. **24**(5C): p. 3335-42.
24. Stout, R.D. and J. Suttles, *The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses*. Immunol Today, 1996. **17**(10): p. 487-92.
25. Peters, A.L., L.L. Stunz, and G.A. Bishop, *CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 293-300.
26. Elgueta, R., et al., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 152-72.
27. King, A.E., et al., *Cd40 expression in uterine tissues: a key regulator of cytokine expression by fibroblasts*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2001. **86**(1): p. 405-12.
28. Sica, A., et al., *Macrophage polarization in tumour progression*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(5): p. 349-55.
29. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. Immunology, 2007. **121**(1): p. 1-14.
30. Pham, S.M., et al., *Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer*. The Annals of thoracic surgery, 1995. **60**(6): p. 1623-6.
31. Pardoll, D., *Does the immune system see tumors as foreign or self?* Annual review of immunology, 2003. **21**: p. 807-39.
32. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
33. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, *Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses*. Cancer biology & therapy, 2005. **4**(9): p. 924-33.
34. Todryk, S., et al., *Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake*. Journal of immunology, 1999. **163**(3): p. 1398-408.

35. Aggarwal, B.B. and P. Gehlot, *Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients?* Current opinion in pharmacology, 2009. **9**(4): p. 351-69.
36. Allavena, P., et al., *Pathways connecting inflammation and cancer.* Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 3-10.
37. Mantovani, A., et al., *Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion.* Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 315-22.
38. Smyth, M.J., et al., *Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma.* The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(5): p. 755-60.
39. Ishigami, S., et al., *Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer.* Cancer Lett, 2000. **159**(1): p. 103-8.
40. Dighe, A.S., et al., *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors.* Immunity, 1994. **1**(6): p. 447-56.
41. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
42. Street, S.E., E. Cretney, and M.J. Smyth, *Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis.* Blood, 2001. **97**(1): p. 192-7.
43. Street, S.E., et al., *Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma.* The Journal of experimental medicine, 2002. **196**(1): p. 129-34.
44. Buhtoiarov, I.N., et al., *CD40 ligation activates murine macrophages via an IFN-gamma-dependent mechanism resulting in tumor cell destruction in vitro.* Journal of immunology, 2005. **174**(10): p. 6013-22.
45. Gollob, J.A., et al., *Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN-gamma.* Cancer research, 2005. **65**(19): p. 8869-77.

46. Qin, Z., et al., *A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells*. Cancer research, 2003. **63**(14): p. 4095-100.
47. Wall, L., et al., *IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2003. **9**(7): p. 2487-96.
48. Wang, W., et al., *Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility*. Trends in cell biology, 2005. **15**(3): p. 138-45.
49. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 798-809.
50. Sica, A., P. Allavena, and A. Mantovani, *Cancer related inflammation: the macrophage connection*. Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 204-15.
51. Colotta, F., et al., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis, 2009. **30**(7): p. 1073-81.
52. Van Ginderachter, J.A., et al., *Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 487-501.
53. Bui, J.D. and R.D. Schreiber, *Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?* Current opinion in immunology, 2007. **19**(2): p. 203-8.
54. Terabe, M. and J.A. Berzofsky, *Immunoregulatory T cells in tumor immunity*. Current opinion in immunology, 2004. **16**(2): p. 157-62.
55. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. The Journal of experimental medicine, 1998. **188**(2): p. 287-96.
56. Onizuka, S., et al., *Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody*. Cancer research, 1999. **59**(13): p. 3128-33.
57. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity*. Journal of immunology, 1999. **163**(10): p. 5211-8.

58. Solinas, G., et al., *Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1065-73.
59. Chen, R., et al., *Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway*. American journal of reproductive immunology, 2007. **57**(2): p. 93-107.
60. Mantovani, A., P. Allavena, and A. Sica, *Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression*. Eur J Cancer, 2004. **40**(11): p. 1660-7.
61. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
62. Sica, A., et al., *Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages*. Journal of immunology, 2000. **164**(2): p. 762-7.
63. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nature reviews. Immunology, 2008. **8**(12): p. 958-69.
64. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
65. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
66. Corinti, S., et al., *Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions*. Journal of immunology, 2001. **166**(7): p. 4312-8.
67. Dufresne, M., et al., *Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells*. Mol Immunol, 2011.
68. Bondanza, A., et al., *Inhibition of phosphatidylserine recognition heightens the immunogenicity of irradiated lymphoma cells in vivo*. The Journal of experimental medicine, 2004. **200**(9): p. 1157-65.
69. Schoppmann, S.F., et al., *Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis*. The American journal of pathology, 2002. **161**(3): p. 947-56.

70. Cursiefen, C., et al., *VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment*. The Journal of clinical investigation, 2004. **113**(7): p. 1040-50.
71. Stout, R.D., S.K. Watkins, and J. Suttles, *Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1105-9.
72. Hanada, T., et al., *Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer*. Int J Urol, 2000. **7**(7): p. 263-9.
73. Duffield, J.S., *The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde*. Clin Sci (Lond), 2003. **104**(1): p. 27-38.
74. Laskin, D.L., *Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces*. Chem Res Toxicol, 2009. **22**(8): p. 1376-85.
75. Stout, R.D. and J. Suttles, *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 509-13.
76. Biswas, S.K., A. Sica, and C.E. Lewis, *Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2011-7.
77. Porcheray, F., et al., *Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation*. Clinical and experimental immunology, 2005. **142**(3): p. 481-9.
78. Clark, C.E., et al., *Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion*. Cancer research, 2007. **67**(19): p. 9518-27.
79. Lin, E.Y., et al., *Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy*. The Journal of experimental medicine, 2001. **193**(6): p. 727-40.
80. Lawrence, T., *Inflammation and cancer: a failure of resolution?* Trends in pharmacological sciences, 2007. **28**(4): p. 162-5.
81. Lewis, C.E. and J.W. Pollard, *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. Cancer research, 2006. **66**(2): p. 605-12.
82. Leek, R.D., et al., *Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4625-9.

83. Lin, E.Y., et al., *Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer*. Cancer research, 2006. **66**(23): p. 11238-46.
84. Ma, J., et al., *The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 112.
85. Urban, J.L., et al., *Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(14): p. 5233-7.
86. Hibbs, J.B., Jr., et al., *Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule*. Biochemical and biophysical research communications, 1988. **157**(1): p. 87-94.
87. Keller, R., M. Geiges, and R. Keist, *L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor cell killing by activated macrophages*. Cancer research, 1990. **50**(5): p. 1421-5.
88. Gorrin-Rivas, M.J., et al., *Implications of human macrophage metalloelastase and vascular endothelial growth factor gene expression in angiogenesis of hepatocellular carcinoma*. Annals of surgery, 2000. **231**(1): p. 67-73.
89. Siegert, A., et al., *Suppression of the reactive oxygen intermediates production of human macrophages by colorectal adenocarcinoma cell lines*. Immunology, 1999. **98**(4): p. 551-6.
90. Jenkins, D.C., et al., *Roles of nitric oxide in tumor growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(10): p. 4392-6.
91. Elgert, K.D., D.G. Alleva, and D.W. Mullins, *Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection*. Journal of leukocyte biology, 1998. **64**(3): p. 275-90.
92. Hagemann, T., et al., *"Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB*. J Exp Med, 2008. **205**(6): p. 1261-8.
93. Saccani, A., et al., *p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance*. Cancer research, 2006. **66**(23): p. 11432-40.

94. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF*. The Journal of clinical investigation, 1998. **101**(4): p. 890-8.
95. Weigert, A., et al., *Tumor cell apoptosis polarizes macrophages role of sphingosine-1-phosphate*. Molecular biology of the cell, 2007. **18**(10): p. 3810-9.
96. Alexandroff, A.B., et al., *Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours*. Molecular immunology, 2000. **37**(9): p. 515-26.
97. Mathur, R.K., A. Awasthi, and B. Saha, *The conundrum of CD40 function: host protection or disease promotion?* Trends in parasitology, 2006. **22**(3): p. 117-22.
98. Lum, H.D., et al., *In vivo CD40 ligation can induce T-cell-independent antitumor effects that involve macrophages*. Journal of leukocyte biology, 2006. **79**(6): p. 1181-92.
99. Turner, J.G., et al., *Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 89-94.
100. Hill, S.C., et al., *Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis*. Journal of immunology, 2005. **174**(1): p. 41-50.
101. van den Oord, J.J., et al., *CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma*. The American journal of pathology, 1996. **149**(6): p. 1953-61.
102. Gallagher, N.J., et al., *CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion*. Molecular pathology: MP, 2002. **55**(2): p. 110-20.
103. Altenburg, A., et al., *CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma*. Journal of immunology, 1999. **162**(7): p. 4140-7.
104. von Leoprechting, A., et al., *Stimulation of CD40 on immunogenic human malignant melanomas augments their cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis and induces apoptosis*. Cancer research, 1999. **59**(6): p. 1287-94.

105. Tong, A.W., et al., *Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer*. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2001. **7**(3): p. 691-703.
106. Hirano, A., et al., *Inhibition of human breast carcinoma growth by a soluble recombinant human CD40 ligand*. Blood, 1999. **93**(9): p. 2999-3007.
107. Hakkarainen, T., et al., *CD40 is expressed on ovarian cancer cells and can be utilized for targeting adenoviruses*. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2003. **9**(2): p. 619-24.
108. Mackey, M.F., et al., *Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154*. Cancer research, 1997. **57**(13): p. 2569-74.
109. Murugaiyan, G., S. Martin, and B. Saha, *CD40-induced countercurrent conduits for tumor escape or elimination?* Trends in immunology, 2007. **28**(11): p. 467-73.
110. Oflazoglu, E., et al., *Macrophages and Fc-receptor interactions contribute to the antitumour activities of the anti-CD40 antibody SGN-40*. British journal of cancer, 2009. **100**(1): p. 113-7.
111. Law, C.L., et al., *Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody, SGN-40*. Cancer research, 2005. **65**(18): p. 8331-8.
112. Tai, Y.T., et al., *Human anti-CD40 antagonist antibody triggers significant antitumor activity against human multiple myeloma*. Cancer research, 2005. **65**(13): p. 5898-906.
113. Wurtz, O., M. Bajenoff, and S. Guerder, *IL-4-mediated inhibition of IFN-gamma production by CD4+ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms*. International immunology, 2004. **16**(3): p. 501-8.
114. Akdis, C.A. and K. Blaser, *Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression*. Immunology, 2001. **103**(2): p. 131-6.
115. Gorelik, L., S. Constant, and R.A. Flavell, *Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation*. The Journal of experimental medicine, 2002. **195**(11): p. 1499-505.

116. Murugaiyan, G., et al., *Differential CD40/CD40L expression results in counteracting antitumor immune responses*. Journal of immunology, 2007. **178**(4): p. 2047-55.
117. Eliopoulos, A.G. and L.S. Young, *The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 360-7.
118. Suttles, J. and R.D. Stout, *Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 257-64.
119. Voorzanger-Rousselot, N., M. Favrot, and J.Y. Blay, *Resistance to cytotoxic chemotherapy induced by CD40 ligand in lymphoma cells*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3381-7.
120. Hock, B.D., et al., *Circulating levels and clinical significance of soluble CD40 in patients with hematologic malignancies*. Cancer, 2006. **106**(10): p. 2148-57.
121. Buhtoiarov, I.N., et al., *CD40 ligation activates murine macrophages via an IFN-gamma-dependent mechanism resulting in tumor cell destruction in vitro*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6013-22.
122. Rakhmilevich, A.L., et al., *CD40 ligation in vivo can induce T cell independent antitumor effects even against immunogenic tumors*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2008. **57**(8): p. 1151-60.
123. Elgueta, R., et al., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. Immunological reviews, 2009. **229**(1): p. 152-72.
124. Costello, R.T., J.A. Gastaut, and D. Olive, *What is the real role of CD40 in cancer immunotherapy?* Immunol Today, 1999. **20**(11): p. 488-93.
125. Vonderheide, R.H., *Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2007. **13**(4): p. 1083-8.
126. Park, E.K., et al., *Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli*. Inflamm Res, 2007. **56**(1): p. 45-50.
127. Daigneault, M., et al., *The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8668.

128. Li, Y., et al., *Bryostatin 1 (bryol)-induced monocytic differentiation in THP-1 human leukemia cells is associated with enhanced c-fyn tyrosine kinase and M-CSF receptors*. Leukemia research, 1997. **21**(5): p. 391-7.
129. Chakraborty, N.G., et al., *Adoptive transfer of activated human autologous macrophages results in regression of transplanted human melanoma cells in SCID mice*. In Vivo, 1991. **5**(6): p. 609-14.
130. Craig, M., C. Ying, and R.D. Loberg, *Co-inoculation of prostate cancer cells with U937 enhances tumor growth and angiogenesis in vivo*. J Cell Biochem, 2007.
131. Mathur, R.K., et al., *Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 540-4.
132. Hagemann, T., et al., *Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 1197-205.
133. Hagemann, T., et al., *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): p. 1543-9.
134. Tsai, C.S., et al., *Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth*. International journal of radiation oncology, biology, physics, 2007. **68**(2): p. 499-507.
135. Sugai, H., et al., *Characteristic alteration of monocytes with increased intracellular IL-10 and IL-12 in patients with advanced-stage gastric cancer*. The Journal of surgical research, 2004. **116**(2): p. 277-87.
136. Ueno, T., et al., *Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3282-9.
137. Nesbit, M., et al., *Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells*. Journal of immunology, 2001. **166**(11): p. 6483-90.
138. Giraudo, E., M. Inoue, and D. Hanahan, *An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis*. The Journal of clinical investigation, 2004. **114**(5): p. 623-33.

139. Guiducci, C., et al., *Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection*. Cancer research, 2005. **65**(8): p. 3437-46.
140. Lum, H.D., et al., *In vivo CD40 ligation can induce T-cell-independent antitumor effects that involve macrophages*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1181-92.
141. Dimmeler, S. and A.M. Zeiher, *Akt takes center stage in angiogenesis signaling*. Circulation research, 2000. **86**(1): p. 4-5.
142. Gagnon, V., et al., *AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells*. Gynecol Oncol, 2004. **94**(3): p. 785-95.
143. Gagnon, V., et al., *Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol*. Apoptosis, 2008. **13**(2): p. 259-71.
144. Gonzalez, E. and T.E. McGraw, *The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer*. Cell Cycle, 2009. **8**(16): p. 2502-8.
145. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance*. Adv Enzyme Regul, 2006. **46**: p. 249-79.
146. Rouette, A., et al., *Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2012. **130**(8): p. 1755-67.
147. Jin, X., et al., *Inhibition of AKT survival pathway by a small molecule inhibitor in human endometrial cancer cells*. Br J Cancer, 2004. **91**(10): p. 1808-12.
148. Urashima, M., et al., *CD40 ligand triggered interleukin-6 secretion in multiple myeloma*. Blood, 1995. **85**(7): p. 1903-12.
149. Michaud, D.S., *Chronic inflammation and bladder cancer*. Urol Oncol, 2007. **25**(3): p. 260-8.
150. Monaco, C., et al., *T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases*. Current drug targets. Inflammation and allergy, 2004. **3**(1): p. 35-42.

151. Soeda, S., et al., *Tumor-associated macrophages correlate with vascular space invasion and myometrial invasion in endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 2008. **109**(1): p. 122-8.
152. Kepp, O., et al., *Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment*. Apoptosis: an international journal on programmed cell death, 2009. **14**(4): p. 364-75.
153. Obeid, M., et al., *Leveraging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from "silent" to immunogenic*. Cancer research, 2007. **67**(17): p. 7941-4.
154. Demaria, S., et al., *Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy*. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2001. **7**(10): p. 3025-30.
155. Denkert, C., et al., *Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2010. **28**(1): p. 105-13.
156. Nowak, A.K., B.W. Robinson, and R.A. Lake, *Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors*. Cancer research, 2003. **63**(15): p. 4490-6.
157. Doll, A., et al., *An orthotopic endometrial cancer mouse model demonstrates a role for RUNX1 in distant metastasis*. Int J Cancer, 2009. **125**(2): p. 257-63.