

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CANCER ET COAGULOPATHIES : LES IMPLICATIONS DU FACTEUR
TISSULAIRE DANS LA PROGRESSION TUMORALE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
KIRGIAKOULA KALOMIRIS

JUILLET 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement n°8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont travaillé avec moi tout le long de ma maîtrise. Plus particulièrement, mon directeur de recherche, le Dr Richard Béliveau qui m'a accueillie dans son équipe au Laboratoire de médecine moléculaire. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée ainsi que pour cette belle aventure. Je tiens également à remercier le Dr Denis Gingras pour le temps qu'il m'a attribué ainsi que pour sa patience, ses nombreux conseils et son expertise scientifique. J'aimerais remercier Dre Lamy, Dre Beaulieu, Dr Boivin et Dr Annabi pour la formation et les connaissances scientifiques que vous m'avez transmises au courant des dernières années. J'adresse mes remerciements à Emmanuelle Naud pour son encadrement lors de mon premier passage au laboratoire. Je remercie aussi tous mes collègues de travail et plus particulièrement Chantal Fournier, Samira Mihoubi, Geneviève Di Tomasso, Éric Béliveau, Mathieu Provençal et David Ratel pour avoir rendu l'atmosphère de travail intéressante et agréable. Je remercie sincèrement mes parents, Agisilaos et Vassiliki, ainsi que mon frère Elias et mon conjoint Costa pour leur motivation et leur soutien qui ont été absolument nécessaires lors de l'exécution des travaux de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	ix
LISTE DES SYMBOLES.....	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Les statistiques.....	1
1.1.2 L'origine des cellules cancéreuses.....	2
1.1.3 Les conséquences du dérèglement de la régulation cellulaire.....	3
1.1.4 L'immuno-surveillance.....	4
1.2 L'angiogenèse.....	5
1.2.1 L'angiogenèse tumorale.....	5
1.2.2 La structure des capillaires tumoraux.....	7
1.2.3 Les métastases tumorales.....	7
1.3 L'hémostase.....	9
1.3.1 Les mécanismes de la coagulation extrinsèque.....	10
1.3.2 Le facteur tissulaire.....	12
1.3.3 Les interactions entre le TF et le FVIIa.....	13
1.3.4 La thrombine.....	15
1.3.5 Les récepteurs activés par protéolyse (PAR).....	15
1.3.6 La signalisation induite par PAR-1 et PAR-2.....	18
1.3.7 Le fibrinogène et la fibrine.....	19
1.4 La progression tumorale et les désordres thrombotiques.....	20
1.4.1 Les tumeurs et la cicatrisation tissulaire.....	21
1.4.2 Les marqueurs pro-coagulants.....	21

1.4.3	L'expression tumorale du TF.....	22
1.4.4	Les implications du TF dans différents processus (patho)physiologiques....	23
1.4.5	Le TF induit la synthèse du VEGF.....	24
1.4.6	Le TF est un maillon commun entre l'angiogenèse tumorale et l'hémostase.....	25
1.4.7	La signalisation intracellulaire induite par le TF favorise la progression tumorale.....	26
1.5	Objectifs Expérimentaux.....	28
CHAPITRE II		
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		
2.1	Matériel.....	31
2.2	Méthodes.....	33
2.2.1	Culture cellulaire et conditions expérimentales.....	33
2.2.2	Activation transcriptionnelle et extraction de l'ARN total.....	34
2.2.3	Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)....	35
2.2.4	Clonage moléculaire de l'ADNc du TF.....	36
2.2.5	Transfection transitoire du vecteur pcDNA 3.1 et de l'ADNc du TF.....	37
2.2.6	Essais de migration cellulaire <i>in vitro</i>	38
2.2.7	Essais de formation de structures de type capillaire <i>in vitro</i>	40
2.2.8	Dosage de l'activité pro-coagulante du complexe pro-coagulant TF/FVIIa.....	41
2.2.9	Stimulation des cellules de carcinome rénal et préparation des lysats totaux.....	42
2.2.10	Dosage des protéines totales selon la méthode microBCA.....	43
2.2.11	Immuno-buvardage de type western et immuno-détection.....	43
CHAPITRE III		
RÉSULTATS.....		
3.1	Le TNF- α induit la transcription du TF chez les cellules endothéliales humaines...	45
3.2	Le TF induit un phénotype pro-angiogénique des cellules endothéliales.....	46
3.2.1	La validation de la transfection endothéliale du TF.....	46
3.2.2	La surexpression du TF induit une élévation de la migration cellulaire.....	47

3.2.3	Le TF induit la différenciation morphologique <i>in vitro</i> des cellules endothéliales en structures de type capillaire.....	48
3.2.4	Limitations techniques rencontrées avec le modèle endothélial choisi pour l'étude <i>in vitro</i> des propriétés angiogéniques	49
3.3	La migration des cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal humain.....	50
3.3.1	Une surexpression constitutive du TF dans les cellules de carcinome rénal...	50
3.3.2	Le FVIIa influence la migration des cellules cancéreuses.....	51
3.4	Une comparaison du comportement migratoire des cellules métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal humain.....	52
3.4.1	Les effets du FVIIa et des agonistes de PAR sur la migration cellulaire.....	52
3.4.2	Les effets de différents inhibiteurs sur la migration cellulaire.....	54
3.4.3	Une comparaison de l'activité pro-coagulante des cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal.....	57
3.5	Étude de l'activation des voies des MAP kinases chez les cellules métastatiques de carcinome rénal.....	60
3.5.1	Le FVIIa active la voie des MAP kinases	60
3.5.2	Effet de la thrombine, de la pro-thrombine, du FVIIa et des agonistes de PAR sur l'activation de la voie de ERK.....	62
CHAPITRE IV		
DISCUSSION.....		82
4.1	Le TF induit un phénotype pro-angiogénique des cellules endothéliales.....	83
4.1.1	Le TF induit une élévation du potentiel de migration.....	83
4.1.2	Le TF induit la formation de structures de type capillaire.....	88
4.1.3	Limitations des méthodes employées.....	91
4.2	Les cellules épithéliales de carcinome rénal surexpriment constitutivement le TF...	93
4.2.1	Les effets du FVIIa sur l'induction du potentiel migratoire.....	95
4.2.2	Les implications des récepteurs PAR dans la migration des cellules épithéliales de carcinome rénal.....	96
4.2.3	Les effets de différents inhibiteurs sur la migration des cellules de carcinome rénal.....	98
4.2.4	Le dosage de l'activité pro-coagulante des cellules de carcinome rénal.....	101
4.2.5	La signalisation induite par le complexe TF/FVIIa.....	104
4.2.6	Le complexe TF/FVIIa trans-active les récepteurs PAR.....	106

CHAPITRE V	
CONCLUSION.....	110
BIBLIOGRAPHIE.....	112

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse.....	3
1.2 L'angiogenèse tumorale.....	6
1.3 Angiogenèse, métastases et invasions tumorales.....	8
1.4 Les mécanismes de coagulation extrinsèque assurent l'intégrité vasculaire.....	11
1.5 La structure cristallographique du complexe TF/FVIIa.....	14
1.6 L'activation protéolytique des récepteurs PAR.....	16
1.7 L'implication du TF dans le développement embryonnaire.....	23
3.1 Le TNF- α induit la transcription du TF chez les cellules endothéliales humaines.....	64
3.2 Clonage moléculaire de l'ADNc du TF dans le vecteur d'expression pcDNA 3.1/V5-His-TOPO.....	65
3.3 Comparaison de la séquence du TF obtenue par clonage moléculaire à celle disponible dans la banque génomique.....	66
3.4 Validation de la transfection des cellules endothéliales de l'aorte bovine.....	67
3.5 Le TF induit une élévation de la migration des cellules endothéliales.....	68
3.6 Le TF induit la différenciation morphologique <i>in vitro</i> des cellules endothéliales en structures de type capillaires.....	69
3.7 Quantification de l'effet du TF sur la différenciation morphologique des cellules endothéliales en structures de type capillaire.....	70

3.8	Mise en évidence de la variabilité des lots des cellules endothéliales par l'intermédiaire de la formation spontanée de structures de type capillaire.....	71
3.9	Évaluation de l'efficacité de transfection de différents lots de cellules endothéliales.....	72
3.10	Immuno-détection du TF constitutif exprimé chez les cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal.....	73
3.11	La migration des cellules métastatiques de carcinome rénal est optimale à une faible concentration de FVIIa.....	74
3.12	Une comparaison du comportement migratoire des cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal humain en présence de FVIIa et des agonistes de PAR.....	75
3.13	Effets des inhibiteurs du EGFR, des métalloprotéases et de la voie des MAP kinases sur la migration des cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal induite par le FVIIa et les agonistes de PAR.....	76
3.14	Une comparaison de l'activité pro-coagulante du TF des cellules épithéliales de carcinome rénal en présence ou non de différents inhibiteurs.....	77
3.15	Le FVIIa active la voie des MAP kinases chez les cellules métastatiques de carcinome rénal.....	78
3.16	Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal par la thrombine, la pro-thrombine et les agonistes de PAR-1 et de PAR-4.....	79
3.17	Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules métastatiques de carcinome rénal au FVIIa, FXa et à l'agoniste de PAR-2.....	80
3.18	Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules non métastatiques de carcinome rénal au FVIIa et aux agonistes de PAR-1 et de PAR-2.....	81

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACCRONYMES

AA	Acide Aminé
ABP-280	<i>Actin binding protein-280</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Adr-MCF-7	Cellules épithéliales de carcinome du sein
AG1478	Inhibiteur du récepteur du facteur de croissance épidermal
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	<i>Nuclear transcription factor, Activator Protein-1</i>
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
BAEC	Cellules endothéliales de l'aorte bovine
BB94	Batimastat, inhibiteur des métalloprotéases
BCA	Acide bicinchonique
BCS	Sérum bovin
b-FGF	Facteur de croissance de fibroblastes basique
BHK	Cellules embryonnaires rénales de hamster
BOSC23	Cellules embryonnaires rénales humaines
BSA	Albumine de sérum bovin
Ca ²⁺	Ions calciques
Caki-1	Cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal humain
Caki-2	Cellules épithéliales non-métastatiques de carcinome rénal humain
CD	<i>Cluster of designation</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovarian cells</i>
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cos-7	Cellules épithéliales rénales transformées au SV-40
Cu ¹⁺ , Cu ²⁺	Ions cuivriques
DAG	Diacyl glycérol
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DIC	Coagulation intravasculaire disséminée
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
dNTP	Dinucléotide tri-phosphate
EBM-2	Milieu basal pour cellules endothéliales
ECGF	Facteur de croissance de cellules endothéliales
ECH	Échelle de masse moléculaire
EDG	<i>Endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique

EGF	Facteur de croissance épidermal
EGF-R	Récepteur du EGF
EGM-2	<i>Endothelial Cell Growth Medium BulletKit-2</i>
EGR-1	<i>Early growth response-1</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
F	Facteur
FA	Fibrinopeptide A
FB	Fibrinopeptide B
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	Sérum de vœu fœtal
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
FN III	Domaine de type fibronectine III
FII	Facteur II ou pro-thrombine
FV	Facteur V
FVa	FV activé
FVII	Facteur VII
FVIIa	FVII activé
FVII -/-	Homozygote récessif pour le gène du FVII
FVIII	Facteur VIII
FVIIIa	Facteur VIII activé
FIX	Facteur IX
FIXa	Facteur IX activé
FX	Facteur X
FXa	FX activé
FXIII	Facteur XIII
GFP	Protéine verte et fluorescente
Gla	4-carboxyglutamate
Gly	Glycine
GYPGQV	Glycine-Tyrosine-Proline-Glycine-Glutamine-Valine
HaCat	Kératinocytes humains
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HUVEC	Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines
IL	Interleukine
Inh	Inhibiteur
IP3	Inositol tri-phosphate
LRP	Récepteur de lipoprotéines
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MCS	Site de clonage multiple
MDA-MB-231	Cellules épithéliales de carcinome du sein
MDR	Résistance multiple aux médicaments
MEC	Matrice extra-cellulaire
min	Minute
MMP	Métalloprotéase
MT1-MMP	Métalloprotéase matricielle de type-1
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear transcription factor κB</i>

NP-40	Nonidet P-40
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAGE	Gel d'électrophorèse de polyacrylamide
PAR	Récepteur activé par protéolyse
pb	Paires de bases
PBS	Tampon bi-phosphate salin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	Facteur de croissance plaquettaire
PD98059	Inhibiteur de ERK (<i>Extracellular signal regulated kinase</i>)
P-ERK	ERK phosphorylé
PI3-K	phosphatidyl inositol 3'-kinase
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
pNA	para-nitro-aniline
PVDF	Fluorure de polyvinylidène
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G
rpm	Rotation par minute
RRC	Carcinome de cellule rénales
RT-PCR	Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne
SDS	Dodécyl Sulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Ser ²⁵³ , Ser ²⁵⁸	Sérine en position 253 et 258
SFLLRNP	Sérine-Phénylalanine-Leucine-Leucine-Arginine-Asparagine-Proline
SLIGKV	Sérine-Leucine-Isoleucine-Glycine-Lysine-Valine
SRE	<i>Serum response element</i>
S-1-P	Sphingosine-1-phosphate
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tampon tris salin
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthylènediamine
TF	Facteur tissulaire
TF -/-	Homozygote récessif pour le gène du TF
TF +/-	Hétérozygote dominant pour le gène du TF
TF/FVIIa	Complexe pro-coagulant du TF/FVIIa
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TNF- α	Facteur de nécrose tumoral- α
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VT	Thrombose veineuse

LISTE DES SYMBOLES

°C	Degré Celsius
%	Pourcent
≤	Plus petit ou égal à
x	Opérateur de multiplication
#	Numéro
g/L	Gramme par litre
kDa	KiloDalton
L	Litre
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mm ³	Millimètre cube
mM	Millimolaire
m/v	Masse/volume
ng	Nanogramme
ng/ml	Nanogramme par millilitre
nm	Nanomètre
pb	Paires de base
U	Unités enzymatiques
v/v	Volume/volume
μg	Migrogramme
μg/ml	Migrogramme par millilitre
μl	Microlitre
μm	Micromètre
μM	Micromolaire

RÉSUMÉ

Depuis les observations du Professeur Trousseau en 1865, le lien entre la progression tumorale et les désordres thrombotiques a été établi. Les patients atteints de cancer sont plus à risque de développer des coagulopathies dues au caractère pro-coagulant des cellules tumorales. Celles-ci induisent une hypercoagulation afin de synthétiser une matrice de fibrine qui servira de support pour la croissance tumorale. Suite à sa stabilisation matricielle, la tumeur sécrète plusieurs agents angiogéniques afin d'induire sa propre vascularisation. La suractivation du système de coagulation contribue alors à la croissance et à l'angiogenèse tumorale et le maillon commun semble être le facteur tissulaire. Cette glycoprotéine transmembranaire est exprimée de manière ubiquitaire dans les tissus subendothéliaux. Son rôle est d'initier la coagulation extrinsèque; lorsque l'intégrité vasculaire est atteinte, le facteur tissulaire est exposé au flux sanguin qui contient son ligand naturel, le facteur VII. Ces derniers s'associent et le complexe pro-coagulant formé active la thrombine qui convertit le fibrinogène soluble en caillot de fibrine insoluble qui se loge au niveau de la blessure afin de rétablir l'hémostase. Le facteur tissulaire est également impliqué dans la vascularisation embryonnaire car selon certaines études, une délétion totale du gène entraîne une mort *in utero* de l'embryon directement causé par un déficit de vascularisation. À l'inverse, sa surexpression entraîne un phénotype pathogénique tel qu'observé chez plusieurs lignées tumorales. Les objectifs de cette étude ont été d'évaluer l'effet de la surexpression du facteur tissulaire sur les propriétés angiogéniques des cellules endothéliales de l'aorte bovine ainsi que de caractériser la capacité du complexe pro-coagulant à induire la migration des cellules épithéliales issues de carcinome rénal humain. Les résultats indiquent que la surexpression endothéliale du facteur tissulaire induit la migration et la formation de structures de type capillaire de manière dépendante et indépendante des mécanismes de l'hémostase. De plus, le complexe pro-coagulant induit la migration des cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal mais non de leur contrepartie non-métastatique qui est caractérisée par une plus haute expression du facteur tissulaire. Finalement, les cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques induisent des différents profils d'activation de la protéine *extracellular signal regulated kinase* qui régule plusieurs processus cellulaires dont la migration. Ces résultats indiquent alors que le facteur tissulaire est impliqué dans l'angiogenèse et dans la progression tumorale selon des mécanismes qui impliquent ou non l'activité du complexe pro-coagulant.

Mots clés: facteur tissulaire, complexe pro-coagulant, angiogenèse, cellules endothéliales tumorales, coagulopathies et cellules épithéliales de carcinome rénal.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Les statistiques

Dans les pays développés, le cancer demeure la deuxième cause de décès après les maladies cardiovasculaires. En ce moment, il y a 20 millions de personnes qui sont atteintes de cette maladie, et d'ici l'année 2020 il est estimé que ce chiffre gonflera à 30 millions. Selon un recensement effectué par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ 12 % de tous les décès mondiaux sont provoqués par le cancer; ceci représente 6 millions de personnes. En se basant sur les projections statistiques de l'OMS, le nombre de décès relié au cancer risque de doubler dans les vingt prochaines années (OMS, 2005).

Au Canada, il est estimé que 145 000 nouveaux cas de cancer apparaîtront en 2005, dont presque la moitié se termineront en décès. L'apparition d'environ 1 300 nouveaux cas de cancers pédiatriques a été prévue par la société canadienne du cancer, et il est estimé que le cinquième de ces cas aboutiront en décès (Statistique Canada, 2005).

Le cancer est une pathologie avec une grande prévalence dans le monde occidental. La recherche contre le développement et la progression oncogénique continue à prendre de l'essor. Le but ultime est de vaincre cette maladie mais pour le faire il faut élucider les facteurs qui déclenchent son apparition, son développement et sa survie dans l'organisme.

1.1.2 L'origine des cellules cancéreuses

Le cancer est généralement défini comme étant la prolifération anormale et anarchique des cellules qui se regroupent de manière inorganisée pour former une tumeur (Bertram, 2001). La transformation d'une cellule normale en cellule maligne repose sur les mutations séquentielles de l'ADN provoquées par les dommages subis par le génome. En effet, les cellules tumorales sont caractérisées par leurs nombreuses mutations qui sont transmises à la descendance lors de la prolifération exponentielle de la cellule parentale (figure 1.1) (Bertram, 2001). Un phénotype tumoral est alors acquis lorsque l'ADN subit de nombreuses mutations, surtout au niveau des gènes qui régulent la prolifération et la survie cellulaire, c'est-à-dire les gènes suppresseurs de tumeurs et les proto-oncogènes (Lewin, 1999).

Différents carcinogènes, qu'ils soient chimiques ou physiques, peuvent causer des dommages au génome (Bertram, 2001). Les agents chimiques utilisés lors des travaux industriels augmentent les risques de développement tumoral. Par exemple, les travailleurs des mines d'amiante sont plus à risque de développer le cancer du poumon tandis que ceux qui travaillent avec les teintures d'aniline sont plus à risque d'être atteint d'un cancer de la vessie. Les agents physiques peuvent aussi participer au développement cancéreux. Une exposition excessive aux radiations ionisantes ainsi que des doses massives de rayons ultraviolets du soleil élèvent les risques de plusieurs types de cancers de la peau. Certaines infections peuvent également induire l'apparition d'une masse tumorale dont l'hépatite virale B qui engendre le cancer hépatique. Les facteurs héréditaires peuvent également assurer la transmission des gènes mutés pro-cancérigènes d'une génération à une autre (Bertram, 2001; OMS, 2005). Finalement, certaines habitudes de vie augmentent considérablement les risques de carcinogenèse tels que le tabagisme, un mauvais régime alimentaire, la sédentarité, l'obésité et les excès alcooliques (OMS, 2005).

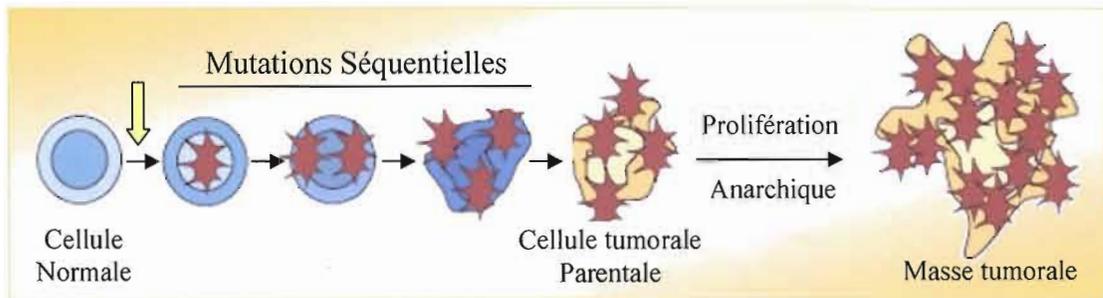


Figure 1.1: La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse

Les dommages de l'ADN cellulaire sont causés par différents agents carcinogènes physiques et chimiques. Les mutations séquentielles qui en résultent transforment la cellule normale en cellule cancéreuse qui prolifère de manière anarchique pour former une masse tumorale. (Modifié à partir de Marieb, 1993)

1.1.3 Les conséquences du dérèglement de la régulation cellulaire

La durée de vie des cellules somatiques de l'organisme est finement régulée par différents mécanismes de contrôle. Un adulte est composé d'environ 60 000 milliards de cellules dont la plupart doivent se diviser et se différencier afin de remplacer celles qui sont endommagées (Bertram, 2001). À titre d'exemple, les cellules épithéliales de l'intestin sont remplacées à tous les dix jours tandis que les globules rouges sont régénérés à partir de la moelle osseuse environ tous les 112 jours (Bertram, 2001). Les mécanismes qui régulent la prolifération et la survie des cellules assurent alors le maintien de la constance cellulaire de l'organisme. Un dérèglement à ce niveau engendre une prolifération incontrôlée générant des néoplasmes qui s'entassent pour former une masse tumorale (Bertram, 2001; Lewin, 1999).

Les cellules cancéreuses sont alors des variantes cellulaires qui prolifèrent de manière anarchique afin de générer une masse cellulaire dont les propriétés s'apparentent aux cellules immortalisées. Trois types de changements ont lieu dans une cellule normale avant qu'elle devienne tumorigène: immortalisation, transformation et métastase. Brièvement, la cellule acquiert la capacité de se diviser de manière illimitée, elle ne respecte plus l'équilibre de

prolifération/survie cellulaire et elle commence à envahir les tissus normaux pour former des colonies tumorales à divers niveaux de l'organisme (Bertram, 2001; Lewin, 1999).

Il existe deux types de tumeurs, soit les bénignes et les malignes. Dans le premier cas, la tumeur est noyée dans du tissu conjonctif. Cette encapsulation permet de ralentir considérablement la croissance des néoplasmes, rendant ces derniers moins dangereux. Les grains de beauté et les verrues sont des exemples de ce type tumoral qui est facilement éliminable par intervention chirurgicale. Dans l'autre cas, les tumeurs malignes sont constituées de néoplasmes acapsulés. La masse tumorale peut alors croître de manière illimitée ce qui facilite leur infiltration tissulaire ainsi que l'envahissement d'autres organes. À l'inverse de leur contrepartie bénigne, les malignes peuvent s'avérer mortelles (Marieb, 1993; Voet et Voet, 2002).

1.1.4 L'immuno-surveillance

Les cellules anormales apparaissent périodiquement dans l'organisme humain. Dans la plupart des cas, elles sont éliminées par le système immunitaire. Cette immunité anti-tumorale assure la surveillance continue des tissus et des liquides corporels afin d'éviter l'apparition de masses tumorales (Roitt, Brostoff et Male, 1997). La formation d'une tumeur repose sur la prolifération massive d'une cellule parentale possédant un génome très endommagé. Si cette dernière est éliminée avant même l'initiation de la prolifération alors il n'y a pas de néoplasmes de générés ni de masse cancéreuse. L'immuno-surveillance entrave le développement tumoral en empêchant la transmission des anomalies génétiques à une descendance cellulaire (Bertram, 2001).

1.2 L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus qui assure la formation de nouveaux nids vasculaires à partir des vaisseaux sanguins pré-existants. Cette série de mécanismes est finement régulée lors des événements physiologiques tels que la cicatrisation tissulaire, l'embryogenèse, la formation de l'endomètre et la génération du placenta (Folkman, 2003). En effet, l'équilibre entre les agents pro et anti-angiogéniques permet le maintien de la quiescence vasculaire. Par contre, un déséquilibre entraîne un grand nombre de pathologies: un excès angiogénique provoque l'apparition d'hémangiomes infantiles, de cancers, d'arthrite rhumatoïde, de psoriasis, de rétinopathies et d'ulcères duodénaux. À l'inverse, une angiogenèse insuffisante provoque entre autre des ischémies cardiaques et cérébrales (Folkman et Shing, 1992; Tonini, Rossi et Claudio, 2003).

1.2.1 L'angiogenèse tumorale

L'hypothèse que la croissance tumorale dépend de l'angiogenèse a été proposée en 1971 par le Dr Judah Folkman. En absence de vascularisation, la tumeur s'approvisionne en oxygène et en nutriments par diffusion passive. Durant cette phase pré-vasculaire, la prolifération cellulaire continue à un rythme constant mais elle est accompagnée d'un taux élevé d'apoptose, ou de mort cellulaire programmée (Folkman, 1971). La taille de la tumeur demeure donc microscopique (Carmeliet, 2003; Folkman, 1971). Lorsque la tumeur atteint une taille de 1 mm³ et qu'elle dépasse les limites d'oxygénation (environ 100 µm) celle-ci tombe en hypoxie (Gastl et al., 1997; Hori et al., 1991).

La tumeur peut rester dormante pendant des années avant d'acquérir un phénotype angiogénique. Elle peut aussi déclencher la transcription du HIF (*hypoxia inducible factor*) afin d'induire sa propre vascularisation (Folkman, 2003). Par conséquent, les cellules tumorales activent la transcription de plusieurs agents angiogéniques, dont le facteur de croissance épidermal (EGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance fibroblastique (FGF), qui sont déversés dans le milieu environnant

(figure 1.2). Ces molécules diffusent à travers la matrice extracellulaire (MEC) afin d'activer les cellules endothéliales qui en conditions normales sont quiescentes avec une période de renouvellement dépassant 1000 jours (Carmeliet, 2003; Gingras et Béliveau, 1997).

Une fois stimulées, les cellules endothéliales activent des enzymes protéolytiques, dont les métalloprotéases (MMP), qui dégradent la MEC et la membrane basale entourant le vaisseau sanguin. La force d'adhésion entre les cellules endothéliales est réduite afin de permettre le bourgeonnement, la prolifération et la migration de celles-ci vers la tumeur (Vailhé, Vittet et Feige, 2001). Une fois les cellules endothéliales logées dans la masse tumorale, elles se regroupent pour former le nouveau nid vasculaire. Pendant ce temps, la synthèse et le remodelage de la MEC et de la membrane basale sont entamés (Gingras et Béliveau, 1997). La tumeur peut maintenant recevoir un apport constant en oxygène et en nutriments permettant sa survie et sa croissance au de-là de 1 mm^3 . Cette phase vasculaire est d'autant plus caractérisée par une baisse marquée de l'apoptose tumorale (Folkman, 2003).

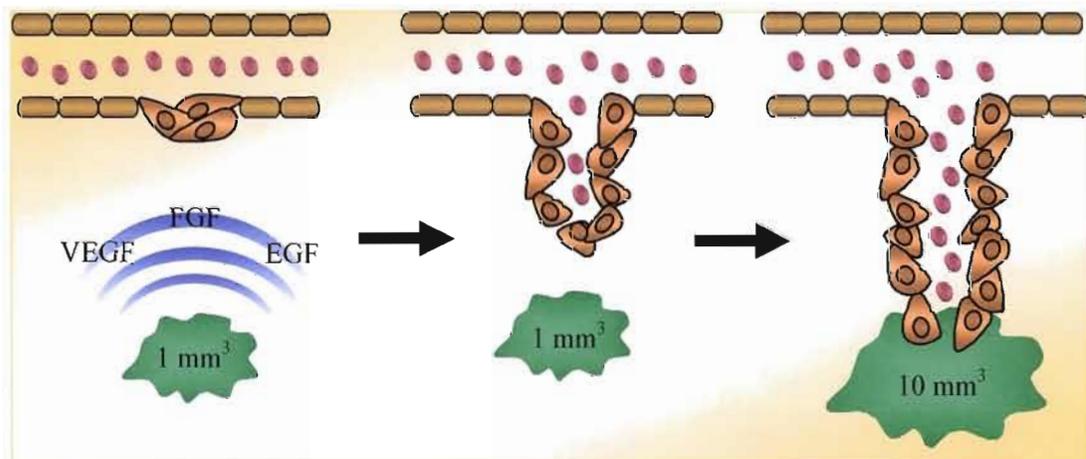


Figure 1.2: L'angiogenèse tumorale

Une tumeur hypoxique sécrète des plusieurs agents angiogéniques dont le VEGF, le EGF et le FGF afin d'activer l'endothélium quiescent à migrer et à proliférer vers la tumeur. L'infiltration et la réorganisation de ces cellules dans le stroma tumoral assurent la vascularisation, l'oxygénation et la survie tumorale (Modifié à partir de Folkman, 2003).

1.2.2 La structure des capillaires tumoraux

La configuration physiologique des vaisseaux sanguins est abolie lorsque ceux-ci participent à l'angiogenèse tumorale. Les capillaires tumoraux formés à partir de cellules endothéliales activées bourgeonnent et prolifèrent sans organisation. Leur emplacement spatial est désordonné et leur diamètre peut varier tout le long de la même structure vasculaire. L'épaisseur de l'endothélium qui tapisse un vaisseau de diamètre élevé est faible car il est comparable à celui d'un capillaire normal. De plus, la membrane basale entourant le vaisseau n'est pas continue, étant même partiellement dégradée (Dvorak et al., 1988; Eberhard et al., 2000; Hobbs et al., 1998). Cette structure chaotique résulte du débalancement de l'équilibre angiogénique en faveur des agents pro-angiogéniques (Dvorak et al., 1999; Hashizume et al., 2000; Hobbs et al., 1998).

1.2.3 Les métastases tumorales

Plusieurs études ont démontré une corrélation entre la densité de vascularisation tumorale, l'agressivité tumorale, l'incidence de métastases et la diminution de survie du patient (Gingras et Béliveau 1997; Liotta, Steeg et Stetler-Stevenson, 1991).

Tout dépôt métastatique est initié lorsqu'une grappe de cellules se détache de la tumeur primaire et pénètre dans la voie sanguine après avoir dégradé la membrane basale. Cette entrée dans le flux sanguin permet aux cellules de se rendre au nid capillaire qui vascularise l'organe cible (figure 1.3). Celles-ci se retirent de la circulation sanguine par extravasation afin de coloniser le tissu en question (Liotta Steeg et Stetler-Stevenson, 1991). Les cellules métastatiques induisent leur propre vascularisation et la taille de la tumeur secondaire atteint et dépasse 1 mm^3 , une taille qui rend la tumeur cliniquement détectable. Même en absence de vascularisation, la grappe cellulaire peut demeurer adjacente au vaisseau sanguin efférent tout en devenant une masse dormante; cet état limite alors l'expansion tumorale (Folkman, 1995). Seulement 4 à 10 % des cellules issues de tumeurs acquièrent la capacité d'induire un phénotype angiogénique. Ceci concorde avec la présence de micro-domaines tumoraux

hautement vascularisés en comparaison à d'autres qui ne le sont pas (Folkman, 1989, 1995; Kandel, 1991).

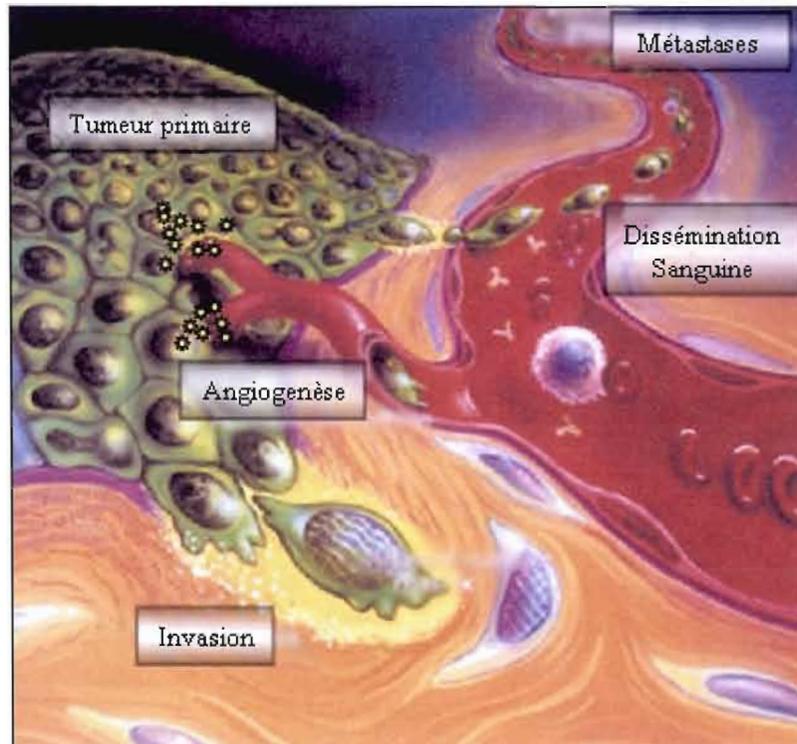


Figure 1.3: Angiogenèse, métastases et invasions tumorales.

La masse tumorale prolifère de manière anarchique, elle atteint alors une taille qui dépasse les limites d'oxygénation et par conséquent, elle tombe en hypoxie. Les cellules tumorales sécrètent des agents angiogéniques (✱) qui stimulent les vaisseaux sanguins quiescents entraînant la prolifération et la migration des cellules endothéliales vers la tumeur. Ce processus favorise la dissémination sanguine des cellules tumorales, elles peuvent alors effectuer des métastases en aboutissant dans le nid vasculaire d'un organe lointain. La tumeur primaire peut également envahir le tissu qu'elle occupe. Elle sécrète alors des enzymes protéolytiques dont les métalloprotéases qui dégradent les constituants de la matrice extracellulaire par conséquent, ces néoplasmes peuvent envahir le tissu sain (Modifié à partir de Falanga et Rickles, 1999).

1.3 L'hémostase

En conditions physiologiques, les constituants sanguins circulent librement contre l'endothélium tapissant les vaisseaux sanguins. Lorsqu'il y a rupture d'un vaisseau sanguin, une série de réactions est exécutée afin de rétablir l'intégrité vasculaire. Il s'agit de l'hémostase qui s'effectue en trois étapes : constriction vasculaire, formation du clou plaquettaire et coagulation ou formation du caillot (Marieb, 1993).

La contraction musculaire autour du vaisseau endommagé permet de minimiser la perte sanguine. Ce spasme vasculaire est d'autant plus important plus le diamètre du vaisseau est élevé. Pendant ce temps les plaquettes s'activent, elles altèrent leur morphologie en formant des prolongements membranaires et deviennent collantes. Celles-ci s'agrègent entre elles et à l'endothélium endommagé pour arrêter de manière provisoire l'écoulement sanguin. Durant l'emplacement de ce clou plaquettaire, le système de coagulation est déclenché permettant l'activation et l'accumulation de la thrombine qui clive les molécules de fibrinogène pour générer des fragments insolubles de fibrine. Ces derniers s'agrègent entre eux ainsi qu'aux plaquettes activées et forment une masse gélatineuse qui correspond au bouchon hémostatique (Marieb, 1993).

La cicatrisation tissulaire est initiée par la rétraction du caillot de fibrine. En effet, les plaquettes logées dans le bouchon hémostatique contiennent un complexe protéique contractile appelé actomyosine. Ce dernier assure la contraction des plaquettes qui exercent une traction sur les filaments de fibrine afin d'expulser les protéines sériques logées dans le caillot. Ce dernier commence à se resserrer, les lèvres de la plaie se rapprochent et la cicatrisation est initiée (Marieb, 1993). Les plaquettes favorisent davantage ce processus en sécrétant le facteur de croissance plaquettaire (PDGF), le facteur de croissance des cellules endothéliales (ECGF) et de la sphingosine-1-phosphate (S-1-P). Le PDGF stimule la prolifération des cellules musculaires et des fibroblastes des tissus sub-endothéliaux tandis que le ECGF entraîne la division des cellules endothéliales tapissant l'intérieur de la paroi vasculaire (Marieb, 1993). La S-1-P, un lysophospholipide bioactif, favorise la formation des

jonctions d'adhérence entre les cellules endothéliales ainsi que la maturation du vaisseau sanguin (Mehta et al., 2005). La circulation sanguine reprend, le caillot de fibrine résiduel est dégradé par protéolyse et l'homéostasie sanguine est rétablie (Mehta et al., 2005).

1.3.1 Les mécanismes de la coagulation extrinsèque

La coagulation sanguine est une cascade enzymatique complexe où de nombreux zymogènes sont convertis successivement en protéases actives. Une amplification moléculaire du signal initial est nécessaire afin d'aboutir à la formation du caillot de fibrine (Pelmont, 1995). Celui-ci peut être formé à partir de deux voies de coagulation : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La première voie fonctionne en permanence, son rôle est d'assurer le maintien de l'intégrité vasculaire en déposant des fins réseaux de fibrine sur les parois vasculaires. À l'opposée, la voie extrinsèque est plutôt une voie de coagulation rapide, c'est-à-dire un mécanisme d'urgence qui accélère le rétablissement de l'hémostase suite à un traumatisme (Butenas et al., 2000; Pelmont, 1995; Pirie-Shepherd, 2003).

La voie de coagulation extrinsèque est activée suite au dommage de l'endothélium vasculaire (figure 1.4). Le sang contenant le facteur (F) FVII (FVII) est déversé dans les tissus subendothéliaux où il rencontre et s'associe à son récepteur, le facteur tissulaire (TF). Le FVII est spontanément clivé en FVII activé (FVIIa), générant ainsi le complexe pro-coagulant TF/FVIIa (Giensen et al., 1999; Versteeg et al., 2004). L'activité protéolytique de ce complexe assure l'activation du FIX en FIXa et du FX en FXa. Le FIXa participe à l'activation et à l'agrégation plaquettaire. Quant à lui, le FXa active le FV en FVa et leur association en présence d'ions calciques (Ca^{2+}) et d'une surface phospholipidique assure la conversion de la pro-thrombine en thrombine. Cette étape est amplifiée par l'action des plaquettes activées et permet d'accumuler une grande quantité de thrombine, qui par clivage protéolytique du fibrinogène soluble, génère des fragments de fibrine qui précipitent et s'agglutinent pour former un caillot de fibrine qui se logera tout le long de la blessure (Eilertsen et Osterud, 2004; Hoffman, 2003; Rickles, Patierno et Fernandez, 2003).

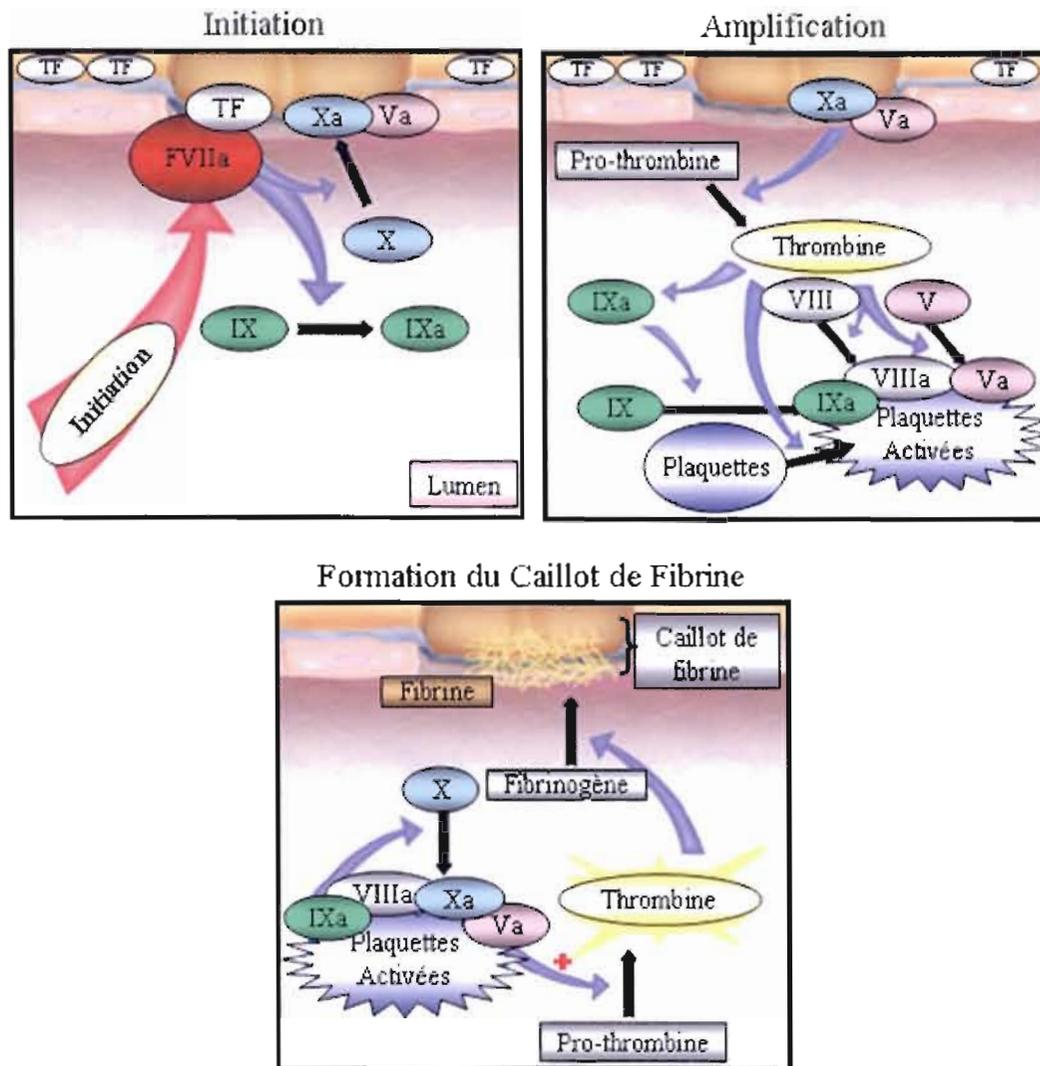


Figure 1.4: Les mécanismes de coagulation extrinsèque assurent l'intégrité vasculaire

Une rupture endothéliale entraîne le déversement du sang dans les tissus sub-endothéliaux, où le complexe TF/FVIIa est formé (Initiation). Ce dernier active le facteur X qui s'associe au facteur Va pour activer la pro-thrombine en thrombine. Cette dernière active les facteurs VIII et V qui en synergie avec le facteur IXa stimulent les plaquettes. La liaison du FXa aux plaquettes activées permet une activation massive de la pro-thrombine (Amplification). La thrombine générée transforme le fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui précipite pour former le caillot de fibrine. Celui-ci s'entremêle aux plaquettes activées et se loge au niveau de la plaie permettant ainsi le rétablissement de l'intégrité vasculaire (Formation du caillot de fibrine) (Modifié à partir de Hoffman, 2003).

1.3.2 Le facteur tissulaire

Tel qu'énoncé plus haut, le TF est l'initiateur principal de la coagulation extrinsèque. Son rôle consiste à former une enveloppe pro-coagulante autour des vaisseaux sanguins les permettant alors de déclencher la coagulation lors d'une blessure (Edgington et al., 1991; Hartzell et al., 1989). L'expression du TF est compartimentée de manière à empêcher sa liaison à son ligand naturel contenu dans le sang. Il est alors exprimé dans les sites extravasculaires qui en conditions physiologiques ne communiquent pas avec le flux sanguin (Eilertsen et Osterud, 2004).

Le TF est une glycoprotéine ubiquitaire; par contre, son taux d'expression varie en fonction de la vascularisation de l'organe (Pawlinski et al., 2004). Le cerveau, les poumons, le cœur, *les reins*, l'utérus, les testicules, la peau et le placenta expriment hautement le TF, tandis que le foie, la rate, les muscles squelettiques et le thymus l'expriment faiblement (Drake, Morrissey et Edgington, 1989; Fleck et al., 1990; Hartzell et al., 1989; Mackman et al., 1993). Les tissus sub-endothéliaux qui enveloppent la vasculature de ces organes possèdent des populations cellulaires qui expriment le TF. Les fibroblastes ainsi que les cellules musculaires lisses de l'adventice, les kératinocytes de la peau, les astrocytes du cerveau, les cellules épithéliales des alvéoles et les myocytes du cœur sont des exemples des cellules retrouvées à ce niveau (Drake, Morrissey et Edgington, 1989; Fleck et al., 1990; Luther et Mackman, 2001).

La traduction du gène total du TF humain génère une chaîne polypeptidique de 295 acides aminés (AA). Suite aux modifications post-traductionnelles, la séquence signal de 32 AA est clivée et le polypeptide de 263 AA s'exprime en une glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa (Morrissey, Fakhrai et Edgington, 2004; Spicer et al., 1987; Versteeg, Peppelenbosch et Spek, 2003). La portion extracellulaire de 219 AA représente plus de 80 % de la séquence protéique. Cette partie hydrophile contient deux domaines de type fibronectine III (FN III) organisés en feuillets β qui se relient par l'intermédiaire d'une région charnière. La présence de quatre résidus de cystéines permet la formation de deux ponts disulfures

impliqués dans l'interaction avec le FVII. En effet, le TF semble posséder une structure homologue avec le récepteur de l'interféron γ , d'où sa classification parmi la grande famille des récepteurs à cytokines (Bazan, 1990; Nakagaki et al., 1991; Ruf et Edgington, 1994). La portion transmembranaire de 23 AA hydrophobes assure l'ancrage de la glycoprotéine au niveau de la surface cellulaire. La portion cytosolique, composée seulement de 21 AA, possède 3 sites de phosphorylation qui peuvent participer à la transduction cellulaire (Morrissey, Fakhrai et Edgington, 2004; Spicer et al., 1987; Versteeg et al., 2004).

1.3.3 Les interactions entre le TF et le FVIIa

Le FVII est une protéase à sérine de 50 kDa qui, tout comme le FIX et le FX, est classé parmi les protéines dépendantes de la vitamine K (Pelmont, 1995). Ces zymogènes possèdent une homologie structurale: ils sont constitués d'un domaine Gla (4-carboxyglutamate) en N-terminal, de deux domaines de type EGF (facteur de croissance épidermal) et d'un domaine de protéase à sérine en C-terminal qui correspond au site catalytique (Clarke et al., 1992; Neuenschwander et Morrissey, 1994; Toomey, Smith et Stafford, 1991).

L'initiation de la cascade de coagulation est dictée par les interactions multiples entre les domaines du FVII et du TF. Suite à un endommagement vasculaire, le FVII se faufile à travers la matrice extracellulaire et, via son domaine Gla, établit des liaisons électrostatiques avec la phosphatidylsérine ou les phospholipides de charge négative contenue à la surface des cellules exprimant le TF. Le FVII se positionne et se complexe au TF, et la formation du complexe TF/FVII assure l'activation du FVII en FVIIa (Furie et Furie, 1988; Mann, 1984).

Le clivage protéolytique de ce zymogène génère un polypeptide composé de deux chaînes reliées par un pont disulfure (Banner et al., 1996; Ruf, Rehemtulla et Edgington, 1992; Zhang, St-Charles et Tulinski, 1999). La chaîne légère en N-terminal contient le domaine Gla et les deux domaines de type EGF et elle est caractérisée par sa grande flexibilité. Quant à elle, la chaîne lourde qui est située en C-terminal contient uniquement le

site catalytique. La flexibilité de la chaîne légère permet son enroulement autour de la portion extracellulaire du TF. La flexibilité de la chaîne légère est diminuée, ce qui provoque un changement de conformation du FVIIa (Waxman, 1993). Par conséquent, les quatre domaines du FVIIa ainsi que les domaines de FN III du TF établissent des liens de haute affinité (figure 1.5). La portion C-terminale du TF située à proximité de la membrane s'associe avec le domaine Gla du FVIIa. Le domaine EGF 1 du FVIIa interagit avec le deux domaines FN III du TF tandis que le domaine EGF 2 et le site catalytique du FVIIa lient la portion N-terminale du domaine FN III du TF (McCallum et al., 1996, 1997).

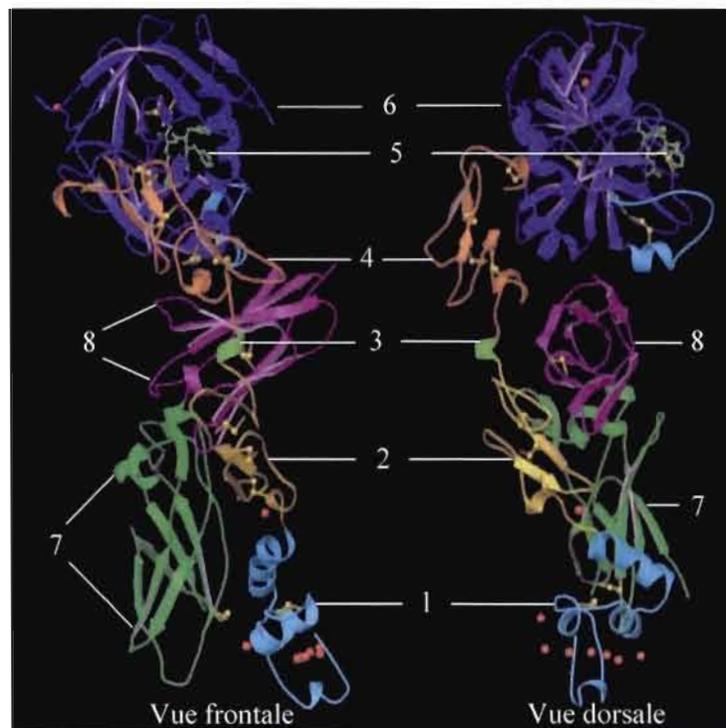


Figure 1.5: La structure cristallographique du complexe TF/FVIIa

Le domaine Gla (1) du FVIIa interagit avec la portion C-terminale du TF (6). La chaîne légère du FVIIa, composée du domaine EGF-1 (2) et EGF-2 (4) reliés par une région charnière (3), s'étale de la portion C-terminale (7) à la portion N-terminale (8) du TF. Tandis que la chaîne lourde (5) qui comprend le domaine protéasique (6) s'associe à la portion N-terminale du TF (Modifié à partir de Banner et al., 1996).

1.3.4 La thrombine

La conversion du fibrinogène en fibrine est assurée par la thrombine, une enzyme clé de la cascade de coagulation. Outre son rôle de protéase à sérine, la thrombine induit l'agrégation plaquettaire, régule le tonus musculaire ainsi que la croissance et la prolifération de certains types cellulaires dont les fibroblastes et les cellules de l'endothélium vasculaire (McNamara et al., 1993; Vouret-Craviari et al., 1992). Elle joue également un rôle dans la signalisation et la différenciation cellulaire (De Ciera, 2003; Hedstrom, 2002). Sa régulation est assurée par la présence de certains inhibiteurs dont l'anti-thrombine et la thrombomoduline qui permettent le maintien de l'équilibre hémostatique (Hanly et al., 2005).

1.3.5 Les récepteurs activés par protéolyse (PAR)

Le récepteur de thrombine, ou PAR-1, exprimé sur les plaquettes a été cloné en 1991 (Vu et al., 1991). Ce récepteur unique appartient à la famille de récepteurs à sept segments membranaires qui sont couplés à une protéine G (RCPG). Leur mode d'activation particulier est basé sur la protéolyse de la portion N-terminale par une protéase extracellulaire (figure 1.6). La séquence cryptique nouvellement exposée lie une séquence conservée de la deuxième boucle transmembranaire du RCPG et assure son activation (Bohm et al., 1996; Connelly et al., 1996; Ishihara et al., 1998; Kahn et al., 1998, 1999; Nystedt et al., 1994; Xu et al., 1998; Rasmussen et al., 1991; Vu et al., 1991).

La famille des PAR est composée de quatre membres: PAR-1, 2, 3 et 4 (Bohm et al., 1996; Ishihara et al., 1997; Xu et al., 1998). Leurs séquences peptidiques possèdent une homologie de 30 à 35 %. La thrombine assure l'activation de tous les récepteurs à l'exception de PAR-2, celui-ci étant plutôt stimulé par l'action de la trypsine, la tryptase mastocytaire et du FVIIa. Les PAR sont exprimés sur les plaquettes participant alors à leur activation. Plus spécifiquement, les plaquettes humaines expriment alors PAR-1, 3 et 4 tandis que les plaquettes murines expriment seulement les PAR-3 et 4 (Ishihara et al., 1997; Kahn et al., 1998; Nystedt et al., 1995; Xu et al., 1998). Quant à lui, PAR-2 n'est pas retrouvé chez les

plaquettes, mais il est exprimé à plusieurs endroits au niveau de l'organisme, notamment au niveau du tractus digestif et de l'endothélium (Derian et al., 2002; Kawabata et Kuroda, 2000)

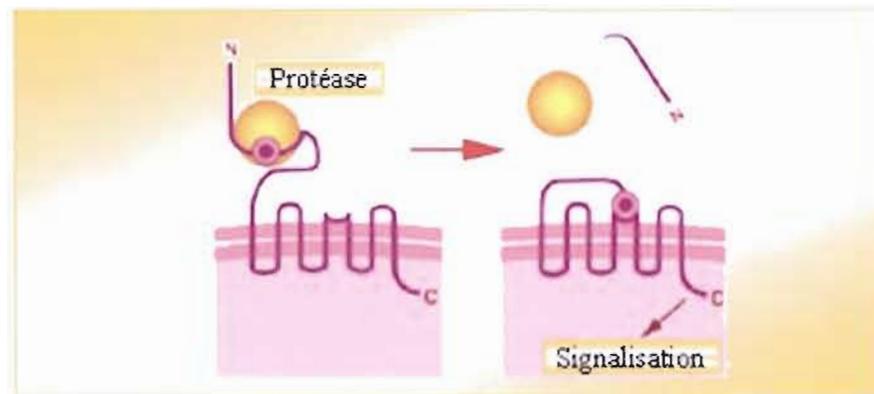


Figure 1.6: L'activation protéolytique des récepteurs PAR

L'activation des récepteurs PAR nécessite le clivage protéolytique de la portion N-terminale par une protéase spécifique. Celle-ci s'associe sur les domaines de reconnaissance du récepteur permettant de guider le site actif de la protéase sur la séquence cible. Le clivage de cette dernière expose le peptide cryptique qui lie une séquence hautement conservée de la deuxième boucle afin d'activer une protéine G ainsi que la signalisation intracellulaire (Modifié à partir de Ossovskaia et Bunnett, 2003).

Le récepteur PAR-1 possède la séquence $\text{LDPR}^{41}\downarrow\text{S}^{42}\text{FLLRN}$ localisée en N-terminale du récepteur. La thrombine clive celle-ci entre les résidus 41 et 42 et assure la libération du peptide cryptique qui lie et active le récepteur (Vu et al., 1991). En effet, cette activation a été illustrée lorsque l'activation des plaquettes humaines a été effectuée uniquement en présence du SFLLRN. Ceci démontre alors que l'exposition du peptide cryptique suite à l'action de la thrombine assure l'activation du RCPG (Derian et al., 2002). Outre son expression dans les plaquettes, PAR-1 est également retrouvé à la surface membranaire des fibroblastes, des myocytes, des astrocytes ainsi qu'au niveau de l'épithélium et de l'endothélium vasculaire (Ossovskaia et Bunnett, 2003).

Le récepteur PAR-2 est unique parmi les membres de la famille des PAR car le clivage de la séquence SKGR³⁴↓S³⁵LIGKV située en N-terminal du récepteur est assuré par la trypsine, la tryptase mastocytaire ainsi que par le FVIIa. De plus, ce récepteur peut être activé par le complexe TF/FVIIa/FXa (Camerer, Huang et Coughlin, 2000). Tel que mentionné plus haut, PAR-2 est absent de la surface plaquettaire par contre, il est exprimé chez plusieurs organes tels que le pancréas, le colon, *le rein*, le foie et l'intestin grêle (Dery et al., 1998; Hollenberg, 1999; Nystedt et al., 1995). Il est également exprimé au niveau des cellules musculaires, de l'endothélium vasculaire (Ollivier et al., 1998) et de l'épithélium ainsi que sur les myocytes, les cellules neurales et les astrocytes (Ossovskaya et Bunnett, 2003).

Le récepteur PAR-3 est clivé par la thrombine au niveau du site LPIK³⁸↓T³⁹FRGAP localisé en N-terminal du récepteur. Ce récepteur a été découvert lors de l'agrégation des plaquettes murines déficientes en PAR-1 suite à l'ajout de thrombine (Connolly et al., 1996; Ishihara et al., 1997). Le récepteur PAR-3 est le seul membre de la famille qui ne peut être activé par un agoniste peptidique identique à sa séquence cryptique. Malgré cela, il est exprimé dans les plaquettes murines ainsi que dans différents organes tels que le cœur, le foie, le pancréas, l'intestin grêle, l'estomac, la moelle osseuse et l'endothélium vasculaire (Ishihara et al., 1997; Schmidt et al., 1998).

Le récepteur PAR-4 est clivé et activé par la thrombine au niveau de la séquence PAPR⁴⁷↓G⁴⁸YPGQV. La concentration de thrombine nécessaire pour induire son activation est environ 100 fois supérieure à celle utilisée pour le clivage de PAR-1 et -3. Le récepteur PAR-4 est exprimé au niveau des plaquettes, de l'endothélium vasculaire, des myocytes et des astrocytes (Ossovskaya et Bunnett, 2003).

1.3.6 La signalisation induite par PAR-1 et PAR-2

L'activation protéolytique des récepteurs PAR entraîne leur interaction avec une variété de protéines G. Le récepteur PAR-1 active plusieurs voies de signalisation par l'intermédiaire des protéines G_q , G_i , et $G_{12/13}$. Chez les fibroblastes, la signalisation induite par PAR-1 est abolie par traitement aux anticorps anti- G_q (Baffy et al., 1994; Benka et al., 1995; Hung et al., 1992). Une déficience de ce récepteur empêche l'agrégation et la dégranulation des plaquettes (Offermanns et al., 1997). Certaines études montrent que l'activation d'une protéine G_q induit la voie de la phospholipase C (PLC) qui entraîne la formation du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol tri-phosphate (IP3). Ce dernier provoque une mobilisation du calcium (Ca^{2+}) cytosolique qui active à son tour la protéine kinase C (PKC). Il y a alors phosphorylation de différentes tyrosines kinases: Src, la phosphatidyl inositol 3'-kinase (PI3-K), la protéine kinase B (PKB) et les MAP kinases (*mitogen activated protein kinase*) (Dery et al., 1998; Ellis et al., 1999; Kawabata et al., 1999; Walker et al., 1999; Vu et al., 1991). La protéine G_i inhibe l'action de l'adénylate cyclase et, par conséquent, elle supprime la formation d'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) au niveau intracellulaire (Hung et al., 1992). Quant à elle, la protéine $G_{12/13}$ influence la morphologie et la migration cellulaire. Il a été démontré qu'une déficience en $G_{12/13}$ empêche l'altération morphologique des plaquettes suite à une stimulation à la thrombine interférant alors avec leur agrégation. L'activation de PAR-1 entraîne des changements morphologiques des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC): formation de fibres de stress, accumulation d'actine corticale et arrondissement cellulaire (Vouret-Craviari et al., 1998). Par contre, une déficience de $G_{12/13}$ empêche les cellules endothéliales de s'organiser en structures capillaires provoquant des hémorragies excessives suivies de la mort embryonnaire (Offermanns et al., 1997b).

Les effets intracellulaires de l'activation de PAR-2 sont beaucoup moins connus. La génération de IP3, ainsi qu'une mobilisation de Ca^{2+} est observée chez les entérocytes, les kératinocytes, les myocytes, les neurones, les astrocytes et même les cellules tumorales (Bohm et al., 1996, Corvera et al., 1997, 1999; Kong et al., 1997; Nystedt et al., 1994; Santulli et al., 1995; Ubl, Vohringer et Reiser, 1998). Cette signalisation n'est pas induite par

l'activation d'une protéine G_i car celle-ci n'est pas inhibée par un traitement à la toxine pertussique. Les agonistes de PAR-2 induisent l'activation de la voie des MAP kinases, notamment de la protéine *extracellular signal regulated kinase* (ERK). Par contre l'activation de p38 est très faible tandis que celle de c-JUN n'est pas observée (Belham et al., 1996; Yu et al. 1997).

La signalisation intracellulaire qui est initiée suite au clivage protéolytique du RCPG peut être d'ordre physiologique ou pathophysiologique. La caractérisation détaillée de cette classe de récepteurs demeure alors une priorité dans la compréhension de l'activation des voies de signalisation. La famille des récepteurs PAR représente alors une cible pharmaceutique importante (Derian et al., 2002).

1.3.7 Le fibrinogène et la fibrine

La conversion du fibrinogène en fibrine par l'action protéolytique de la thrombine permet la synthèse d'un caillot sanguin. Celui-ci doit posséder les propriétés physiques et mécaniques adéquates qui lui permettront de tolérer la pression exercée par le sang sur les parois vasculaires (Stadeven et al., 2005).

Le fibrinogène, une glycoprotéine de 340 kDa, possède deux sous-unités identiques composées de trois chaînes $A\alpha$, $B\beta$ et γ assemblées par 29 ponts disulfures (Erickson et Fowler, 1983; Pelmont, 1995; Weisel et Medved, 2001). La transformation du fibrinogène en fibrine est exécutée en trois étapes (Scheraga, 2004). Dans un premier temps, la thrombine clive les chaînes $A\alpha$ et $B\beta$ du fibrinogène au niveau de la séquence $\text{Arg}^{16}\text{-Gly}^{17}$ et libère les fibrinopeptides A et B (FA et FB). Ces derniers sont composés de 18 à 20 AA et possèdent plusieurs résidus anioniques dont le glutamate, l'aspartate et un groupement de tyrosyl-sulfate (Gorkun et al., 1994; Scheraga, 2004; Weisel, Veklich et Gorkun, 1993). En second lieu, la libération du FA et du FB induit une modification de la charge totale du fibrinogène qui passe d'un état soluble à un état insoluble. Les filaments de fibrine qui sont nouvellement

généérés précipitent et l'entassement initial du caillot est assuré par associations non-covalentes. En dernier lieu, le FXIII qui est activé par la thrombine, établit des liens covalents de type $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl-lysine})$ respectivement entre un résidu de glutamine d'un filament de fibrine et un résidu de lysine d'un autre (Pelmont, 1995; Lorand, 1972).

1.4 La progression tumorale et les désordres thrombotiques

Depuis les observations du Professeur Trousseau en 1865, un lien a été établi entre la progression tumorale et les désordres de coagulation (hypercoagulations). En effet, il s'agit du premier médecin à souligner que les personnes atteintes de cancer présentent souvent des symptômes de désordres thrombotiques avant même que la tumeur primaire soit dépistée. Il constate que lors d'un cas de thrombophlébite, le sang acquiert la capacité de coaguler spontanément en absence de cytokines et d'agents inflammatoires (Trousseau, 1865).

Il existe de nombreuses preuves qui corrént les désordres thrombotiques au développement tumoral. En effet, après le développement de métastases, l'avènement de ces coagulopathies représente la deuxième cause de mortalité chez les patients atteints de cancer (Donati, 1995; Rickles et Edwards, 1983). Environ 20 % des patients cancéreux sont atteints d'embolies veineuses ou pulmonaires (Johnson, Sproule et Paul, 1999; Rickles et Levine, 1998). Les manifestations cliniques peuvent être évidentes: apparition de thrombose veineuse (VT) normalement associée à la croissance d'une tumeur primaire ou apparition de coagulation intravasculaire disséminée (DIC) qui est généralement associée aux cancers hématologiques et aux métastases. Dans certains cas, l'évaluation de l'état sanguin est le seul moyen qui dévoile les troubles thrombotiques car il n'y aucune manifestation clinique qui s'observe (Barbui, Finazzi et Falanga, 1996; Tallman et al., 1993).

1.4.1 Les tumeurs et la cicatrisation tissulaire

Les tumeurs sont souvent comparées à des plaies qui ne guérissent pas (Dvorak, 1986). Lors du processus de la cicatrisation, le taux d'oxygène diminue et le tissu tombe en hypoxie. Celui-ci répond en exprimant des protéines impliquées dans la coagulation, la fibrinolyse ainsi que dans l'angiogenèse. L'arrêt du saignement est assuré par la formation du bouchon hémostatique, qui se loge au niveau de la plaie et diminue davantage le taux d'oxygène tissulaire. Ce phénomène active alors les mécanismes fibrinolytiques et la plasmine générée dégrade le caillot afin de rétablir la circulation sanguine ainsi que la reperfusion tissulaire (Denko et Giaccia, 2001). Les mêmes mécanismes sont impliqués au niveau tumoral. Lorsqu'une tumeur dépasse une certaine taille, la diffusion passive en oxygène ne suffit plus et la tumeur tombe en hypoxie. Celle-ci essaie de rétablir un état normoxique; cependant ses vaisseaux hyperperméables et son taux de prolifération cellulaire élevé ne jouent pas en sa faveur (Brown et Giaccia, 1998). La tumeur induit alors l'expression des protéines de coagulation et de fibrinolyse mais celle-ci n'atteint jamais la normoxie. La tumeur répète donc sans cesse des cycles de coagulation/fibrinolyse entraînant la formation de plusieurs caillots de fibrine tout en aggravant les risques de troubles thrombotiques (Denko et Giaccia, 2001).

1.4.2 Les marqueurs pro-coagulants

Souvent, l'activation du système immunitaire en réponse aux néoplasmes induit l'activation de la voie de coagulation. La synthèse des protéines de la phase aiguë, la sécrétion d'agents de coagulation et de fibrinolyse ainsi que l'interaction de la tumeur avec la MEC, l'endothélium vasculaire et les cellules sanguines, dont les plaquettes, favorisent un phénotype tumoral pro-coagulant (Cain et al., 2002). Les tumeurs peuvent alors former des matrices de fibrine dans leur microenvironnement pour se stabiliser durant la vascularisation tumorale et pour faciliter leur extravasation lors des métastases (Gordon, 1992; Falanga et Rickles, 1999).

Les tumeurs expriment certaines protéines pro-coagulantes dont le TF. Celui-ci permet de concentrer le FVII à la surface tumorale, déclenchant alors la cascade de coagulation (Nemerson, 1992; Semararo et Colucci, 1997). Normalement, il n'est pas exprimé sur les cellules endothéliales ni les cellules sanguines (monocytes, macrophages); cependant, en conditions pathologiques, son expression peut être induite par plusieurs cytokines d'inflammation dont le facteur de nécrose tumoral- α (TNF- α) et l'interleukine-1- β (IL-1 β) (Nemerson, 1992; Semararo et Colucci, 1997). Une étude histologique menée sur les tumeurs cancéreuses du sein a démontré une co-localisation des cellules tumorales et des cellules endothéliales qui surexpriment le TF (Contrino et al., 1996). Récemment, une autre étude a dévoilé la présence d'une forme soluble du TF dans l'urine des patients cancéreux. Il est alors envisageable de développer des méthodes de détection et de dosage de différents pro-coagulants qui dans certaines conditions peuvent servir de marqueurs tumoraux (Lwaleed, 2002).

1.4.3 L'expression tumorale du TF

Une variété de tumeurs humaines expriment de manière aberrante le TF: les leucémies, les gliomes, les cancers pancréatiques et colorectaux ainsi que le cancer de la prostate et du sein (Abdulkadir et al., 2000; Grimstad et Prydz, 1988; Hamada et al., 1996; Koomagie et Volm, 1998; Lykke et Nielson, 2003; Seto et al., 2000; Vrana et al., 1996). Cette expression est d'autant plus prononcée chez les lignées tumorales malignes en comparaison à leur contrepartie bénigne (Contrino et al., 1996; Ruf et Muller, 1996). Tel qu'observé chez une tumeur colorectale de grade avancé, la surexpression du TF est corrélée avec une élévation de la densité de microvaisseaux tumoraux ainsi que du phénotype de résistance multiple aux médicaments (MDR). Ces corrélations sont synonymes de mauvais pronostic et de faible survie pour le patient atteint de cancer (Lwaleed et Cooper, 2000). D'autres études cliniques ont également souligné la capacité du TF à promouvoir le développement, la croissance, la progression tumorale ainsi que les métastases et l'angiogenèse par des mécanismes qui dépendent ou non de la coagulation extrinsèque (Lykke et Nielson, 2003; Rickles, Patieno et Fernandez, 2003; Ruf, 2003; Versteeg et al., 2004).

1.4.4 Les implications du TF dans différents processus (patho)physiologiques

Le TF est surtout reconnu comme étant l'initiateur de la cascade de coagulation extrinsèque (Edgington et al., 1991). Certaines études indiquent que le TF est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques tels que l'embryogenèse (Bugge et al., 1996; Carmeliet et al., 1996; Toomey et al., 1996), le développement vasculaire (Carmeliet et al., 1996), la cicatrisation tissulaire (Nakagawa et al., 1998), la signalisation intracellulaire (Rottingen et al., 1995; Sorensen et al., 1999), les métastases (Mueller et al., 1992), l'angiogenèse physiologique et tumorale (Contrino et al., 1996), l'inflammation (Taylor et al., 1998) ainsi que l'adhésion et la migration cellulaire (Ott et al., 1998; Randolph et al., 1998).

L'implication du TF dans l'embryogenèse a été démontrée en évaluant la survie *in utéro* des embryons murins dont le gène du TF a été supprimé par manipulation génétique. Les embryons meurent entre 8,5 et 10,5 jours de développement embryonnaire due à une déficience de l'intégrité vasculaire et d'une incapacité à induire la vascularisation tissulaire (figure 1.7). De plus, la délétion du TF empêche le recrutement des cellules musculaires lisses qui normalement renforcent les vaisseaux sanguins nouvellement formés (Bugge et al., 1996; Carmeliet et al., 1996; Toomey et al., 1996).

En conditions pathologiques, l'expression du TF est induite par les cytokines inflammatoires (Edgington et al., 1991; Mackman et al., 1993) ou par l'hypoxie tel qu'observé lors du développement tumoral (Zhang et al., 1994, 1995). En effet, la co-localisation du TF a été observée chez les cellules tumorales ainsi que chez les cellules endothéliales qui assurent leur vascularisation (Contrino et al., 1996).

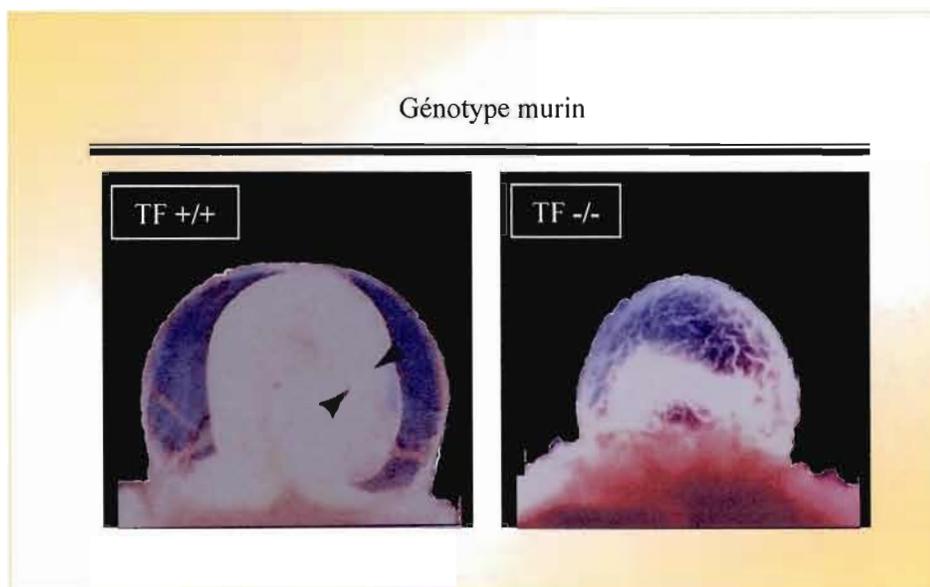


Figure 1.7: L'implication du TF dans le développement embryonnaire

La délétion du gène du TF chez les embryons murins entrave la vascularisation du placenta. Cette perturbation diminue les échanges gazeux et nutritifs qui s'effectuent par la voie sanguine et les embryons meurent entre huit et dix jours de développement embryonnaire (Modifié à partir de Pawlinski et al., 2004).

1.4.5 Le TF induit la synthèse du VEGF

Afin de pouvoir dépasser une taille de 1 mm^3 , la tumeur doit assurer sa vascularisation en activant les cellules endothéliales environnantes (Fernandez et Rickles, 2002). Pour se faire, elle sécrète différents agents angiogéniques dont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) caractérisé pour son efficacité et sa puissance mitogénique (Grunstein et al., 1999).

Les tumeurs qui surexpriment le TF sont caractérisées par un taux élevé de VEGF ainsi que d'une densité élevée en microvaisseaux tumoraux (Hamada et al., 1996). Un déséquilibre angiogénique est alors observé en faveur de la synthèse du VEGF et en défaveur des agents anti-angiogéniques dont la thrombospondine (Zhang et al., 1994). La transfection d'une séquence d'ADN anti-sens pour le TF chez un sarcome de Meth-A induit la perte de l'activité pro-coagulante initiée par le complexe TF/FVIIa ainsi qu'une diminution de la synthèse de VEGF et de la vascularisation tumorale (Zhang et al., 1994).

Le VEGF produit par la tumeur induit à son tour l'expression du TF chez les cellules endothéliales en activant le facteur de transcription du gène *EGR-1* (*early growth response-1*) (Mechtcheriakova, Wlackos et Holzmuller, 1999). En conditions physiologiques, les facteurs de croissance activent la voie de signalisation de la phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3-K)-Akt afin d'inhiber toute expression du TF. Par contre, une faible perfusion limite l'accès des facteurs de croissance aux cellules endothéliales infiltrant la tumeur. Il y a alors activation de la voie des MAP (*mitogen activated protein*) kinases et expression du TF à la surface de l'endothélium vasculaire qui infiltre la masse tumorale (Blum et al., 2001).

1.4.6 Le TF est un maillon commun entre l'angiogenèse tumorale et l'hémostase

L'angiogenèse établit une communication entre le compartiment vasculaire et la tumeur permettant à cette dernière d'avoir accès à tous les éléments retrouvés dans le sang (Folkman, 1971). Les produits ultimes de la voie de coagulation, la thrombine et la fibrine, stimulent l'angiogenèse qui est cruciale pour la croissance oncogénique (Dupuy et al., 2003; Rickles, Patierno et Fernandez, 2003; Staton, Brown et Lewis 2003).

L'endothélium tumoral est caractérisé par une faible force de jonction intercellulaire ainsi que par une membrane basale partiellement dégradée. Cet état hyperperméable rend possible l'extravasation des facteurs de coagulation, de la thrombine, du fibrinogène, des plaquettes et de différentes cellules inflammatoires dans le microenvironnement de la tumeur.

Par conséquent, le complexe pro-coagulant TF/FVIIa est formé dans le stroma tumoral suivi par la synthèse d'une matrice de fibrine (Fernandez, Patierno et Rickles, 2004).

Ce caractère pro-coagulant assure la protection des cellules tumorales surtout durant les processus métastatiques. Dans un tel contexte, les cellules qui se détachent de la tumeur primaire luttent continuellement contre le système immunitaire (Schirmacher, 1985). En effet, moins de 0,01% des celles-ci survivent pour former des colonies métastatiques (Liotta, Steeg et Stettler-Stevencon, 1991). La formation d'une enveloppe de fibrine enrichie en plaquettes est alors un moyen efficace qui permet aux cellules d'échapper aux mécanismes d'immuno-surveillance de l'organisme (Nash, Walsh et Kakkar, 2001; Fernandez et Rickles, 2002)

Lorsque les cellules métastatiques atteignent le nid vasculaire de l'organe cible, elles s'infiltrant dans le tissu et initient leur angiogenèse. La masse tumorale doit alors dégrader l'enveloppe de fibrine en activant ses mécanismes de fibrinolyse. Il y a ainsi libération de thrombine, de VEGF et d'autres facteurs angiogéniques qui sont encapsulés entre les mailles de fibrine (Sahni et al., 2000; van Hinskenbergh, Collen et Koolwijk, 2001;). La libération du VEGF induit le bourgeonnement de l'endothélium environnant qui se stabilise et migre envers la tumeur sur une matrice provisoire de fibrine synthétisée sous l'action de la thrombine (Nagy et al., 1989). Cette dernière assure aussi l'activation protéolytique des récepteurs PAR-1 exprimés à la surface des plaquettes. Leur activation provoque la libération de plusieurs cytokines et agents angiogéniques dont la sphingosine-1-phosphate (S-1-P), un lysophospholipide qui participe à la maturation des vaisseaux sanguins (Mehta et al., 2005). L'angiogenèse dépend alors de l'activité pro-coagulante du complexe TF/FVIIa qui active des mécanismes dépendants et indépendants de la voie de coagulation extrinsèque.

1.4.7 La signalisation intracellulaire induite par le TF favorise la progression tumorale

La surexpression tumorale du TF induit l'angiogenèse selon un mécanisme indépendant de la voie de coagulation (Nakasaki et al., 2002; Zhang et al., 1994). Le complexe TF/FVIIa induit l'augmentation des ions Ca^{2+} dans le cytosol provoquant l'activation de la PKC. Celle-ci phosphoryle les résidus de sérine de la portion cytosolique du TF ce qui entraîne la synthèse du VEGF, l'altération du cytosquelette d'actine et l'activation de la voie des MAP kinases (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003).

La phosphorylation du TF provoque l'activation de certains facteurs de transcription nucléaires dont le SP-1, l'AP-1 et le NF- κ B qui sont communs au VEGF ainsi qu'au TF. Le partage de ces facteurs pourrait expliquer leur co-localisation tumorale (Rickles, Patierno et Fernandez 2003; Contrino et al., 1996). Chez certains mélanomes, la synthèse de VEGF est assurée suite à la liaison du FVII à son récepteur cellulaire (Bromberg et al., 1999), tandis que chez une lignée humaine de fibroblastes, la synthèse du VEGF nécessite l'initiation de la coagulation, la génération de thrombine et l'activation des PAR qui induisent l'activation de ces facteurs de transcription (Ollivier et al., 1998, 2000).

Une fois phosphorylée, la queue cytoplasmique du TF peut interagir avec la protéine ABP (*actin binding protein*)-280. Celle-ci s'active et réorganise les filaments d'actine du cytosquelette (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003; Ott et al., 1998). Cette association provoque aussi la phosphorylation de FAK (*focal adhesion kinase*) qui fait partie des protéines kinases activées en réponse à un stress cellulaire. Par conséquent, cette voie régule la morphologie, l'adhésion et la migration cellulaire qui sont des activités clés lors de la progression et des métastases tumorales (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003).

Lorsque les cellules tumorales acquièrent la capacité de former des métastases, leur expression du TF peut augmenter jusqu'à 1000 fois en comparaison à leur contreparties non métastatiques (Mueller et al., 1992). L'équipe de Bromberg a démontré que l'injection intraveineuse de cellules de mélanome surexprimant le TF induit la formation de métastases dans

86 % des souris testées (Bromberg et al., 1995). L'établissement de ces colonies ne dépendaient pas des produits de la voie de coagulation mais plutôt de la portion cytoplasmique du TF. Sa délétion empêche la signalisation, abolissant alors la formation de métastases (Bromberg et al., 1995). De plus, une étude complémentaire a démontré que l'interaction entre le TF et son ligand est un élément qui détermine l'intensité de la signalisation intracellulaire du TF et sa capacité à former des métastases (Mueller et Ruf, 1998).

Finalement, la thrombine générée à partir du complexe TF/FVIIa participe à l'angiogenèse sans aboutir à la génération d'un caillot de fibrine. En effet, elle active les récepteurs PAR-1 et 2 exprimés chez les cellules endothéliales et provoque l'expression des protéines impliquées dans l'angiogenèse dont le VEGF, les récepteurs du VEGF, le TF et les enzymes protéolytiques. Par conséquent, la morphologie endothéliale est altérée car il y a une augmentation de la perméabilité vasculaire qui est accompagnée par une dégradation excessive de la MEC. Toutes ces étapes favorisent la prolifération et la migration des cellules endothéliales vers le site du stimulus angiogénique (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003).

1.5 Objectifs expérimentaux

Le TF, reconnu pour ses propriétés pro-coagulantes, est surexprimé à la surface des cellules tumorales ainsi que sur l'endothélium vasculaire qui assure sa perfusion (Contrino et al., 1996). Il a été récemment démontré que le TF peut favoriser la progression tumorale selon des mécanismes qui sont indépendants de la coagulation sanguine (Ott et al., 2005; Versteeg et al., 2004).

Les objectifs de cette étude consistaient à évaluer l'effet de la surexpression du TF sur la progression tumorale selon une approche angiogénique et oncogénique. De prime à bord, les propriétés angiogéniques des cellules endothéliales de l'aorte bovine (BAEC) ont été

étudiées suite à la transfection et à la surexpression du TF. Ce modèle cellulaire a été choisi car il a été préalablement démontré qu'il n'exprime pas de manière constitutive le TF (Nawroth et al., 1985). Plus spécifiquement, une étude *in vitro* de migration cellulaire à l'aide des chambres de Boyden et une étude de la réorganisation des cellules en structures de type capillaire sur matrigel™ a été exécutée afin de mettre en évidence l'effet du TF sur l'induction des propriétés pro-angiogéniques des cellules. De plus, la capacité du TF à induire un phénotype angiogénique a été testé en présence du facteur VII activé (FVIIa) qui est son ligand naturel, de la sphingosine-1-phosphate (S-1-P) un agent qui est relargué par les plaquettes activées et qui participe à l'angiogenèse tumorale et finalement en présence d'une solution sérique qui est un mélange complexe contenant une panoplie d'agents angiogéniques, de facteurs de croissance et de leurs inhibiteurs respectifs (Langlois, Gingras et Béliveau, 2004).

Une étude supplémentaire a été exécutée afin de mieux évaluer l'effet du complexe TF/FVIIa sur la migration des cellules cancéreuses préalablement caractérisées par leur phénotype pro-coagulant. Les cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal (Caki-1 et Caki-2) ont été utilisées car tel que préalablement démontré les cellules issues de ce type de tumeur possèdent un phénotype pro-coagulant qui dépend de la présence du FVIIa et par conséquent de l'expression du TF (Forster et al., 2003; Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986). De plus, il a déjà été illustré que la migration de certaines lignées cellulaires est induite lorsque le complexe TF/FVIIa trans-active certains récepteurs dont les récepteurs activés par protéolyse, PAR (Hjortoe et al., 2004; Sato et al., 1997). Pour ces raisons, la migration des Caki-1 et des Caki-2 a été effectuée en présence de FVIIa et le taux de migration comparé à celui obtenu en présence des agonistes de PAR-1 et de PAR-2.

Finalement, l'ajout des inhibiteurs du récepteur du facteur de croissance épidermal (EGF-R), des métalloprotéases (MMP) et de la voie des *mitogen activated protein* (MAP) kinases a été exécutée afin d'identifier des récepteurs et/ou les voies de signalisation qui sont activées lors de la formation du complexe pro-coagulant TF/FVIIa. Ces inhibiteurs ont été choisis parce qu'il a été préalablement illustré que les cellules issues de carcinome rénal

surexpriment à leur surface plusieurs MMP de type matriciel mais jusqu'à présent, il n'y a jamais été démontré que le complexe TF/FVIIa induit leur activation (Abdel-Wahed, Assad et Aleskandarany, 2004; Hemmerlein et al., 2004; Kitagawa et al., 1999). De plus, il a déjà été démontré que la migration cellulaire dépend de l'activation de la voie des MAP kinases (Gingras et al., 2001) alors un inhibiteur spécifique (PD98059) a été utilisé afin de vérifier l'effet sur le taux de migration des cellules épithéliales de carcinome rénal. Finalement, il a été rapporté que les cellules de carcinome rénal surexpriment le EGF-R (Merseburger et al., 2005) et qu'une trans-activation de ce récepteur par le complexe TF/FVIIa a déjà été observée chez les kératinocytes humains. Alors, l'ajout de l'inhibiteur AG1478 avait comme but la mise en évidence de la trans-activation du EGF-R par le complexe pro-coagulant TF/FVIIa.

L'objectif de cette étude se résume alors à la caractérisation des effets du TF et du complexe pro-coagulant TF/FVIIa à induire un phénotype pro-angiogénique chez les cellules endothéliales et à induire la migration des cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Le facteur VII activé (FVIIa), sous forme lyophilisée, a été fourni par le Dr Georges-Étienne Rivard (Montréal, QC, Canada). Le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) à faible et à haute teneur en glucose, le milieu basal pour cellules endothéliales (EBM-2) ainsi que le milieu de différenciation des cellules endothéliales (EGM-2) ont été obtenus chez Gibco (Grand Island, NY, USA). Le sérum bovin (BCS) et le sérum de vœu fœtal (FBS) ont été respectivement achetés chez Hyclone Laboratories (Logan, UT, USA) et Medicorp (Montréal, QC, Canada). Le facteur de croissance fibroblastique (b-FGF) a été acheté chez Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). La trypsine-EDTA, le milieu de culture McCoy's, le vanadate de sodium, la sphingosine-1-phosphate (S-1-P), le fluorure de sodium, la gélatine, le diméthyl sulfoxyde (DMSO), le bromure d'éthidium, la pro-thrombine, le pyruvate de sodium et l'inhibiteur de wortmannin (PD 98059) proviennent de Sigma (St-Louis, MO, USA). Les coffrets d'extraction et de purification d'ADN ainsi que le Polyfect® ont été achetés chez QIAGEN (Mississauga, ON, Canada). Le FuGENE 6, la fibronectine lyophilisée, le Nonidet P-40 et le Chromozyme X ont été obtenus chez Roche Diagnostics (Laval, QC, Canada). Les coffrets Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq et pcDNA 3.1/V5-His® TOPO® TA ainsi que le TRIZol ont été achetés chez Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Les amorces de la séquence humaine du TF ont été synthétisées par BioCorp Inc. (Montréal, QC, Canada). Les enzymes de restriction BstX I, BamH I et EcoR I proviennent de Fermentas (Hanover, MD, USA). Le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), le facteur X (FX), le facteur X activé (FXa) et le tyrphostin (AG 1478)

ont été achetés chez Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Le Matrigel™ a été obtenu de BD Biosystems (Mississauga, ON, Canada). Les chambres de migration (6.5 mm de diamètre, porosité de 8µm) ont été achetées chez Costar (Corning, NY, USA). Le coffret de microBCA a été procuré chez Pierce (Rockford, IL, USA). Tous les produits utilisés pour l'immunobuvardage de type Western proviennent de Biorad (Hercules, CA, USA) à l'exception des membranes de fluorure de polyvinylidene (PVDF) qui ont été achetées chez PALL Gelman Laboratory (Ann Arbor, MI, USA). Le réactif Western Lighting™ Chemiluminescence Reagent Plus a été obtenu chez Perkin Elmer (Boston, MA, USA). L'albumine de sérum bovin (BSA) et le standard de poids moléculaire de 100 pb ont été respectivement achetés chez USB Biologics (Swampscott, MA, USA) et Amersham (Baie d'Urfé, QC, Canada). Les agonistes peptidiques des récepteurs PAR-1, PAR-2 et PAR-4 provenaient de chez Bachem (San Carlos, CA, USA). Les anticorps dirigés contre les protéines ERK et phospho-ERK proviennent de Cell Signaling Technologies (Mississauga, ON, Canada) tandis que l'anticorps dirigé contre la portion extracellulaire du TF provenait de chez Cedarlane Laboratories Limited (Hornby, ON, Canada). Tous les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort ont été obtenus de Jackson Immunoresearch (Mississauga, ON, Canada).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire et conditions expérimentales

Les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) ont été achetées chez Clonetics (San Diego, CA, USA). Celles-ci ont été cultivées en présence du milieu basal pour cellules endothéliales (EBM-2) contenant les différents suppléments EGM-2 (*Endothelial Cell Growth Medium BulletKit-2*). Les HUVEC ont été utilisées jusqu'au passage 3 (Langlois, Gingras et Béliveau, 2004).

Les cellules endothéliales de l'aorte bovine (BAEC) ont également été achetées chez Clonetics. Ces cellules ont été cultivées en présence du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) à faible teneur de glucose supplémenté avec 1,5 g/L de carbonate de sodium suivi d'un ajustement du pH à 7,3. De plus, il y a eu un ajout de sérum bovin (BCS) à une concentration finale de 10 % et du facteur de croissance fibroblastique (b-FGF) à 10 ng/ml. Les BAEC ont été utilisées jusqu'au passage 12 (Langlois et al., 2005).

Les cellules épithéliales de rein de singe (Cos-7) provenant de l'ATCC (*American Tissue Culture Collection*) ont été mises en culture dans du DMEM à haute teneur de glucose. Celui-ci a été supplémenté avec 1,5 g/L de carbonate de sodium, 1 mM de pyruvate, et le pH ajusté à 7,3. Finalement, un ajout de BCS 10 % a été effectué afin de permettre la propagation et l'utilisation des Cos-7 jusqu'au passage 20 (Annabi et al., 2001).

Les cellules épithéliales de carcinome rénal humain (Caki-1 et Caki-2) ont été achetées chez l'ATCC. Ces deux lignées apparentées, diffèrent cependant au niveau de leur potentiel métastatique. Les Caki-2 sont des cellules non-métastatiques issues de tumeurs primaires tandis que les Caki-1 sont des cellules métastatiques qui sont issues de tumeurs secondaires (ATCC). Ces deux lignées ont été cultivées en présence du milieu McCoy's supplémenté avec de 2.2 g/L de carbonate de sodium suivi d'un ajustement du pH à 7,3. Un

ajout de sérum à une concentration finale de 10 % a été effectué afin de permettre la croissance cellulaire. Plus spécifiquement, les Caki-1 ont été mises en présence de BCS tandis que le FBS a été utilisé lors de la culture des Caki-2. Ces lignées ont été utilisées jusqu'au passage 40 (Turcotte, Desrosier et Béliveau, 2004).

Toutes les lignées cellulaires mentionnées plus haut ont été maintenues dans leur milieu respectif à une température constante de 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et 95 % d'air.

2.2.2 Activation transcriptionnelle et extraction de l'ARN total

Il a été démontré que le facteur de nécrose tumoral- α (TNF- α) stimule la transcription génique du facteur tissulaire (TF) chez plusieurs lignées endothéliales (Hezi-Yamit et al., 2005; Parry et Mackman, 1995; Wu et Aird, 2005). Cette étape a permis d'obtenir l'ARNm du TF qui par transcription inverse et polymérisation en chaîne sera amplifié en ADN afin d'être cloné dans un vecteur d'expression.

Les HUVEC de faible passage ont étéensemencées et maintenues dans des pétris de culture de 9.6 cm² jusqu'à l'obtention d'une confluence de 80 %. Les cellules ont été rincées avec du milieu EBM-2 dépourvu de suppléments de croissance et le tapis cellulaire a été traité ou non avec 50 ng/ml de TNF- α en absence de sérum pendant trois heures à 37°C/5 % CO₂ (Parry et Mackman, 1995).

Après le traitement, l'agent a été retiré et le tapis cellulaire rincé au tampon bi-phosphate salin de pH 7,4 (PBS: 150 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,3 mM de KH₂PO₄ et 8,1 mM de Na₂HPO₄·7H₂O). Les cellules ont été ensuite lysées au TRIZol[®], une solution monophasique de phénol et de guanidine thiocyanate, et l'extraction de l'ARN total a été exécutée selon les directives du manufacturier (Invitrogen).

Le culot d'ARN a été solubilisé dans 20 µl d'eau diéthylpyrocarbonate (DEPC) et dosé à 260 et 280 nm. La pureté de l'échantillon a été évaluée à partir du ratio de la densité optique obtenue à 260 sur celle obtenue à 280 nm. Une valeur supérieure ou égale à 1.6 indique que la préparation d'ARN possède un faible taux de contamination protéique.

2.2.3 Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

La transformation de l'ARN total en ADNc a été assurée par les différentes étapes de la transcription-inverse suivies de la réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR). Cette étape a été effectuée afin d'obtenir et d'amplifier l'ADNc du TF qui sera cloné dans un vecteur d'expression. L'équipe de Petersen a également fait recours à ce type de stratégie lors de l'amplification de la séquence nucléotidique qui code pour l'ectodomaine du TF murin (Petersen et al., 2005).

L'amplification de l'ADNc du TF est similaire à celle employée lors de l'obtention de l'ADNc de la métalloprotéase matricielle de type-1, MT1-MMP (Gingras et al., 2000). L'obtention et l'amplification de l'ADNc a été possible à partir du mélange réactionnel de 50 µl comprenant 1 µg d'ARN total, 25 µl du mélange de réaction 2X (0,4 nM de chaque dNTP et 2,4 mM de MgSO₄), 2 mM de MgCl₂, 1 µM des amorces sens et anti-sens et 1 µl du mélange enzymatique de RT/Taq provenant du coffret Superscript™ One-Step RT-PCR (Invitrogen).

Durant l'étape de la transcription inverse, 1 µg d'ARN total a été incubé pendant 30 minutes à 50°C afin d'obtenir l'ADNc du facteur tissulaire (TF). L'amplification a été assurée après 40 cycles de PCR comprenant les stades de température suivants: 30 secondes à 94°C, 45 secondes à 55°C et 45 secondes à 72°C. La PCR a été suivi d'une période d'élongation de 7 minutes à 72°C afin de permettre l'extension finale des brins fermés.

Les amorces ont été conçues à partir de la séquence humaine du TF. L'amplification de l'ADNc entier du TF a été effectuée avec les amorces sens et anti-sens qui possèdent respectivement les séquences suivantes: 5'-ATGGAGACCCCTGCCTGGCC-3' et 5'-TTATGAAACATTCAGTGGGGAGTTCTCC-3'. Le produit attendu était de 890 paires de bases (pb). Il est à noter que la mise au point des étapes de RT-PCR a été effectuée en utilisant les amorces sens, 5'-CCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTC-3', et anti-sens, 5'-TTGGCTGTCCGAGTTTGTCTC-3'. Celles-ci ont permis d'amplifier une petite portion nucléotidique du TF, le produit attendu était de 250 pb. Cette amplification a toujours été exécutée en parallèle avec l'amplification du gène de taille entière. Par conséquent, le produit de réaction de 250 pb a servi de témoin positif.

Les produits amplifiés ont été séparés par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% (m/v) contenant 1µg/ml de bromure d'éthidium. Les gels ont été exposés aux ultraviolets et les bandes révélées ont été photographiées.

2.2.4 Clonage moléculaire de l'ADNc du TF

Cette étape a été exécutée afin de générer un vecteur de clonage recombinant qui permettra l'expression du TF dans les BAEC. Le vecteur d'expression employé, pcDNA 3.1/V5-His[®] TOPO[®] TA, a été précédemment utilisé pour le clonage de RhoA et de la MT1-MMP (Turcotte, Desrosier et Béliveau, 2004; Gingras et al., 2000)

L'ADNc de taille entière du TF préalablement obtenu par RT-PCR et séparé sur gel d'agarose a été récupéré et purifié à l'aide du coffret d'extraction QIAquick[®] (QIAGEN). Le clonage a été entrepris en utilisant le coffret d'expression pcDNA 3.1/V5-His[®] TOPO[®] TA selon les recommandations du fabricant (Invitrogen). Brièvement, l'ADNc du TF a été mélangé au vecteur TOPO suivi d'une transformation par choc à la chaleur des bactéries compétentes *E.coli* One Shot[®] TOP10. Celles-ci ont été étalées sur gélose contenant de l'ampicilline afin d'induire la sélection des bactéries ayant incorporé le vecteur TOPO.

Les clones positifs ont été repiqués et leur contenu plasmidique analysé par digestion enzymatique. Une digestion au BstX I a permis de vérifier s'il y a eu insertion de l'ADN d'intérêt. De plus, ces vecteurs plasmidiques ont subi une double digestion en présence de BamH I et de EcoR I afin de vérifier l'orientation de l'insert. Les digestions ont été incubées toute la nuit à 37°C/5% CO₂ en présence d'une unité d'enzymes. Les produits de digestion ont été séparés par migration sur gel d'agarose 1% (m/v) contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium. Tous les fragments de digestion possédant une taille d'environ 900 pb ont été séquencés par S&T Inc. (Montréal, QC, Canada). La séquence obtenue a été comparée à celle disponible dans les bases de données du GENEbank.

2.2.5 Transfection transitoire du vecteur pcDNA 3.1 et de l'ADNc du TF

Afin de pouvoir surexprimer l'ADNc du TF dans différents modèles cellulaires *in vitro*, il a fallu faire recours à la transfection en utilisant le FuGENE 6 pour les BAEC et le Polyfecte® pour les Cos-7. Dans les deux cas, ces réactifs de transfection sont des mélanges lipidiques complexes et dépourvus de liposomes (Roche et QIAGEN).

Les cellules ont étéensemencées dans des pétris de culture de 9,6 cm² de manière à obtenir une confluence cellulaire entre 40 et 60 %. Une quantité de 0,5 µg d'ADN c'est-à-dire de pcDNA 3.1 ou d'ADNc du TF a été transfectée dans le puits correspondant tout en respectant les recommandations fournies par le manufacturier (Roche et QIAGEN). Les cellules ont été récoltées 40 à 48 heures post transfection afin d'entreprendre d'autres expériences.

La transfection des BAEC, une lignée endothéliale primaire qui n'exprime pas le TF à un état quiescent (Nawroth et al., 1985), a permis d'étudier l'effet de la surexpression du TF sur les propriétés angiogéniques *in vitro* (migration cellulaire et formation de structures de type capillaires). La transfection des Cos-7, une lignée de cellules épithéliales de rein de singe transformée au SV-40, a permis la surexpression et ultérieurement la validation de

toutes les nouvelles préparations d'ADNc du TF, avant même d'exécuter la surexpression chez les BAEC. Plus spécifiquement, les Cos-7 ont été recueillies 48 heures post-transfection afin d'être lysées. Une quantité égale de protéines (20 µg) a été utilisée afin d'exécuter une immuno-buvardage de type western suivi d'une immuno-détection de la protéine du TF dont la masse est de 47 kiloDaltons (kDa). En effet, cette lignée cellulaire a été utilisée particulièrement à cause de son haut taux de transfection qui peut atteindre jusqu'à 70 % en utilisant la méthode du Polyfecte® (QIAGEN). Étant donnée cette particularité, les Cos-7 sont souvent utilisées afin de permettre la surexpression élevée de l'ADN transfecté. Ceci a été illustré lors de l'étude des interactions entre la cavéoline-1 et la métalloprotéase matricielle de type 1 (MT1-MMP) (Labrecque et al., 2004) ainsi que durant l'étude de l'activation de la pro-métalloprotéase (MMP)-2 par le MT1-MMP (Gingras et al., 2000).

L'efficacité de la transfection des plasmides pcDNA 3.1 et de l'ADNc du TF a été évaluée par surexpression d'une protéine verte et fluorescente (GFP) (Langlois et al., 2005). Les cellules qui émettaient une fluorescence verte ont été dénombrées et comparées aux cellules totales. L'efficacité de transfection des BAEC est d'environ 15 % tandis que celle des Cos-7 s'élève à 62 %.

La technique de l'immuno-buvardage de type western suivi d'une immuno-détection ont été des techniques également utilisées pour détecter la présence du TF dans les lysats cellulaires totaux. De plus, un test d'activité pro-coagulante a été effectué afin de vérifier si le TF nouvellement exprimé à la surface cellulaire a la capacité de reconnaître et de lier son ligand naturel, le facteur VIIa (FVIIa).

2.2.6 Essais de migration cellulaire *in vitro*

L'expression du TF au niveau des cellules endothéliales et cancéreuses a été rapportée dans divers modèles dont le cancer rénal et le cancer du sein (Shi et Siemman, 2002; Contrino et al., 1996 et Zacharski, Memoli et Rousseau et al., 1986). Cette étape a alors

permis d'évaluer l'influence du TF sur la migration des cellules endothéliales et des cellules épithéliales de carcinome rénal métastatiques et non métastatiques (Caki-1 et Caki-2) qui surexpriment le TF.

Les chambres de Boyden (6.5 mm de diamètre, porosité de 8µm) ont été enduites de différentes matrices et incubées toute la nuit à 4°C. Pour la migration des BAEC préalablement transfectées, la gélatine à 0,15% est utilisée tandis que pour les Caki-1 et les Caki-2 ayant subi un sevrage de 24 heures, une matrice de fibronectine de 20 µg/ml a été employée. Tout excès matriciel a été éliminé par lavage au PBS, et les chambres de migration ont étéensemencées à nombre égal de cellules: 25 000 cellules pour les BAEC et 100 000 cellules pour les Caki-1 et les Caki-2. Suite à une période d'adhésion cellulaire de 30 minutes, les chambres sont déposées dans les puits d'une plaque à 24 puits contenant 600 µl d'un chimio-attractant préparé en absence de sérum. Plus spécifiquement, les BAEC sont mises en présence de milieu DMEM à faible teneur de glucose (témoin), de 1 µM de sphingosine-1-phosphate (S-1-P), 10 % de BCS et de 10 nM de FVIIa. Les Caki-1 et les Caki-2 ont été mises en présence de FVIIa (concentrations variant de 0 à 50 nM) et de 50 µM d'agonistes des récepteurs activés par protéolyse (PAR) dont PAR-1 (SFLLRNP), PAR-2 (SLIGKV) et PAR-4 (GVPGQV). Une migration de trois heures a été entamée à 37°C/5 % CO₂ et à la fin de cette incubation, les cellules n'ayant pas migré ont été éliminées en nettoyant l'intérieur de la chambre avec un bâton de ouate. Les cellules ayant migré sont fixées à la formaline phosphate 10 % et colorées au crystal violet 0,1 % (20 % méthanol v/v). Les chambres de Boyden ont été photographiées au microscope visible de type Zeiss Axiovert S100 (Thornwood, NY) et la moyenne de la densité cellulaire des quatre champs choisis a été calculée par le logiciel Northern Eclipse 4.0 provenant de Empix Imaging (Mississauga, ON). Une méthode similaire a été utilisée par l'équipe de Langlois lors de la migration des BAEC surexprimant la MT1-MMP (Langlois, Gingras et Béliveau, 2004).

Lorsque la migration est effectuée en présence d'inhibiteurs ceux-ci sont pré-incubés dans la chambre de Boyden pendant 30 minutes seulement après la fin de la l'étape d'adhésion cellulaire. Les inhibiteurs sont également ajoutés dans le puits contenant le

chimio-attractant afin d'éviter l'effet de dilution une fois la chambre trempée dans le puits. Plus spécifiquement, les Caki-1 et Caki-2 sont mises en présence de AG1478, l'inhibiteur du récepteur du facteur de croissance épidermal (EGF-R), de BB94 qui est l'inhibiteur des MMP, de PD98059 qui est l'inhibiteur de ERK (*extracellular signal regulated kinase*) et de 0.02 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO) qui est le solvant commun de tous les inhibiteurs testés. La vérification de ce type de témoin est important car il a déjà été démontré que le solvant utilisé pour la solubilisation des réactifs peut interférer lors de la migration cellulaire (Donaldson et Dunlap, 1981).

2.2.7 Essais de formation de structures de type capillaire *in vitro*

La réorganisation de l'endothélium tumoral en nids vasculaires au niveau du stroma de la tumeur dépend de l'équilibre entre les facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques (Folkman et al., 1989). Cette étape a permis d'évaluer si la surexpression endothéliale du TF combinée à la présence de différents chimio-attractants permettent d'induire un comportement pro-angiogénique. suffit pour induire ce comportement angiogénique ou si une synergie est nécessaire avec une voie de signalisation activée par un chimio-attractant qui est présent lors de l'essai.

Le Matrigel™ est une réplique *in vitro* de la matrice extracellulaire. Une quantité de 50 µl a été déposée stérilement au fond d'une plaque de 96 puits et cette dernière incubée à 37°C/5 % CO₂ afin d'induire sa polymérisation. Chaque puits a étéensemencé avec 25 000 BAEC préalablement transfectées. Après la période d'adhésion cellulaire de 30 minutes à 37°C/5 % CO₂, les chimio-attractants (identiques à ceux de la migration cellulaire) ayant été préparés en absence de sérum sont ajoutés à chaque puits. La capacité des BAEC à former des structures de type capillaire a été évaluée pendant 5 à 8 heures. Les puits de Matrigel™ ont été photographiés à l'aide du microscope visible à un grossissement de 50 X et les structures de type capillaire ont été quantifiées par le logiciel Northern Eclipse 4.0 (Langlois et al. 2004).

2.2.8 Dosage de l'activité pro-coagulante du complexe TF/FVIIa

La surexpression du TF chez les BAEC est vérifiée par immuno-buvardage de type western suivi d'une immuno-détection de la protéine dans le lysat cellulaire. Cette approche permet de localiser la protéine en question mais elle ne révèle aucune information par rapport à la capacité du TF à former le complexe TF/FVIIa. Le test de l'activité pro-coagulante repose alors sur la reconnaissance de ce couple récepteur/ligand. Le TF nouvellement exprimé à la surface endothéliale reconnaît et lie le FVIIa, son ligand naturel. Ce complexe acquiert la capacité d'activer le facteur X (FX) présent dans le système qui à son tour clivera le substrat chromogénique, le Chromozyme X afin de libérer la 4-nitroaniline qui absorbe à une longueur d'onde de 405 nm (Dietzen, Page et Tetzloff, 2004).

Les cellules, transfectées ou non, sont resuspendues dans un tampon cellulaire isotonique de pH 7.4 (21 mM de HEPES, 137 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 0,75 mM de Na_2HPO_4 , 11 mM de glucose et 2 mM de CaCl_2). Les puits d'une plaque à 96 puits sont ensuiteensemencés de cellules (nombre fixe ou croissant) qui sont incubées en présence de 10 nM de FVIIa pendant 30 minutes à 4°C. Un ajout de 1 μM de FX et de 500 μM de Chromozyme X est effectué et la cinétique réactionnelle est suivie pendant une heure à 405 nm (Dietzen, Page et Tetzloff, 2004). Tous les essais subséquents ont été effectués avec la quantité de cellules permettant d'obtenir une activité pro-coagulante avant l'atteinte du plateau maximal, 25 000 cellules pour les BAEC et 15 000 cellules pour les Caki-1 et Caki-2.

L'activité pro-coagulante du TF des Caki-1 et des Caki-2 a été évaluée en présence des inhibiteurs du EGF-R, de ERK et des MMP. Les cellules ont été sevrées pendant 24 heures, suivi d'un traitement de 60 minutes avec l'inhibiteur respectif: 1 μM d'AG1478, de PD98059 et de BB94 ainsi que 0.02% de DMSO (témoin) qui correspond au solvant de tout les inhibiteurs utilisés. Étant donné que ce test de pro-coagulation dépend de la formation du complexe TF/FVIIa cet essai a permis de vérifier si un sevrage en présence de ces inhibiteurs altère à la hausse ou à la baisse l'interaction du TF avec le FVIIa.

2.2.9 Stimulation des cellules de carcinome rénal et préparation des lysats totaux

Le TF possède une queue cytoplasmique qui une fois phosphorylée participe à la signalisation intracellulaire permettant l'activation de la voie des MAP kinases (Ott et al., 2005). La signalisation induite par le complexe TF/FVIIa a été étudiée chez des modèles cellulaires ayant subi une transfection afin de surexprimer le TF (Ott et al., 2005; Abe et al., 1999; Sorensen et al., 1999). Les Caki-1 et Caki-2 représentent plutôt un modèle physiologique parce qu'elles sont issues de tumeurs rénales qui expriment naturellement le TF (Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986). Cette étape a permis d'évaluer s'il y a un couplage entre le complexe TF/FVIIa et les PAR aboutissant à l'activation de ERK.

Les stimulations cellulaires ont été effectuées de manière similaire à celles préalablement décrites (Turcotte, Desrosier et Béliveau, 2004). Premièrement, les Caki-1 et les Caki-2 ont été amenées à une confluence de 80 % afin d'être sevrées pendant 24 heures. Une cinétique de stimulation a été entreprise pendant 0, 1, 2, 5, 10, 15 et 30 minutes en présence de différents agents tels que: 1 nM de FVIIa, 50 μ M d'agonistes de PAR dont PAR-1 (SFLLRNP), PAR-2 (SLIGKV) et PAR-4 (GYPGQV), 0,5 U de thrombine et 5×10^{-3} U de pro-thrombine. Les tapis cellulaires ont été rincés au PBS froid contenant 1 mM de vanadate et de fluorure de sodium et lavés pendant une heure à 4°C sous faible agitation. Les cellules ont été grattées à l'aide d'un policeman en présence de tampon de lyse (1% de Triton X-100, 0,5% de NP-40, 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA et 10 mM de Tris, pH 7,4) supplémenté avec du vanadate et du fluorure de sodium à 1 mM. Une lyse cellulaire a été effectuée sur glace pendant 30 minutes au cours de laquelle tous les échantillons ont été vigoureusement mélangés à toutes les 5 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 700 g afin de culotter les débris cellulaires, le surnageant contenant les protéines totales a été récolté et dosé selon la méthode de l'acide bicinchonique (BCA).

2.2.10 Dosage des protéines totales selon la méthode microBCA

Afin de connaître la quantité de protéines contenue dans les lysats cellulaires, la méthode de l'acide bicinchonique (BCA) a été employée. Les échantillons sont dilués dans un volume de 1 ml suivi d'un ajout de 1 ml de réactif préparé en mélangeant dans les proportions 50: 48: 2 les solutions A, B et C contenues dans le coffret microBCA. Les tubes sont chauffés à 60°C pendant une heure et la densité optique du complexe colorimétrique formé est lue à 562 nm à la température ambiante.

Le principe de cette méthode se résume de la manière suivante. Le complexe colorimétrique formé lors du dosage protéique est une conséquence de la réduction des ions Cu^{+2} en ions Cu^{+1} par les protéines de l'échantillon qui se retrouvent en milieu alcalin (réaction du biuret). Une fois les ions Cu^{+1} générés, ils chélatent deux molécules de BCA pour former le produit de réaction pourpre qui absorbe fortement à 562 nm (Pierce).

2.2.11 Immuno-buvardage de type western et immuno-détection

Cette étape a été effectuée à l'aide des lysats cellulaires totaux afin de confirmer la présence du TF suite à la transfection des BAEC ou afin de mettre en évidence l'activation de ERK chez les Caki-1 et Caki-2 suite à leur stimulation par le FVIIa et les agonistes peptidiques de PAR-1, PAR-2 et de PAR-4.

Une quantité égale de protéines (10 ou 20 μg) a été resuspendue dans un tampon d'échantillon réducteur (tampon de Laemmli) contenant 62,5 mM de Tris/HCl (pH de 6,8), 10 % de glycérol, 2 % de dodécyl sulfate de sodium (SDS), 5 % de β -mercaptoéthanol et 0,00625 % de bleu de bromophénol. Les échantillons ont été dénaturés à 100°C pendant 5 minutes suivi de leur dépôt et de leur séparation sur un gel de *sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Les gels de séparation contiennent 9 % de polyacrylamide/bis acrylamide, 0,38 M de Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% de SDS, 0,5 mg/ml

et 1 $\mu\text{l/ml}$ de N, N, N', N'-tétraméthylènediamine (TEMED). Le gel d'entassement est composé de 3,9 % de polyacrylamide/bis acrylamide, 0,12 M de Tris-HCl (pH 6,8), 0,01 % de SDS, 0,5 mg/ml et 1 $\mu\text{l/ml}$ de TEMED. Les gels ont été submergés dans un tampon d'électrode de pH 8,3 (19,2 mM de glycine, 25 mM de Tris et 0,1 % de SDS et la séparation électrophorétique a été exécutée à un voltage constant. Les protéines ont été électrotransférées sur membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) munie de pores de 0.45 μm . Le transfert a été exécuté à un voltage constant pendant 90 minutes à 4°C en présence de tampon de transfert (96 mM de glycine, 10 mM de Tris, 20 % méthanol et 0.01% de SDS, pH 8.3). À la fin du transfert, la membrane a été récupérée et les sites non-spécifiques ont été bloqués toute la nuit à 4°C sous faible agitation en présence de 3 % d'albumine bovine sérique (BSA) resuspendue dans le TBS/Tween 0,1 % (20 mM de Tris et 150 mM de NaCl).

L'immuno-détection des antigènes a été possible en incubant la membrane avec l'anticorps primaire préparé à la bonne dilution (1: 1000 ou 1: 5000) dans une solution de BSA 3 %/ NaN_3 0,01 %. Après une heure, la membrane a été lavée au TBS/Tween 0,1 %, suivi de l'ajout de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort, dilué 1: 10 000. Un autre lavage au TBS/Tween 0,1 % a été effectué suivi de la détection des immuno-complexes. La membrane a été traitée avec le réactif de chemiluminescence préparé en mélangeant des volumes égaux des solutions du coffret Western Lighting™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer). La membrane a été enveloppée et exposée sur Film Fuji et les immuno-complexes ont été détectés sous forme de bandes.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Le TNF- α induit la transcription du TF chez les cellules endothéliales humaines

Il a été démontré que l'expression endothéliale du TF est induite par les facteurs de nécrose tumoraux (Hezi-Yamit et al., 2005; Parry et Mackman, 1995; Wu et Aird, 2005). Par conséquent, le TNF- α a été employé afin d'induire la transcription génique du TF chez les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) cultivées *in vitro*.

La figure 3.1-A illustre que les cellules endothéliales possèdent une activité de transcription basale pour le TF. Par contre, un traitement de celles-ci au TNF- α promouvoit une forte augmentation de la transcription de ce gène (figure 3.1-A). L'ADN obtenu suite à ce traitement est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et, tel d'indiqué par la figure 3.1-B, un signal optimal est obtenu après 40 cycles. L'amplification effectuée au-delà ce nombre de cycles a généré un signal saturé (figure 3.1-B).

L'amplification de la séquence entière du TF a été entamée afin de permettre éventuellement son clonage dans un vecteur d'expression. La polymérisation en chaîne du gène entier du TF a été exécutée selon les paramètres mis au point avec les amorces codant pour une petite portion du gène (250 pb). Par conséquent, l'amplification du gène entier s'est toujours effectuée en parallèle avec celle de la séquence partielle du TF donc, l'obtention du produit de réaction de 250 pb a pu servir de témoin positif pour l'amplification. La figure 3.1-C démontre que la séquence partielle du TF (250 pb) s'amplifie plus efficacement que la

séquence de taille entière (900 pb). Malgré cette différence en intensité de signal, l'activation de la transcription génique du TF est observée par rapport aux cellules non traitées (figure 3.1-C).

Après avoir obtenu la séquence entière du TF, celle-ci a été clonée dans le vecteur d'expression pcDNA 3.1 (figure 3.2-A). La séquence a été insérée dans le site de clonage multiple (MCS) entre les deux sites de restriction de BstX I et une digestion avec cette enzyme a mis en évidence un fragment d'environ 900 pb, confirmant alors l'insertion de l'ADN du TF dans le vecteur (figure 3.2-B). Afin de déterminer l'orientation de l'insert dans le vecteur, une digestion a été effectuée en présence de BamH I et d'EcoR I. Cette dernière a également généré un fragment d'environ 900 pb, confirmant la bonne orientation de l'insert dans le MCS lors du clonage (figure 3.2-B). Deux clones ont généré un fragment BstX I-BstX I ainsi qu'un fragment BamH I-EcoR I, leur ADN plasmidique a alors été séquencé entre les deux sites BstX I du MCS et la séquence comparée à celle du TF retrouvée dans la base de données du GeneBank. Les deux séquences se sont avérées identiques, confirmant le succès du clonage de la séquence entière du TF (figure 3.3).

3.2 La surexpression du TF induit un phénotype pro-angiogénique des cellules endothéliales

3.2.1 La validation de la transfection endothéliale du TF

Un système de transfection cellulaire a été mis au point en utilisant les BAEC transitoirement transfectées avec le TF. La surexpression de la protéine étudiée a été ensuite confirmée par immuno-buvardage de type western suivi d'une immuno-détection. Tel qu'illustré à la figure 3.4-A, la transfection de l'ADNc du TF permet l'expression d'une protéine de 47 kDa. Celle-ci est absente lorsque les cellules sont transfectées avec le vecteur pcDNA indiquant que les BAEC n'expriment pas de TF à un état quiescent, ceci corrèle avec les observations préalablement décrites (Nawroth et al., 1985). Ce résultat permet alors de valider la fonctionnalité de la transfection ainsi que l'expression du TF chez les BAEC.

Un essai supplémentaire a été effectué afin de vérifier la fonctionnalité du TF nouvellement exprimé à la surface cellulaire. Ce test repose sur la capacité du TF à lier son ligand naturel, le FVIIa (Dietzen, Page et Tetzloff, 2004). La figure 3.4-B indique que les BAEC surexprimant le TF possèdent une activité pro-coagulante qui est environ 5,0 fois supérieure à celle obtenue par transfection avec le vecteur vide (pcDNA). Ce résultat indique que le TF établit les interactions appropriées avec le FVIIa favorisant l'activité protéolytique du complexe TF/FVIIa (McCallum et al., 1996, 1997).

3.2.2 La surexpression du TF induit une élévation de la migration cellulaire

L'expression du TF au niveau de la masse tumorale ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales qui assurent sa vascularisation a été mise en évidence *in situ* dans un modèle de cancer du sein (Contrino et al., 1996). Les carcinomes rénaux sont également caractérisés par l'expression du TF ainsi que par une forte vascularisation (Shi et Siemman, 2002; Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986). L'effet de la surexpression du TF au niveau du potentiel de migration cellulaire a été évalué *in vitro* à l'aide de chambres de Boyden.

Tel qu'illustré à la figure 3.5-A, les cellules surexprimant le TF migrent environ 3 fois plus vers une solution sérique de 10 % en comparaison au témoin pcDNA. Les essais de migration ont été repris en utilisant une plus grande variété de chimio-attractants (figure 3.5-B). La migration des cellules surexprimant le TF est optimale en présence de sphingosine-1-phosphate (S-1-P) et de sérum bovin (BCS), ces agents permettent respectivement de doubler et tripler leur potentiel de migration par rapport aux cellules transfectées avec le vecteur vide (figure 3.5-B). De plus, les effets de la S-1-P et du BCS sont observés au niveau de la migration des cellules transfectées avec le pcDNA. Plus spécifiquement, la S-1-P augmente leur migration de 5,0 fois par rapport au témoin (pcDNA) tandis qu'une élévation de 4,0 fois est obtenue en présence de BCS. La migration des cellules surexprimant ou non le TF demeure basale en présence du milieu sans sérum (témoin) ainsi qu'en présence du FVIIa.

Ces résultats indiquent que l'expression du TF, en présence ou non de FVIIa, ne suffit pas pour induire la migration cellulaire. Une induction est plutôt observée lorsque les cellules surexprimant le TF sont mises en présence de S-1-P et de BCS. Ces résultats suggèrent alors une coopération entre le TF, la S-1-P et les différents constituants du sérum.

3.2.2 Le TF induit la différenciation morphologique *in vitro* des cellules endothéliales en structures de type capillaire

Il a été démontré que le TF joue un rôle déterminant lors de l'embryogenèse. Lorsqu'un embryon murin possède un phénotype récessif (-/-) pour le gène du TF, celui-ci subit une mort *in utero* après 8 à 10 jours de développement embryonnaire. L'analyse placentaire révèle une anomalie au niveau de la néovascularisation, ce phénomène n'a pas été observé chez les placentas dérivés d'embryons TF +/+ et TF +/- (Erlich et al., 1999; Pawlinski et al., 2004). La capacité du TF à induire la réorganisation des cellules endothéliales a été évaluée à l'aide de matrigel™, une réplique *in vitro* de la matrice extracellulaire constituée de métalloprotéases et de facteurs de croissance issus des tumeurs Engelbreth-Holm-Swarm (BD Biosciences). Les BAEC ont été choisies comme modèle endothélial parce qu'elles n'expriment pas le TF à un état quiescent (Nawroth et al., 1985) et parce qu'elles ne forment pas spontanément des structures de type capillaire (Shu et al., 2002).

Les résultats de la figure 3.6 illustrent que le TF induit une forte réorganisation des cellules endothéliales surtout en présence de BCS et de S-1-P. Dans ce contexte, les cellules s'étirent afin d'établir des contacts avec d'autres cellules favorisant la formation de structures apparentées aux capillaires sanguins. Ce phénomène de réorganisation n'a pas été observé lorsque le TF est uniquement mis en présence du FVIIa (absence de sérum). Les résultats indiquent également que la transfection du vecteur vide n'induit aucune formation de structures de type capillaire peu importe la condition testée, d'où sa validité comme témoin négatif. L'effet du TF sur la différenciation morphologique des cellules endothéliales en structures de type capillaires a également été quantifié (figure 3.7). Tel qu'énoncé plus haut, la réorganisation endothéliale est optimale en présence de BCS et de S-1-P à des taux

respectifs de 2,3 et 4,2 fois plus élevés par rapport au témoin pcDNA. De plus, la quantification indique que le FVIIa et le milieu sans sérum (témoin) n'induisent pas de réorganisation cellulaire (figure 3.7). Ces résultats indiquent que la surexpression du TF en combinaison avec la S-1-P et les composants sériques entraînent la différenciation morphologique des cellules endothéliales ce qui favorise la formation des structures apparentées aux capillaires sanguins.

3.2.3 Limitations techniques rencontrées avec le modèle endothélial choisi pour l'étude *in vitro* des propriétés angiogéniques

Les BAEC ont été un modèle idéal pour l'étude des propriétés angiogéniques car tel qu'indiqué par la littérature, elles ne surexpriment pas le TF et elles ne forment pas de manière spontanée des structures apparentées aux capillaires sanguins (Nawroth et al., 1985; Shu et al., 2002). Par contre, certaines difficultés techniques ont été rencontrées lors de l'étude des propriétés angiogéniques. Plus spécifiquement, une certaine variabilité phénotypique a été observée entre les différents lots de BAEC.

Toutes les expériences compilées dans les figures 3.5 à 3.7 ont été effectuées avec un même lot de cellules dont le phénotype endothélial corrélait avec celui préalablement décrit (Shu et al., 2002). Plusieurs autres lots de BAEC ont été testés afin de reproduire les résultats et diversifier davantage l'étude du TF sur les propriétés angiogéniques. C'est à ce niveau de l'expérimentation que les différences entre les lots ont été observées. Les cellules endothéliales des nouveaux lots formaient spontanément des structures de type capillaire sans même subir de transfection et même en absence de chimio-attractants (figure 3.8). De plus, l'immuno-buvardage de type western suivi d'une immuno-détection a démontré que la transfection de l'ADNc du TF ne s'effectuait pas chez ces lots de BAEC (lots non-transfectables) comparativement aux BAEC transfectables utilisées dans les figures 3.5 à 3.7 (figure 3.9). Afin de vérifier la qualité de l'ADNc du TF, celui-ci a été transfecté chez les cellules Cos-7, une lignée épithéliale dont le taux de transfection atteint environ 70% en utilisant la méthode du Polyfecte® (QIAGEN). L'immuno-détection a révélé la présence

d'une bande de 47 kDa dans le lysat cellulaire des Cos-7 indiquant alors que l'ADN transfecté code pour le TF et que la transfection des nouveaux lots de BAEC n'était pas réussie (figure 3.9).

L'échec de la transfection de l'ADNc du TF ainsi que le phénotype altéré des nouveaux lots de BAEC explique l'absence de l'induction migratoire (résultats non-illustrés) et de la formation spontanée des structures de type capillaires chez les cellules provenant directement du fournisseur (Clonetics). Pour ces raisons, il a fallu élargir le projet afin d'étudier les effets du TF chez un modèle cellulaire qui exprime de manière constitutive le TF. Il a été préalablement démontré que les cellules épithéliales de carcinome rénal expriment le TF (Förster et al., 2003; Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986). Ces cellules ont alors été choisies afin d'étudier l'effet du TF sur leur potentiel de migration.

3.3 La migration des cellules épithéliales et métastatiques de carcinome rénal humain

3.3.1 Une surexpression constitutive du TF dans les cellules de carcinome rénal

Les tumeurs rénales sont caractérisées par les dépôts massifs de fibrine dans les espaces intra et extravasculaires ainsi que par la présence des facteurs VII et X dans les espaces intercellulaires du stroma tumoral. Ces observations suggèrent alors que le phénotype pro-coagulant, qui est caractéristique à ses tumeurs, est assuré par une activation locale de la coagulation extrinsèque via la formation du complexe TF/FVIIa (Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986). Avant de pouvoir étudier la formation du complexe TF/FVIIa chez les cellules épithéliales de carcinome rénal, il a fallu démontrer par immuno-détection l'expression constitutive de la protéine.

L'immuno-détection du TF dans les lysats des Caki-1 (cellules métastatiques) et des Caki-2 (cellules non-métastatiques) a permis de mettre en évidence la présence d'une bande de 47 kDa (figure 3.10). Il est à noter que l'intensité des bandes obtenues dans les lysats des

Caki-2 sont plus intenses que celles des Caki-1. Malgré cette différence, la bande de 47 kDa a toujours été retrouvée dans les lysats cellulaires des Caki qui ont été employées lors des expérimentations. Ceci indique alors qu'il n'y a pas eu de changements phénotypiques induisant la perte de l'expression du TF (figure 3.10).

3.3.2 Le FVIIa influence la migration des cellules cancéreuses

Il a été préalablement décrit que le complexe pro-coagulant TF/FVIIa induit la migration cellulaire selon un mécanisme indépendant de la coagulation extrinsèque. L'équipe de Sato a étudié la migration des cellules musculaires lisses tandis que les cellules MDA-MB-231 qui sont des cellules épithéliales issue de carcinome du sein ont été examinées par l'équipe de Hjortoe. Dans les deux cas, le complexe TF/FVIIa promouvoit une migration cellulaire qui est inhibée lorsqu'en présence du *tissue factor pathway inhibiteur* (TFPI) qui est l'inhibiteur spécifique du complexe pro-coagulant (Hjortoe et al., 2004; Sato et al., 1997). La migration des Caki-1 a alors été étudiée en présence de FVIIa afin d'évaluer l'effet du complexe TF/FVIIa sur l'induction du potentiel migratoire des cellules épithéliales et métastatiques de carcinome rénal (Caki-1).

La migration basale des Caki-1 double en présence de 10 et de 25 nM de FVIIa (figure 3.11). Une hausse du potentiel de migration d'environ 1,7 fois est également observée à 40 nM de FVIIa; par contre, une concentration de 50 nM ne stimule la migration au-delà du niveau basal. Ces résultats illustrent que la migration des Caki-1 est induite à plusieurs concentrations de FVIIa même si cette induction n'est pas directement proportionnelle à la concentration utilisée. En effet, la migration des Caki-1 en fonction de concentrations croissantes de FVIIa semble emprunter l'allure d'une courbe gaussienne (figure 3.11).

3.4 Une comparaison du comportement migratoire des cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal humain

3.4.1 Les effets du FVIIa et des agonistes de PAR sur la migration cellulaire

Une étude comparative de la migration des cellules métastatiques (Caki-1) et non-métastatiques (Caki-2) a été effectuée afin d'évaluer la migration basale de chaque lignée cellulaire ainsi que la capacité du FVIIa à stimuler davantage ce processus.

La figure 3.12-A illustre que le potentiel de migration des Caki-1 est optimal en présence de 10 nM de FVIIa, ceci permet d'obtenir une induction d'environ 1,8 fois ce qui est comparable à l'induction d'environ 2 fois obtenue à la figure 3.11. De plus, une deuxième induction de plus faible intensité a été observée à une concentration de 0,10 nM de FVIIa qui stimule la migration des Caki-1 d'environ 1,4 fois (figure 3.12-A). Toutes les autres concentrations testées ont maintenu la migration basale (absence de FVIIa) sans provoquer d'induction supplémentaire. En ce qui concerne les Caki-2, celles-ci possèdent un taux de migration basal plus élevé que les Caki-1 d'au moins 1,5 fois, cette valeur est sous-estimée à cause de l'écart type élevé obtenu lors de l'essai de migration. La présence du FVIIa ne stimule pas davantage la migration des Caki-2 car les cellules maintiennent le même taux de migration que celui obtenu en absence de FVIIa (1,5 fois) (figure 3.12).

Il a été préalablement illustré que la thrombine stimule la migration des cellules de carcinome rénal via sa liaison aux récepteurs PAR-1 et PAR-3 qui sont co-exprimés à la surface cellulaire (Kauffman et al., 2002 a, b). Il a été également démontré que la migration des cellules musculaires lisses et des cellules de carcinome du sein (MDA-MB-231) s'effectue suite à la formation du complexe TF/FVIIa mais non en présence de thrombine et de facteur X. Ces mêmes études ont démontré que l'ajout d'anticorps neutralisants dirigés contre PAR-2 inhibait l'induction de la migration obtenue en présence de FVIIa (Hjortoe et al., 2004; Maratsuka et al., 2002). Il a donc été suggéré que le complexe TF/FVIIa permet l'activation des PAR-2 induisant alors certains processus tels que la migration et la prolifération cellulaire (Fan et al., 2005; Hjortoe et al., 2004; Maratsuka et al., 2002). Afin

d'investiguer la capacité du complexe TF/FVIIa à activer les récepteurs PAR-1 et PAR-2, la migration des Caki-1 et des Caki-2 a été effectuée en présence de 10 nM de FVIIa car elle induit une migration optimale des Caki-1 (figure 3.11) et comparée à celle effectuée en présence des agonistes de PAR-1 et de PAR-2.

La figure 3.12-B illustre que la migration basale (Témoin) des Caki-1 est stimulée d'environ 1,5 fois en présence de 10 nM de FVIIa. De plus, l'agoniste de PAR-2 assure une induction d'environ 1,7 fois, ce qui est comparable à celle obtenue avec le FVIIa. Quant à l'agoniste de PAR-1, celui-ci ne stimule aucunement la migration basale des Caki-1 (figure 3.12-B). En ce qui concerne les Caki-2, leur migration basale en absence de chimio-attractant est 2,5 fois supérieure à celle des Caki-1, ceci diffère de la variation de 1,5 fois qui a été observée à la figure 3.12-A. Il faut alors spécifier que le passage cellulaire influence la migration basale des Caki-2. En effet, la migration basale des Caki-2 diminue en fonction du passage cellulaire croissant. Pour ces raisons le même lot de Caki-2 mais de passage cellulaire plus faible a été utilisé afin d'obtenir les résultats de la figure 3.12-B, ce qui explique pourquoi la migration basale des Caki-2 s'élève à 2,5 fois par rapport à celle des Caki-1. Une situation similaire a été observée lors de l'étude de la migration des cellules MDA-MB-231. L'induction de la migration de ces cellules en présence de 50 nM de FVIIa a varié entre 2,5 et 6,0 fois par rapport à la migration basale et ceci dans trois expériences différentes (Hjortoe et al, 2004). La figure 3.12-B illustre alors la migration des Caki-2 récoltées après 28 passages cellulaires et non après 40 tel qu'illustré à la figure 3.13-A. Pour récapituler, les Caki-2 possèdent une migration basale qui est nettement supérieure à celle des Caki-1. La présence de FVIIa ainsi que des agonistes de PAR-1 et de PAR-2 ne stimulent pas davantage la migration des Caki-2 car les taux d'induction sont similaires à ceux de la migration de base qui est de 2,5 fois (figure 3.12-B).

Ces résultats indiquent que les Caki-1 et les Caki-2 possèdent des comportements de migration qui diffèrent au niveau basal. Dans le premier cas, la migration basale est plus faible mais elle peut être stimulée en présence de FVIIa et d'agoniste de PAR-2. Dans le deuxième cas, la migration des Caki-2 est 1,5 à 2,5 fois plus élevée que celle des Caki-1. Par

contre la migration des Caki-2 est faiblement stimulée lorsqu'en présence de FVIIa et des agonistes peptidique de PAR-1 et de PAR-2.

3.4.2 Les effets de différents inhibiteurs sur la migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus hautement coordonné qui implique l'activation de nombreuses voies de signalisation (Gingras et al., 2001). Il a été démontré que le complexe TF/FVIIa permet l'activation de PAR-2 qui induit à son tour la prolifération et la migration cellulaire (Fan et al., 2005; Hjortoe et al., 2004; Maratsuka et al., 2002). Il est donc possible que ce même complexe active d'autres intermédiaires et/ou récepteurs qui participent à l'élévation de la migration via l'activation d'une voie de signalisation.

Il a été démontré que les cellules épithéliales de carcinome rénal issues directement de patients cancéreux expriment le récepteur du facteur de croissance épidermal, EGFR (Kedar et al., 2002; Paule et Brion, 2003). En conditions physiologiques, la liaison du EGFR à son récepteur permet d'induire son activité tyrosine kinase ce qui déclenche une cascade de signalisation impliquant la voie des MAP kinases (Kedar et al., 2002). L'activation de cette même voie a été également observée chez les cellules HaCat suite à la transactivation du EGFR par le complexe TF/FVIIa (Wiiger et Prydz., 2004). Il a été également démontré que les cellules de carcinome rénal expriment des taux élevés de métalloprotéases de type matriciel. Ces enzymes dégradent la matrice extracellulaire lors de la migration et de l'invasion cellulaire (Hemmerlein et al., 2004). La transactivation des métalloprotéases par le complexe TF/FVIIa n'a été préalablement observée.

Afin d'étudier la transactivation de certaines protéines par le complexe TF/FVIIa et leur influence sur la migration des Caki-1 et des Caki-2, des inhibiteurs ont été utilisés pour bloquer certaines voies de signalisation. En effet, l'inhibition du EGFR, des métalloprotéases matricielles ainsi que de la voie des MAP kinases a été effectuée respectivement en présence du tyrphostin (AG1478), du batimastat (BB94) et de l'inhibiteur de wortmannin (PD98059).

Les cellules ont également été mises en présence du DMSO qui est le solvant des inhibiteurs testés, ceci permettra d'évaluer si l'inhibition est due à la présence de la molécule inhibitrice ou à celle du solvant dans lequel elle a été solubilisée. Les effets du DMSO sur la migration des cellules épidermales a déjà été démontré. En effet, cette étude illustre que la migration cellulaire n'est pas affectée à une faible concentration de DMSO par contre celle-ci est complètement inhibée lorsque le solvant atteint une concentration de 5 % (Donaldson et Dunlap, 1981).

La figure 3.13-A illustre qu'en absence d'inhibiteurs (- Inh) la migration des Caki-1 est stimulée en présence de 10 nM de FVIIa et de l'agoniste de PAR-2 respectivement de 1,8 et de 2,1 fois par rapport au témoin non stimulé (- Inh/ 0 nM FVIIa). L'agoniste de PAR-1 ne stimule pas la migration étant donné que l'induction obtenue est seulement de 1,1 fois par rapport au témoin non stimulé. Il est à noter que ces résultats sont similaires à ceux déjà présentés à la figure 3.12-B. L'ajout de DMSO lors de la migration élève le potentiel migratoire des Caki-1 même en absence de chimio-attractants, une induction double est observée par rapport au témoin non-stimulé. Ceci explique pourquoi la migration en présence de FVIIa et de l'agoniste de PAR-2 augmentent respectivement de 3,3 et de 3,2 fois par rapport au témoin non stimulé. La combinaison du DMSO et de l'agoniste de PAR-1 n'influence pas tellement la migration car une induction de 1,3 fois par rapport au témoin non-traité a été observée (figure 3.13-A). Afin d'évaluer les effets des différents inhibiteurs, il a fallu les comparer aux conditions DMSO et ceci à cause de l'utilisation de ce solvant lors de la préparation du AG1478, du BB94 et du PD98059. L'inhibiteur du EGFR (AG1478) baisse légèrement la migration en absence de FVIIa par rapport à l'induction obtenue avec le DMSO. Par contre, le AG1478 inhibe la migration induite par le FVIIa d'environ 40 % par rapport au DMSO (3,3 à 2,0 fois d'induction). Cet inhibiteur n'affecte pas la migration effectuée en présence des agonistes de PAR-2 et de PAR-1 car les taux d'induction par rapport au DMSO passent respectivement de 3,2 à 2,9 fois (9 % d'inhibition) et de 1,3 à 1,2 fois, ce qui représente une inhibition de 8 % (figure 3.13-A). Quant à l'inhibiteur des métalloprotéases (BB94), celui-ci affecte la migration obtenue en absence de FVIIa car le taux d'induction par rapport au DMSO passe de 1,9 à 1,4 (30 % d'inhibition). La migration qui est obtenue en présence de FVIIa et d'agoniste de PAR-2 est inhibé d'environ 30 % par

rapport à celui obtenu avec le DMSO. Plus spécifiquement, les taux de migration passent de 3,3 à 2,3 fois pour le FVIIa (inhibition de 30%) et de 3, 2 à 2,4 fois (inhibition de 25 %). La migration induite par l'agoniste de PAR-1 n'est pas affectée par la présence de BB94 car le taux d'induction passe de 1,3 à 1,5 fois (figure 3.13-A). L'utilisation du PD98059, un inhibiteur de la voie des MAP kinases a inhibé la migration cellulaire en absence et en présence de FVIIa ainsi que de l'agoniste de PAR-2. La migration effectuée en absence de FVIIa diminue d'environ 50 % (de 1,9 à 1,0 fois) par rapport à celle observée en présence de DMSO. Les inhibitions les plus marquées ont été obtenues en présence du FVIIa et de l'agoniste de PAR-2 où les taux passent respectivement de 3,3 à 1,3 fois (inhibition de 60 %) et de 3,2 à 1,5 fois (inhibition de 50%) par rapport aux taux obtenus en présence de DMSO. La migration observée en présence de l'agoniste de PAR-1 est inhibée de 46 % par rapport à celle du DMSO, le taux de migration passe de 1,3 à 0,7 fois d'induction par rapport au témoin non stimulé (figure 3.13-A).

La figure 3.13-B illustre que le taux de migration des Caki-2 demeure similaire en absence et en présence de FVIIa et de l'agoniste de PAR-2. L'ajout du DMSO affecte la migration cellulaire étant donné que la migration en absence de FVIIa s'élève à 1,7 fois par rapport au témoin non stimulé (- Inh/ 0nM FVIIa). Cet effet est également observé en présence de FVIIa et de l'agoniste de PAR-2 car les taux de migration augmentent respectivement de 1,2 à 1,8 fois et de 1,1 à 1,6 fois par rapport au témoin non stimulé. Malgré cette élévation, il n'y a pas une grande différence entre les migrations induites en présence de DMSO (figure 3.13-B). L'ajout de AG1478 inhibe légèrement la migration effectuée en absence et en présence de FVIIa par rapport aux taux obtenus en présence de DMSO. Les taux d'induction passent respectivement de 1,7 à 1,3 fois (inhibition de 24 %) et de 1,8 à 1,6 fois (inhibition de 13 %). La combinaison de l'agoniste de PAR-2 et de l'AG1478 élève la migration par rapport à celle obtenue avec le DMSO, le taux d'induction passe de 1,6 à 2,0 fois par rapport au témoin non stimulé (figure 3.13-B). La présence de BB94 inhibe le taux de migration des Caki-2 par rapport à ceux obtenus en présence de DMSO. Plus spécifiquement, les taux de migration en absence de FVIIa et en présence de FVIIa et de l'agoniste de PAR-2 passent respectivement de 1,7 à 1,3 (inhibition de 24%), de 1,8 à 1,3 fois (inhibition de 30 %) et de 1,6 à 1,1 fois (inhibition de 30 %) (figure 3.13-B). L'utilisation du

PD98059 induit une baisse marquée de la migration en absence et en présence de FVIIa ainsi que de l'agoniste de PAR-2. Les taux d'induction passent respectivement de 1,7 à 0,5 fois (inhibition de 70 %), de 1,8 à 0,3 (inhibition de 83%) et de 1,6 à 0,7 fois (inhibition de 56 %) en comparaison avec les taux obtenus avec le DMSO.

Ces résultats indiquent que la migration des Caki-1 induite par le FVIIa est sensible à l'inhibiteur du EGFR, des métalloprotéases et de la voie des MAP kinases (AG1478, BB94 et PD98059). Par contre, la migration induite par l'agoniste de PAR-2 diminue en présence des inhibiteurs de MMP et de la voie des MAP kinases (BB94 et PD98059). L'agoniste de PAR-1, n'induit pas la migration des Caki-1, en présence ou en absence d'inhibiteurs. De plus, les résultats indiquent que le comportement migratoire des Caki-2 diffèrent de celui des Caki-1. Le FVIIa ne stimule pas la migration de base des Caki-2, le même phénomène est observé en présence de l'agoniste de PAR-2. La migration de ces cellules en absence de chimio-attractants est sensible à l'AG1478 tandis que la migration effectuée en présence de FVIIa et d'agoniste de PAR-2 n'est pas affectée en présence de AG1478. Le BB94 inhibe la migration des Caki-2 peu importe le type de chimio-attractant utilisé. Finalement, l'inhibition de la migration des Caki-1 qui est la plus marquée a été observée en présence du PD98059.

3.4.3 Une comparaison de l'activité pro-coagulante des cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal

Il a déjà été démontré que le complexe TF/FVIIa est impliqué lors de l'induction de la migration de certaines lignées cellulaires (Hjortoe et al., 2004; Sato et al., 1997). De plus, la transactivation de certains récepteurs par ce complexe pro-coagulant a été mise en évidence, suggérant alors que le complexe TF/FVIIa active indirectement certaines voies de signalisation qui peuvent stimuler davantage certains processus cellulaires dont la migration et la prolifération cellulaire (Fan et al., 2005; Maratsuka et al., 2002). Étant donné l'importance du complexe TF/FVIIa, cette portion de l'expérimentation a permis de quantifier la formation de ces complexes chez les cellules métastatiques et non-métastatiques

de carcinome rénal permettant alors d'identifier les différences au niveau de leur phénotype pro-coagulant.

Tout d'abord, l'activité pro-coagulante des Caki-1 et Caki-2 a été déterminée en fonction d'une quantité croissante de cellules. Tel qu'illustré à la figure 3.14-A, les Caki-2 qui sont les cellules non-métastatiques possèdent un phénotype pro-coagulant qui est environ 2,5 fois plus prononcé que leur contrepartie métastatique, les Caki-1. De plus, les courbes générées lors de cet analyse possèdent des allures différentes. Celle générée par les Caki-2 possède une portion linéaire avant d'atteindre un plateau représentant l'activité pro-coagulante maximale. Tandis que pour les Caki-1, la courbe obtenue représente plutôt une fonction linéaire où il n'y a pas atteinte d'un maximum d'activité pro-coagulante.

Il a été démontré que l'activité pro-coagulante des cellules cancéreuses et dont des cellules issues de carcinome rénal dépend de l'expression du TF et de la présence du FVII (Hu et al., 1994; Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986). En effet, les interactions entre ces deux molécules est tellement importante que l'ajout d'un anticorps monoclonal dirigé vers l'ectodomaine du TF abolit sa liaison au FVII, entravant alors l'activité pro-coagulante (Hu et al., 1994; Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986). Sachant que le dosage *in vitro* de l'activité pro-coagulante dépend directement de la formation du complexe TF/FVIIa, ce test a été utilisé afin de vérifier l'influence de l'inhibiteur du EGFR (AG1478), des MMP (BB94), de la voie des MAP kinases (PD98059) ainsi que du DMSO (solvant) sur la capacité des Caki-1 et des Caki-2 à lier le FVIIa. De plus, ce test a permis de mettre en évidence toute altération de l'activité pro-coagulante pour ensuite corrélérer avec le comportement migratoire préalablement observé (figure 3.13).

Il est à noter que le DMSO a été le solvant employé lors de la solubilisation de tous les inhibiteurs, son effet sur l'activité pro-coagulante constitue alors un témoin important car il a été préalablement démontré que celui-ci module à la hausse les propriétés pro-coagulantes, fibrinolytiques et invasives des cellules tumorales (Casali et al., 1988). De plus, il a été

illustré que ce solvant permet de stabiliser l'expression du TF via une augmentation de la fluidité membranaire (Maynard et al., 1976).

Le dosage de l'activité pro-coagulante des cellules de carcinome rénal a révélé qu'en absence d'inhibiteurs (- Inh) les Caki-2 possèdent une activité qui est deux fois plus élevée que celle des Caki-1 (figure 3.14-A). Ces résultats indiquent que les cellules non-métastatiques forment plus de complexes TF/FVIIa à leur surface cellulaire comparativement aux cellules métastatiques. L'équipe de Förster a rapporté un résultat similaire car leur étude a démontré que les cellules de carcinome rénal expriment moins de TF en comparaison à leur contrepartie non-maligne (Förster et al., 2003).

Quant à elle, la figure figure 3.14-B illustre que l'activité pro-coagulante de Caki-1 demeure inchangée en présence des inhibiteurs du AG1478, du BB94 et du PD98059. Par contre, les résultats indiquent que la présence du DMSO permet une élévation de l'activité pro-coagulante d'environ 2,3 fois par rapport à l'activité obtenue en absence d'inhibiteurs (- inh). L'activité de pro-coagulation des Caki-2 est environ 2 fois plus élevée que celle obtenue avec les Caki-1, ce qui concorde avec les résultats de la figure 3.14-A. L'activité du complexe TF/FVIIa obtenue en présence de DMSO, de BB94 et de PD98059 est similaire à celle qui a été observée en absence d'inhibiteurs (-Inh) par contre une inhibition d'environ 50% a été observé en présence du AG1478 (figure 3.14-B). Ce dernier résultat illustre alors que le AG1478 altère l'activité pro-coagulante en entravant les interactions entre le TF et le FVIIa.

Ces résultats démontrent que l'activité pro-coagulante des Caki-2 est supérieure à celle des Caki-1. De plus, l'ajout des inhibiteurs ne diminue pas l'activité pro-coagulante au delà de l'activité basale chez les Caki-1. Un phénomène similaire est observé chez les Caki-2 avec une exception, le AG1478 permet d'inhiber l'activité pro-coagulante basale d'environ 50 %.

3.5 Étude de l'activation des voies des MAP kinases chez les cellules métastatiques de carcinome rénal

3.5.1 Le FVIIa active la voie des MAP kinases

Il a été préalablement démontré que la migration des cellules endothéliales surexprimant la MT1-MMP est possible via l'activation de la voie des MAP kinases car en présence de l'inhibiteur de cette voie, le PD98059, la migration est abolie (Gingras et al., 2001). Étant donné qu'une inhibition de la migration des Caki-1 et des Caki-2 a été observée en présence de ce même inhibiteur (figure 3.13), une étude a été effectuée afin d'évaluer la capacité du FVIIa à activer la voie des MAP kinases chez les cellules de carcinome rénal qui surexpriment naturellement le TF et donc qui ne nécessitent pas de transfection (figure 3.10).

Il a déjà été rapporté que la liaison du TF au FVIIa induit une série de signalisations intracellulaires qui cible de nombreuses protéines cytosoliques dont la poly(A)-polymérase (Pendurthi, Alok et Rao, 1997), les MAP kinases, la p38 (Poulsen et al., 1998; Sorensen et al., 1999) ainsi que différents membres de la famille Src (c-Scr, Lyn et Yes) qui permettent ensuite la stimulation des petites protéines G, Rac et Cdc42 (Versteeg et al., 2000). Cette portion de l'expérimentation a alors permis d'évaluer la capacité ainsi que la rapidité du complexe TF/FVIIa à induire la phosphorylation de la protéine *extracellular signal regulated kinase* (ERK) qui est un membre important de la famille des MAP kinases (Rubinfeld et Seger, 2005).

La figure 3.15 illustre qu'une cinétique de stimulation en présence de 10 nM de FVIIa induit une activation et donc une phosphorylation de ERK chez les cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal (Caki-1). En premier lieu, une phosphorylation de ERK a été mise en évidence par la présence d'un doublet protéique de 42 et 44 kDa après une minute de stimulation au FVIIa (figure 3.15-A, panneau P-ERK). Il est à noter que pour toutes les stimulations au FVIIa, un essai non stimulé a toujours été effectué en parallèle et dans tous les cas le doublet de protéines observé était de plus faible intensité que celui obtenu par stimulation au FVIIa. La phosphorylation optimale a été observée après 5 minutes et celle-ci

a été maintenue jusqu'à 15 minutes de stimulation. En deuxième lieu, la membrane qui a servi pour l'immuno-détection de P-ERK a été deshybridée afin de servir lors de l'immuno-détection de ERK. En effet, cette étape a permis de mettre en évidence un doublet de protéines de même intensité chez toutes les conditions testées démontrant alors que tous les échantillons déposés possédaient une quantité égale de protéines. Ceci indique alors que les bandes obtenues lors de l'immuno-détection de P-ERK reflètent une stimulation réelle des MAP kinases et non une variation de la quantité de protéines déposée sur le gel (figure 3.15). La même rapidité d'activation de la voie des MAP kinases a été également observée chez les cellules musculaires lisses stimulées avec 100 nM de FVIIa, une concentration dix fois supérieure à celle utilisée à la figure 3.15-A. Lors de cette étude menée par l'équipe de Cirillo, une phosphorylation initiale a été observée après 2 minutes tandis que la phosphorylation optimale a été obtenue après 5 minutes de stimulation (Cirillo et al., 2004).

La figure 3.15-B illustre la phosphorylation de ERK en fonction de concentrations croissantes de FVIIa. La présence de FVIIa lors de la stimulation des Caki-1 pendant une période de 5 minutes a induit la phosphorylation de ERK en ceci en comparaison aux cellules non stimulées (figure 3.15-B). Une concentration de 1 nM de FVIIa suffit pour induire la phosphorylation de ERK. Par contre, celle-ci semble diminuer entre 2 et 5 nM de FVIIa pour réapparaître à la même intensité à 10 nM, celle-ci persiste jusqu'à 20 nM et diminue encore une fois entre 30 et 40 nM. Une immuno-détection de ERK a ensuite été effectuée sur la même membrane suite à une étape de deshybridation. Ceci a permis de confirmer que tous les échantillons déposés sur le gel possèdent la même quantité de protéines (figure 3.15-B, panneau ERK) validant alors que toutes les variations de la phosphorylation de ERK sont des effets dérivant de la liaison entre le TF et le FVIIa et non de l'inégalité des dépôts protéiques. L'obtention de ce résultat permet alors de stipuler que l'activation de ERK chez les Caki-1 prend une allure bi-phasique.

3.5.2 Effet de la thrombine, de la pro-thrombine, du FVIIa et des agonistes de PAR sur l'activation de la voie de ERK

Il a été préalablement suggéré que le complexe TF/FVIIa peut induire la trans-activation de certains récepteurs, ce phénomène a surtout été démontré au niveau de la migration des cellules musculaires lisses et des cellules MDA-MB-231 (Hjortoe et al., 2004; Sato et al., 1997). Étant donné que ERK est impliqué dans une diversité de processus cellulaires dont la migration (Gingras et al., 2001), cette portion de l'expérimentation a porté sur la comparaison de la cinétique d'activation de ERK des Caki-1 et les Caki-2.

Il a été préalablement démontré que les cellules de carcinome rénal expriment les récepteurs de PAR au niveau de leur surface cellulaire (Kaufmann et al., 2002 a, b). Il a été également suggéré que le complexe TF/FVIIa induit la transactivation de certains récepteurs dont les PAR-2 (Hjortoe et al., 2004; Maratsuka et al., 2005). La trans-activation des PAR a été étudiée indirectement en comparant l'activation de ERK obtenue par le complexe TF/FVIIa à celle obtenue via les agonistes de PAR-1, de PAR-2 et de PAR-4 ainsi qu'à celle obtenue en présence de la pro-thrombine, de la thrombine et du facteur X activé (FXa).

La figure 3.16 indique que la thrombine permet la phosphorylation de ERK après 2 minutes de stimulation. Un phénomène similaire et même plus rapide est observé avec l'agoniste de PAR-1 car celui-ci induit la phosphorylation de ERK à partir de 1 minute et celle-ci persiste jusqu'à 2 minutes de stimulation. Quant à la pro-thrombine, une faible activation de ERK est observée après 2 minutes et cette activation est maximale à 5 minutes de stimulation avant de retourner à un état basal de phosphorylation. Cette activation est comparable à celle obtenue par la stimulation avec l'agoniste de PAR-4. La figure 3.17 illustre que le FVIIa ainsi que le FXa permettent une phosphorylation optimale de ERK après 5 minutes de stimulation. Quant à l'agoniste de PAR-2, celui-ci permet l'activation de ERK mais l'activation est stable car une phosphorylation est encore détectable après 30 minutes de stimulation. Il est à noter qu'en regroupant ensemble toutes les phosphorylations de ERK chez les Caki-1 (figure 3.16-3.17), il est possible de recréer le résultat de la cinétique de stimulation de ERK au FVIIa qui a été obtenue à la figure 3.15. Ceci suggère que le

complexe TF/FVIIa induit la trans-activation des récepteurs PAR-1, PAR-2 et PAR-4. Il est à noter que toutes les membranes utilisées pour l'immuno-détection du P-ERK ont été deshybridées afin de servir lors de l'immunodétection de ERK. Cette immuno-détection a toujours généré un doublet de protéines de même intensité pour tous les échantillons testés indiquant que tous les dépôts effectués sur gel possédaient la même quantité de protéines. Par conséquent les différences de phosphorylation observées lors de l'immuno-détection de P-ERK sont issues de la signalisation du complexe TF/FVIIa et non par le dépôt inégal de protéines sur le gel.

Quant aux Caki-2, la figure 3.18 illustre que le FVIIa et l'agoniste de PAR-2 n'induisent aucune phosphorylation de ERK chez les cellules Caki-2 par contre, une seule activation de ERK a été observée après une stimulation de 5 minutes en présence de l'agoniste de PAR-1. Un comportement similaire a déjà été souligné chez les *Chinese hamster ovarian cells*, CHO. Le FVIIa n'induit aucune activation de ERK, tandis que la thrombine induit une phosphorylation après une stimulation de 5 minutes (Ruf et Mueller, 1999).

Pour récapituler, le complexe pro-coagulant du TF/FVIIa induit l'activation de la voie des MAP kinases chez les Caki-1. Les cinétiques d'activation effectuées en présence des agonistes de PAR indiquent que la rapidité de l'activation de ERK s'effectue dans l'ordre suivant: agoniste de PAR-2 \leq agoniste de PAR-4 \leq agoniste de PAR-1. Ces données indiquent que, sur une période de temps, le complexe TF/FVIIa peut induire la trans-activation de différents PAR suivi de l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire qui active ERK, celui-ci peut à son tour activer plusieurs processus cellulaires dont la migration cellulaire (Hjortoe et al., 2004; Sato et al., 1997). Tandis que la signalisation intracellulaire des Caki-2 s'effectue surtout à partir de PAR-1 dont l'expression chez les cellules de carcinome rénal a été bien démontrée (Kaufmann et al., 2002a, b).

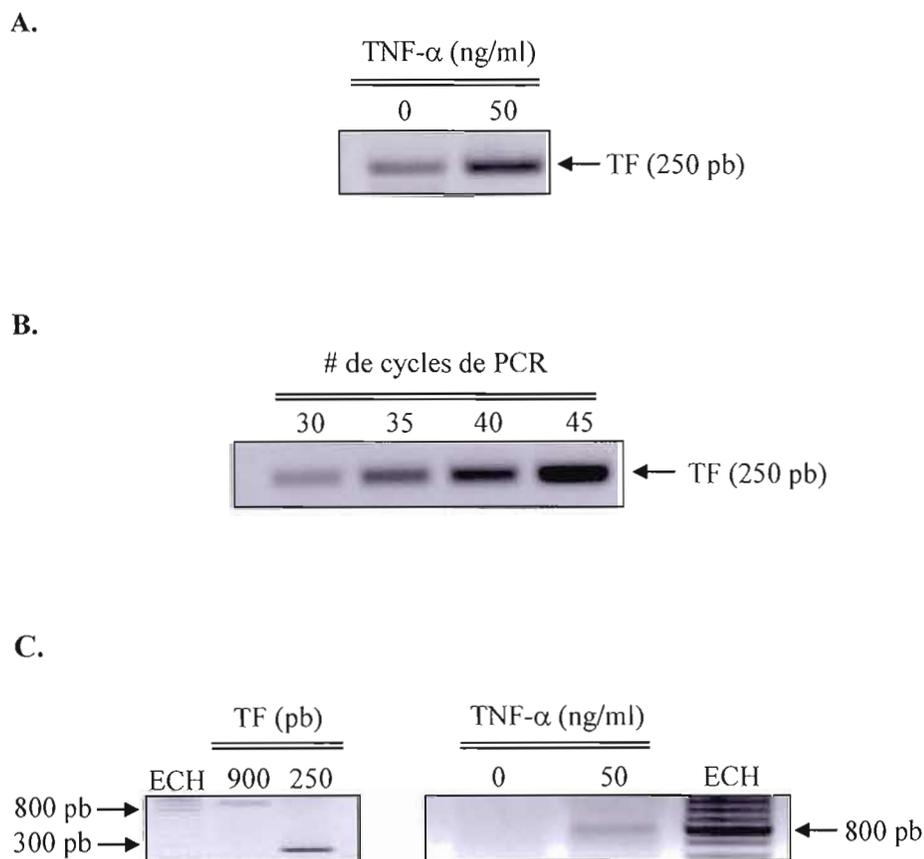
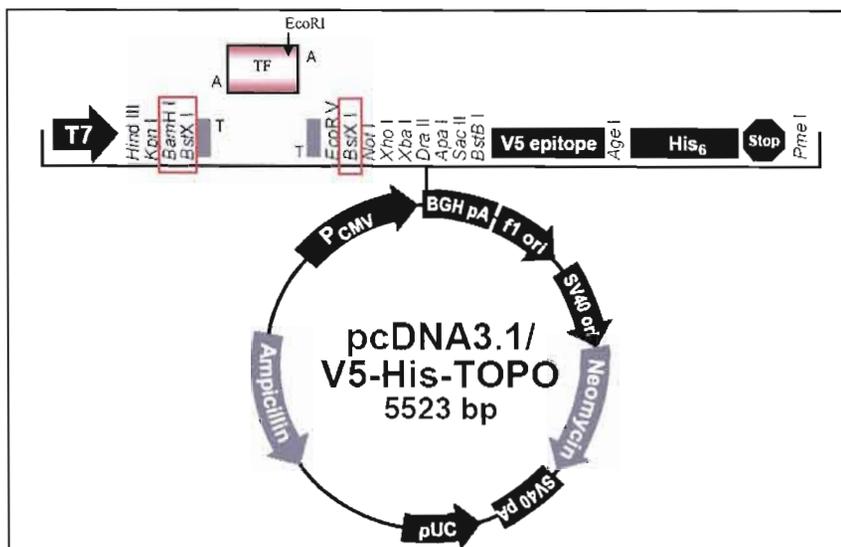


Figure 3.1: Le TNF- α induit la transcription du TF chez les cellules endothéliales humaines

Les HUVEC confluentes à 80% ont été traitées ou non avec 50 ng/ml de TNF- α pendant trois heures, l'ARN total a été isolé et amplifié par RT-PCR (A). L'amplification optimale de l'ADNc obtenu par traitement au TNF- α a été déterminée en variant le nombre de cycles de PCR (B). L'utilisation d'amorces spécifiques a permis l'amplification de la séquence entière (900 pb) et partielle (250 pb) du TF (C). Tous les fragments amplifiés ont été séparés par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1%. ECH: échelle de masse moléculaire. Représentation de trois expériences indépendantes.

A.



B.

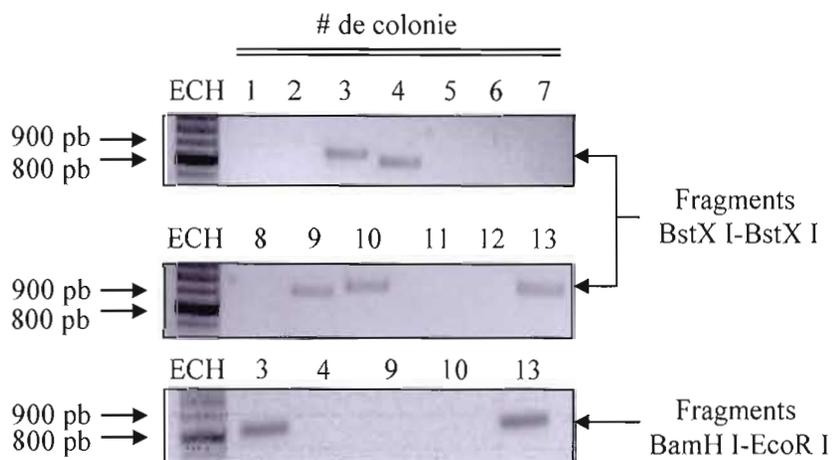


Figure 3.2: Clonage moléculaire de l'ADNc du TF dans le vecteur d'expression pcDNA 3.1/V5-His-TOPO

L'ADNc de taille entière obtenu par RT-PCR a été cloné dans le vecteur pcDNA (A). Les vecteurs recombinants ont été insérés par choc thermique dans des bactéries chimiquement compétentes, des *E. coli* One Shot TOP 10, suivi de leur ensemencement sur une gélose sélective. Les colonies transformées ont été repiquées, leur contenu plasmidique extrait et digéré avec les enzymes BstX I et BamH I+EcoR I (B). Les fragments générés par digestions ont été séparés par migration sur gel d'agarose 1 %. ECH: Échelle de masse moléculaire. Représentation de trois expériences indépendantes.

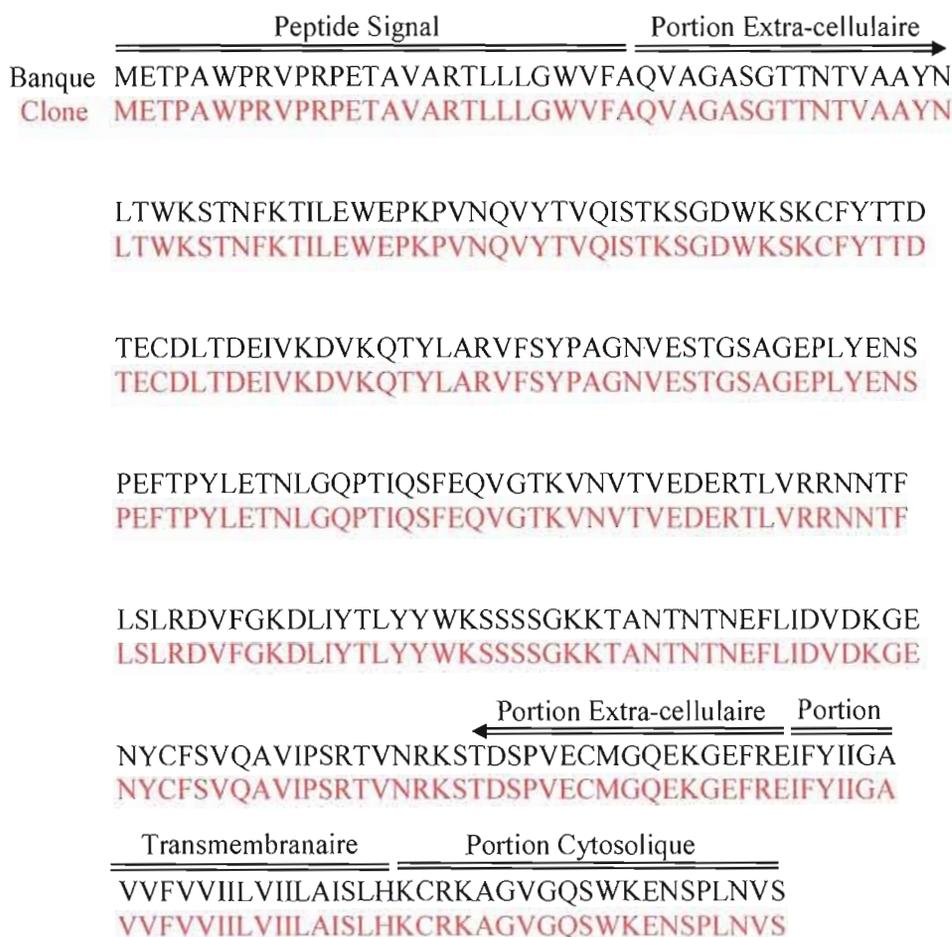
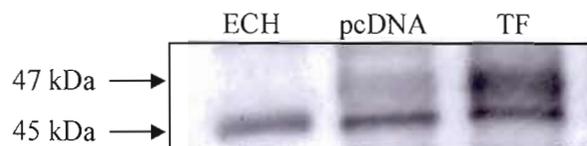


Figure 3.3: Comparaison de la séquence du TF obtenue par clonage moléculaire à celle disponible dans la banque génomique

Suite aux analyses par digestion enzymatique, l'ADN plasmidique des colonies ayant généré des fragments BstX I-BstX I et BamH I-EcoR I (Fig 2B) a été séquencé. La séquence nucléotidique a été comparée à celle disponible dans la base de données du GeneBank et les séquences codant pour la portion extracellulaire, transmembranaire, cytosolique ainsi que pour le peptide signal ont été identifiées.

A.



B.

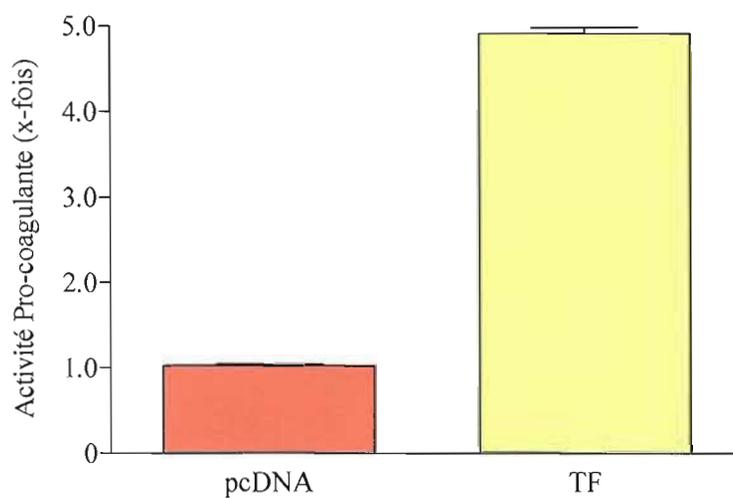
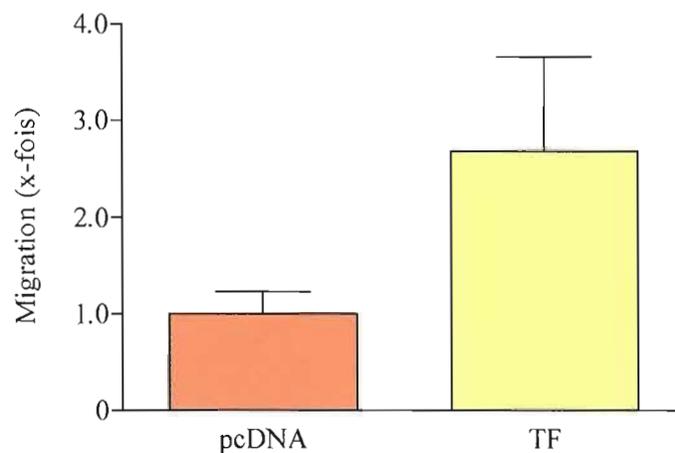


Figure 3.4: Validation de la transfection des cellules endothéliales de l'aorte bovine

Les BAEC sont transfectées avec 0,5 μg de pcDNA ou d'ADNc du TF. Quarante heures post-transfection, les cellules ont été lysées et les protéines totales dosées. Celles-ci ont été déposées à quantité égale (20 μg), et séparées sur un gel de SDS-PAGE. Un immunobuvardage de type western a été effectué suivi d'une immuno-détection avec l'anticorps anti-TF (CL20150A) dilué 1: 5000. ECH: Échelle de masse moléculaire (A). L'activité pro-coagulante a été mesurée en utilisant 25 000 cellules transfectées. Celles-ci sont resuspendues dans un tampon isotonique contenant 10nM de facteur VIIa, 1 μM de facteur X et de 500 μM de Chromozyme X. L'ajout de ce dernier composant déclenche la réaction cinétique qui est suivie pendant une heure à 405 nm (B). Représentation de trois expériences indépendantes.

A.



B.

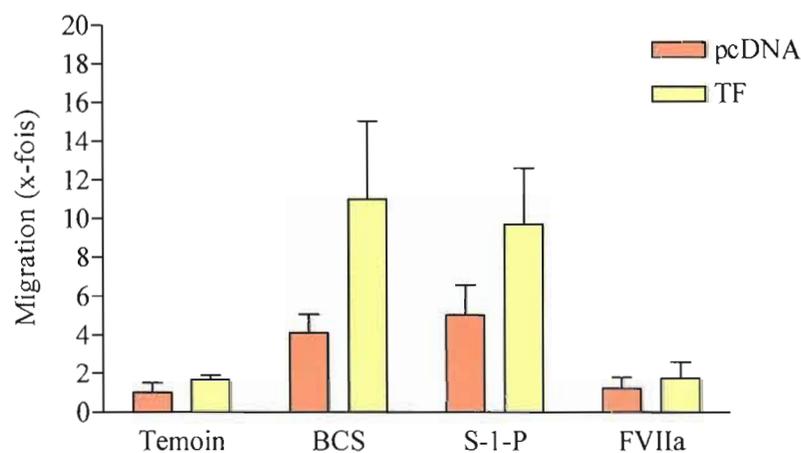


Figure 3.5: Le TF induit une élévation de la migration des cellules endothéliales

Les BAEC confluentes à 50 % ont été transfectées avec 0.5 μ g de pcDNA ou d'ADNc du TF. Après une période de récupération cellulaire de 40 heures, les cellules sont ensemencées dans des chambres de Boyden enduites de gélatine 0,15 % et déposées dans du milieu contenant 10 % de sérum bovin (BCS) (A). La migration a été reprise avec les chimio-attractants suivants: milieu sans sérum (témoin), 10 % de BCS, 1 μ M de sphingosine-1-phosphate (S-1-P) et 10 nM de facteur VII activé (FVIIa). La moyenne de trois expériences est représentée.

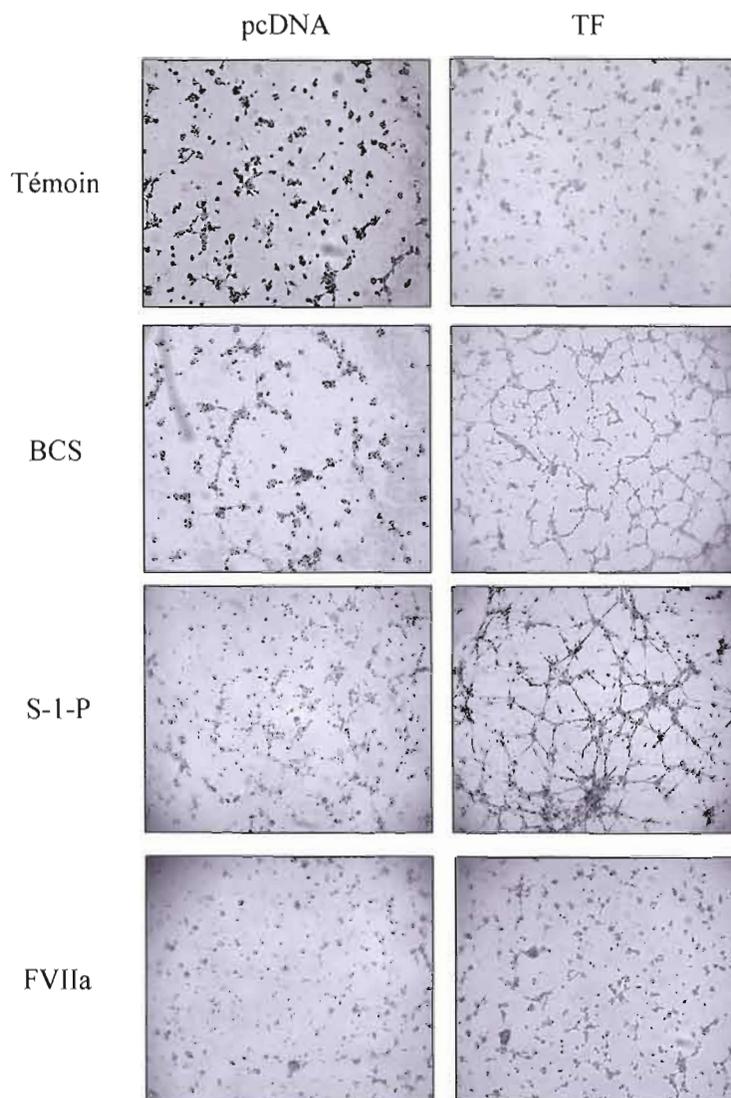


Figure 3.6: Le TF induit la différenciation morphologique des cellules endothéliales en structures de type capillaires

Les BAEC sont transfectées avec 0,5 μg de pcDNA ou d'ADNc du TF et 40 heures post-transfection elles sontensemencées sur une matrice de matrigelTM supplémentée avec du milieu sans sérum (témoin), 10 % de BCS, 1 μM de S-1-P et 10 nM de FVIIa. Une incubation à 37°C/5 % CO₂ pendant 6 à 8 heures permet la formation de structures de type capillaires qui sont ensuite photographiées à l'aide d'un microscope inversé (grossissement 50X). Représentation de trois expériences indépendantes.

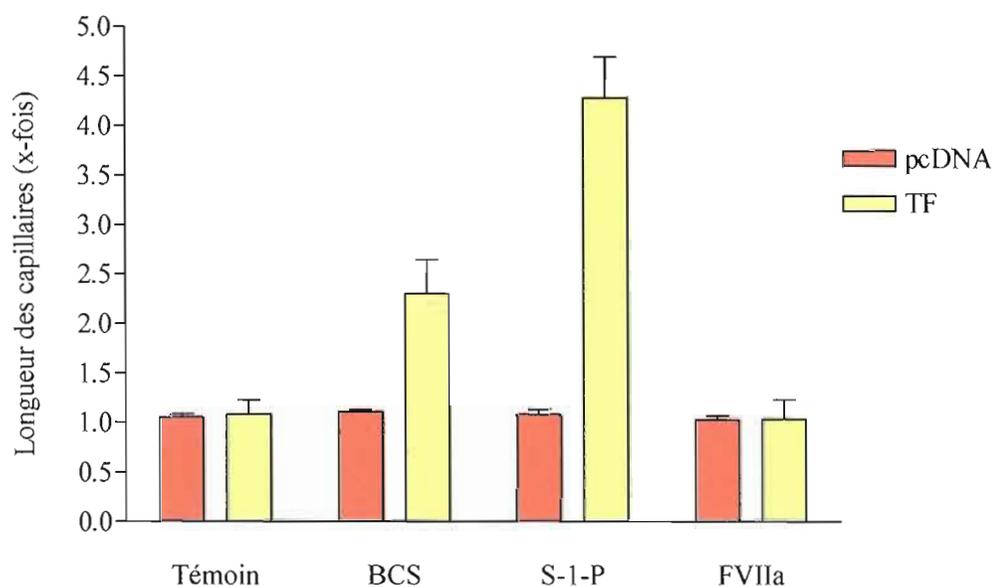


Figure 3.7: Quantification de l'effet du TF sur la différenciation morphologique des cellules endothéliales en structures de type capillaire

L'effet du TF sur la différenciation morphologique des cellules endothéliales en structures de type capillaire a été quantifié à l'aide du logiciel informatique, Northern Eclipse 4.0. Les structures de type capillaires obtenues après 6 à 8 heures qu'incubation, figure 3.6, ont été photographiées à l'aide d'un microscope inversé (grossissement 50X) et la longueur de chaque réseau a été calculé par le logiciel Northern Eclipse 4.0. La moyenne de trois expériences est représentée.

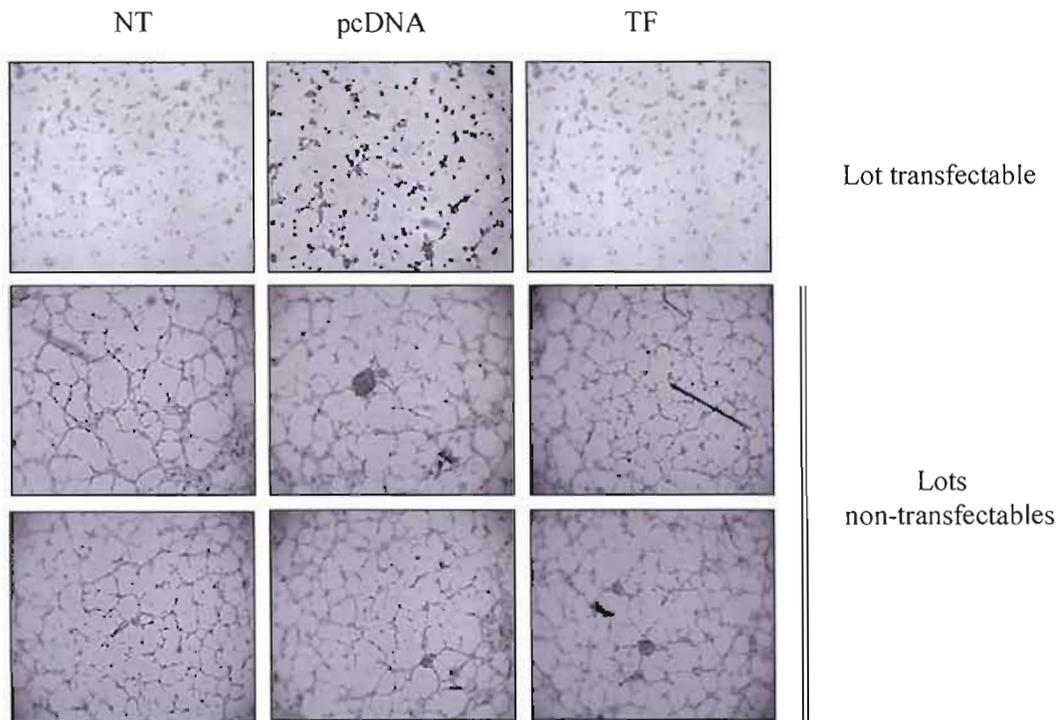


Figure 3.8 : Mise en évidence de la variabilité des lots de cellules endothéliales par l'intermédiaire de la formation spontanée de structures de type capillaire

Trois lots différents de BAEC ont été transfectées (ou non) avec 0,5 µg de pcDNA ou d'ADNc du TF. Quarante heures post-transfection, les cellules ont été ensemencées sur une matrice de matrigel™ supplémentée avec du milieu sans sérum suivi d'une incubation à 37°C/5 % CO₂ pendant 6 à 8 heures. Toutes les structures de types capillaires obtenues ont été photographiées à un grossissement de 50X. Les panneaux identifiés lot transfectable sont les même que ceux présenté à la figure 3.6. Les photos sont présentées à titre indicatif, elles n'ont pas été quantifiées. NT : Non transfecté. Les panneaux représentent trois expériences indépendantes.

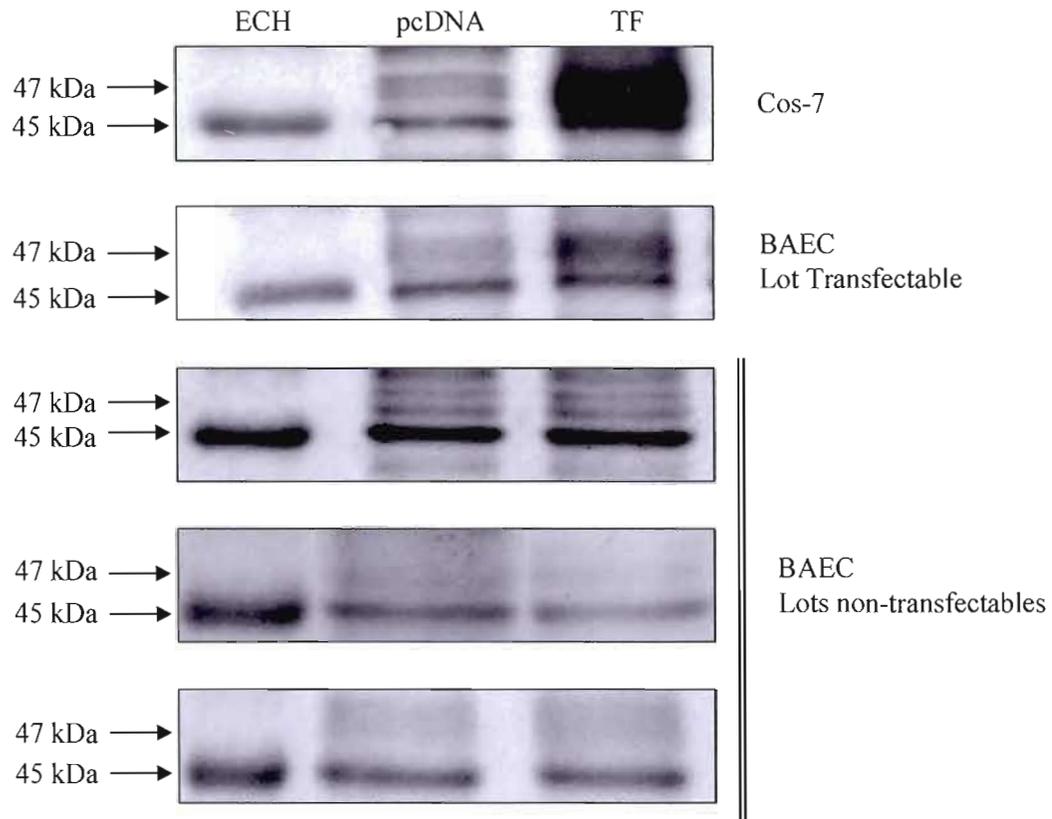


Figure 3.9: Évaluation de l'efficacité de transfection de différents lots de cellules endothéliales

Les BAEC et les Cos-7 sont transfectées avec 0,5 µg de pcDNA ou d'ADNc du TF. Quarante heures post-transfection, les cellules ont été lysées et les protéines totales dosées. Celles-ci ont été déposées à quantité égale (20 µg) et séparées sur un gel de SDS-PAGE contenant 9 % d'acrylamide. Un immuno-buvardage de type western a été effectué suivi d'une immuno-détection avec l'anticorps anti-TF dilué 1: 5000. ECH: Échelle de masse moléculaire. Chaque panneau est une représentation de trois expériences indépendantes.

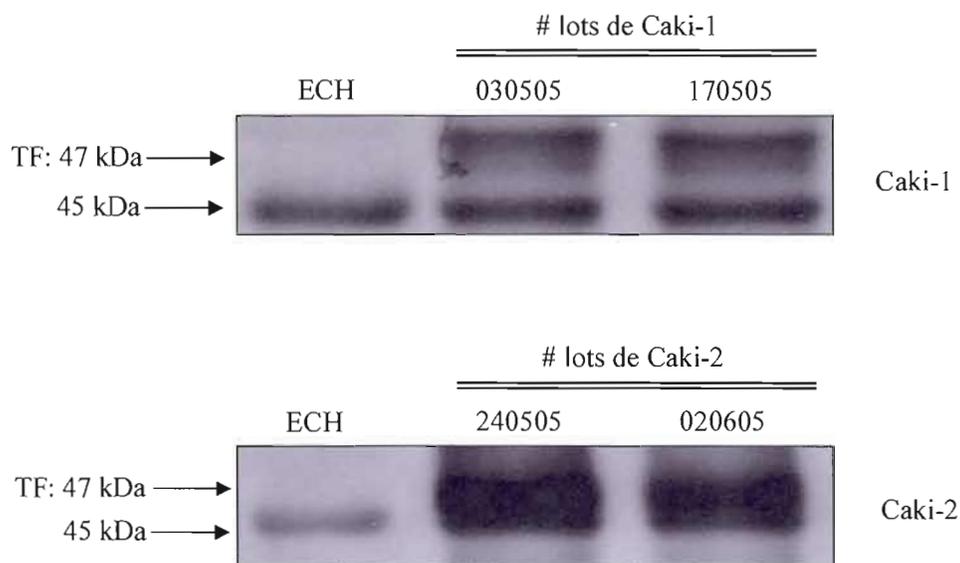


Figure 3.10: Immuno-détection du TF constitutif exprimé chez les cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal

Les Caki-1 (cellules métastatiques) et Caki-2 (non-métastatiques) sont amenées à 80 % de confluence avant d'être récoltées à l'aide d'un policeman. Les cellules sont ensuite lysées et les protéines totales sont dosées selon la méthode du microBCA. Celles-ci ont été déposées à quantité égale (20 μ g), et séparées sur un gel de SDS-PAGE. Un immuno-buvardage de type western a été effectué suivi d'une immuno-détection avec l'anticorps anti-TF (CL20150A) dilué 1: 5000. ECH: Échelle de masse moléculaire. Chaque panneau est une représentation de trois expériences indépendantes.

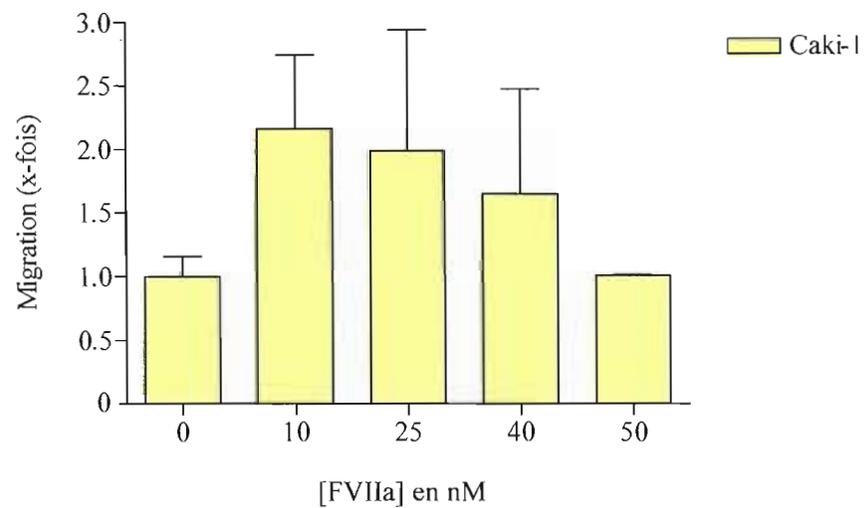


Figure 3. 11: La migration des cellules métastatiques de carcinome rénal est optimale à une faible concentration de FVIIa

Les Caki-1 sont menées à une confluence de 80% et sevrées pendant 24 heures. Elles sontensemencées dans des chambres de Boyden enduites de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fibronectine et trempées dans du milieu sans sérum contenant du FVIIa à des concentrations variant de 0 à 50 nM. La moyenne de trois expériences indépendantes est représentée.

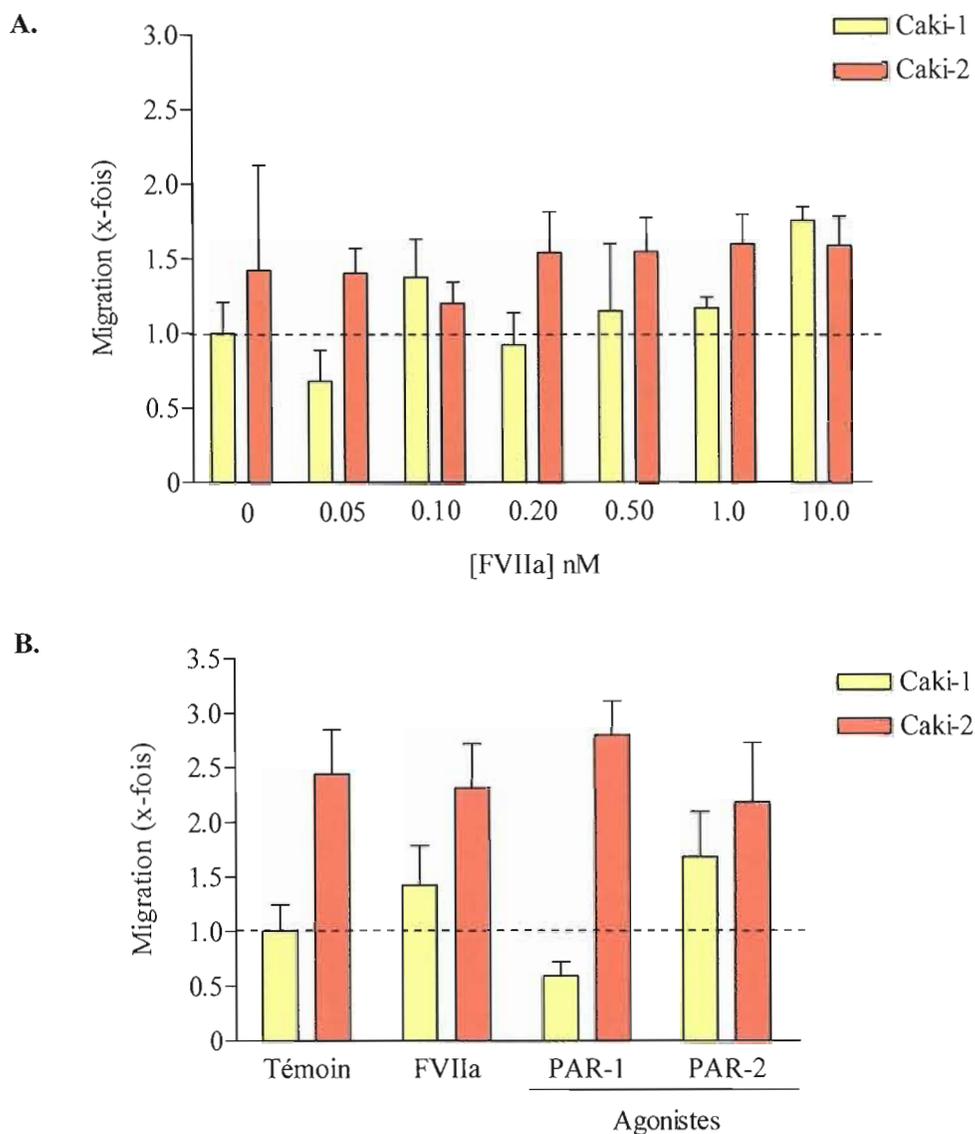


Figure 3.12: Une comparaison du comportement migratoire des cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal humain en présence de FVIIa et des agonistes de PAR

Les Caki-1 et les Caki-2 sont amenées à une confluence cellulaire de 80%, sevrées pendant 24 heures et ensemencées dans des chambres de migration enduites de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fibronectine. Celles-ci sont trempées dans un milieu dépourvu de sérum contenant des concentrations croissantes de FVIIa (A). Les chambres sont trempées dans du milieu sans sérum contenant ou non 10 nM de FVIIa ou 50 μM des agonistes de PAR-1 et de PAR-2 (B). Représentation de trois expériences indépendantes.

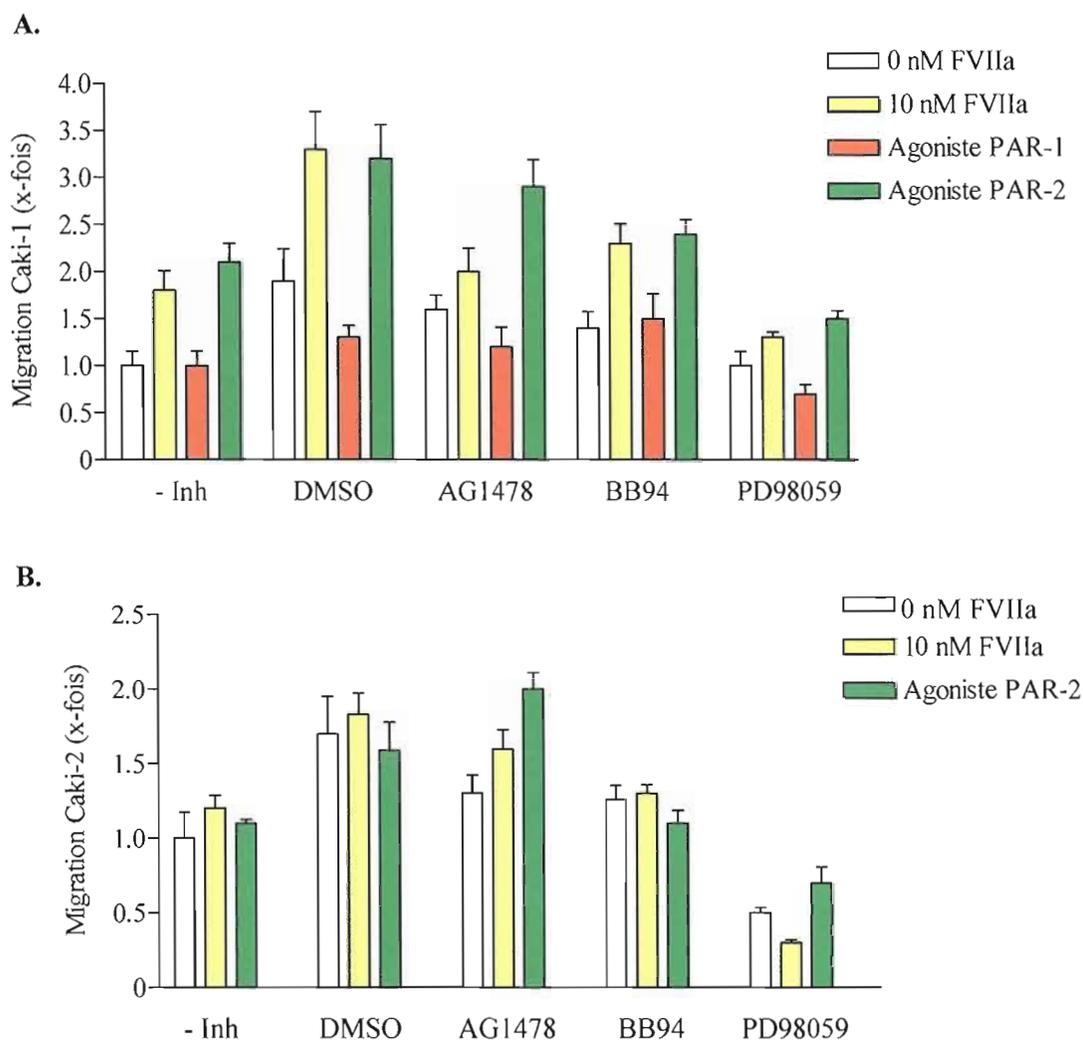


Figure 3.13: Effets des inhibiteurs du EGFR, des métalloprotéases et de la voie des MAP kinases sur la migration des cellules épithéliales métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal induite par le FVIIa et les agonistes de PAR

Les Caki-1 et Caki-2 sont amenées à une confluence cellulaire de 80 % afin de subir un séchage de 24 heures. Les cellules sont ensuite récoltées etensemencés dans les chambres de migration enduites de 20 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectine. Une fois les cellules adhérees au filtre, les inhibiteurs ainsi que leur solvant (DMSO) sont ajoutés dans les chambres de migration aux concentrations finales de 0.02% de DMSO et 1 μM de AG1478, de BB94 et de PD98059. Les chambres sont ensuite déposées dans les puits contenant ou non 10 nM de FVIIa ou 50 μM des agonistes de PAR-1 ou de PAR-2. La migration des Caki-1 est illustrée en (A) et celle des Caki-2 en (B). – Inh: sans inhibiteurs. Représentation de trois expériences indépendantes.

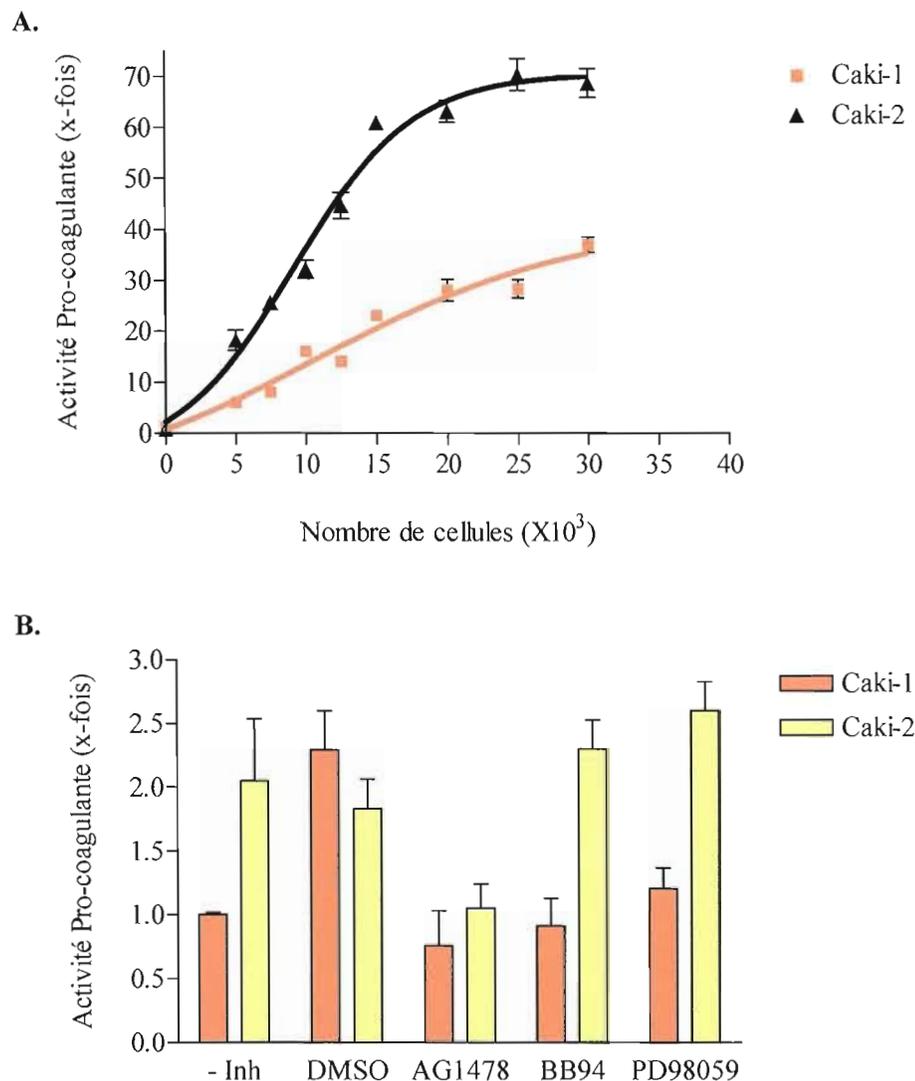


Figure 3.14: Une comparaison de l'activité pro-coagulante du TF exprimé des cellules épithéliales de carcinome rénal en présence ou non de différents inhibiteurs

Les cellules sont amenées à confluence et sevrées pendant 24 heures. Une quantité croissante de cellules est déposée dans une microplaque en présence de 10 nM de FVIIa, 1 μ M de facteur X et 500 μ M de Chromozyme X. Ce dernier démarre la réaction cinétique qui est suivie pendant une heure à 405 nm (A). Suite à un sevrage de 24 heures, les cellules subissent ou non un traitement pendant une heure en présence de différents inhibiteurs et de leur solvant (DMSO) à des concentrations finales de 0,02% de DMSO, 1 μ M d'AG1478, de BB94 et de PD98059. L'essai a été effectué avec 15 000 cellules tel que décrit plus haut (B). - Inh : Sans Inhibiteurs. Représentation moyenne de trois expériences.

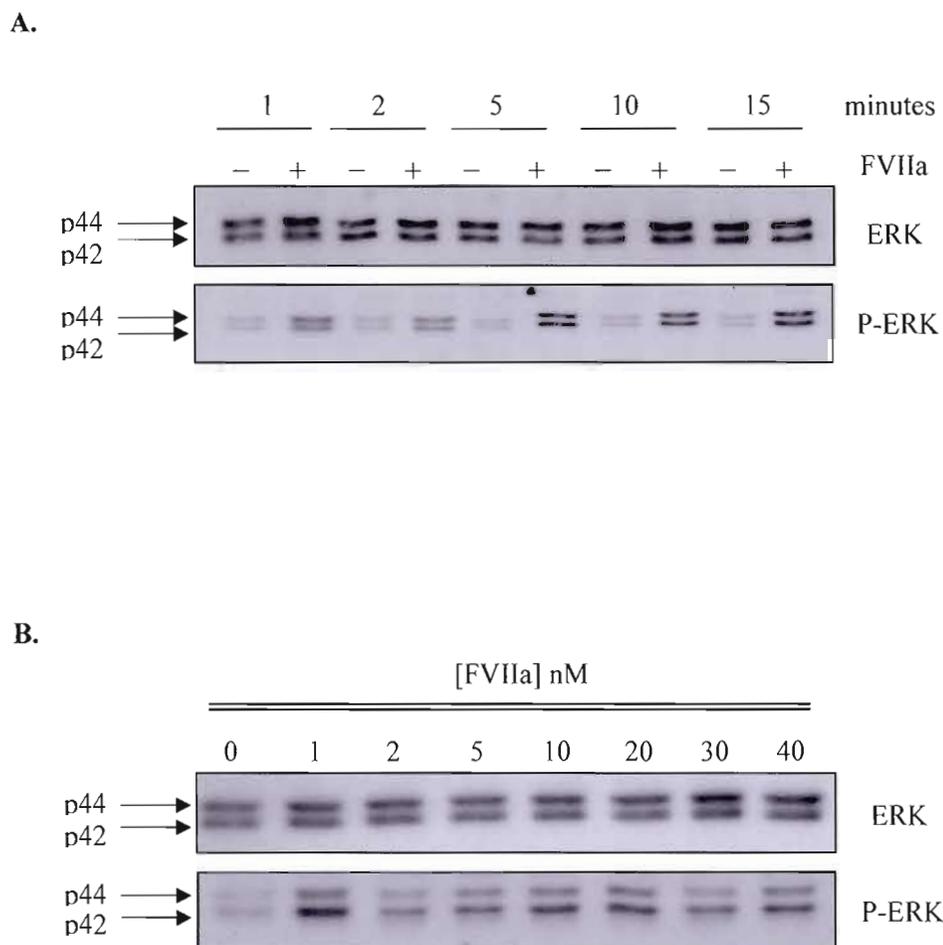


Figure 3.15: Le FVIIa active la voie des MAP kinases chez les cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal

Les cellules sont sevrées pendant 24 heures suivi d'une cinétique de stimulation avec 10 nM de FVIIa (A) Les Caki-1 sont stimulées pendant 5 minutes en présence d'une concentration de FVIIa variant de 0 à 40 nM (B). Les cellules ont été lysées, le protéines dosées et déposées à quantité égale (10 µg) sur gels SDS-PAGE, 9% d'acrylamide. Un immuno-buvardage de type western suivi d'une immuno-détection avec les anticorps anti-ERK et anti-phospho-ERK dilués 1: 10 000 et 1: 5000 a été effectuée. Représentation de quatre expériences indépendantes.

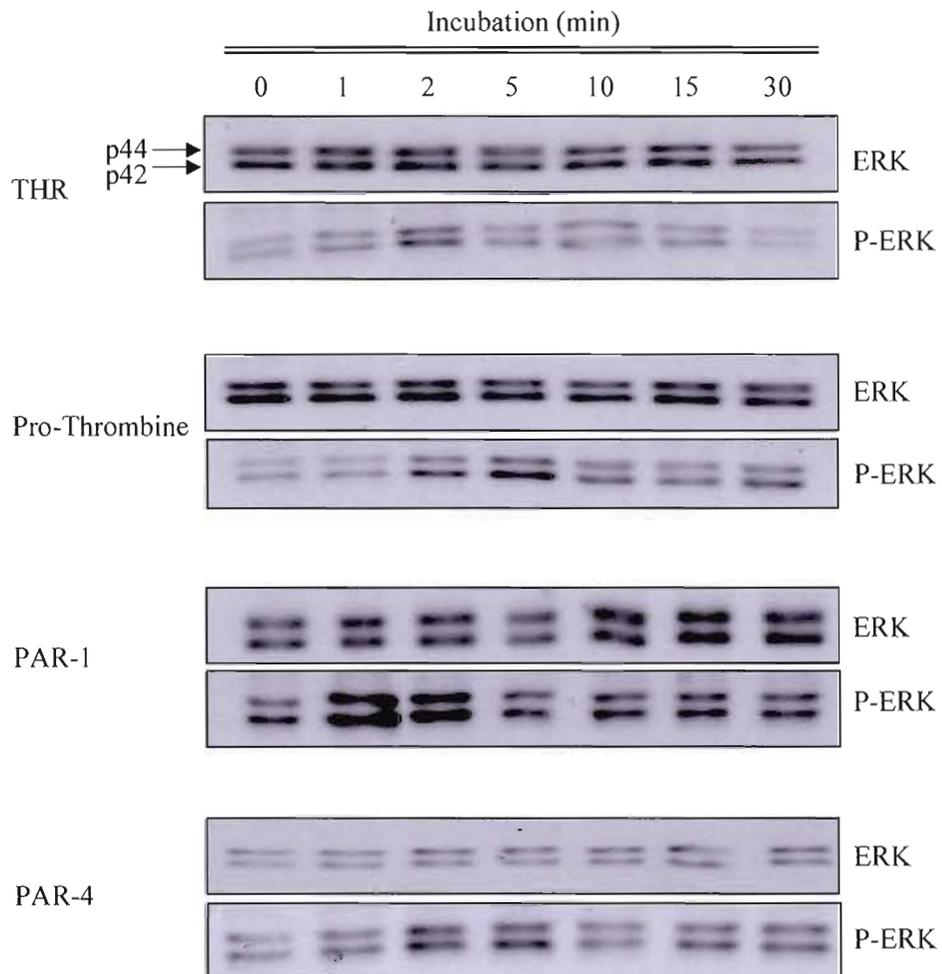


Figure 3.16: Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal par la thrombine, la pro-thrombine et les agonistes de PAR-1 et de PAR-4

Les Caki-1 sont sevrées pendant 24 heures et subissent un cinétique de stimulation avec 0,5 U de thrombine (THR), et 5×10^{-3} U de pro-thrombine et 50 μM d'agonistes de PAR-1 et de PAR-4. Les cellules sont lysées, les protéines dosées et déposées à quantité égale (10 μg) sur gel SDS-PAGE, 9 % d'acrylamide. L'immuno-buvardage de type western est suivi d'une immuno-détection avec les anticorps anti-ERK et anti-phospho-ERK dilués 1: 10 000 et 1: 5000. Représentation de trois expériences indépendantes.

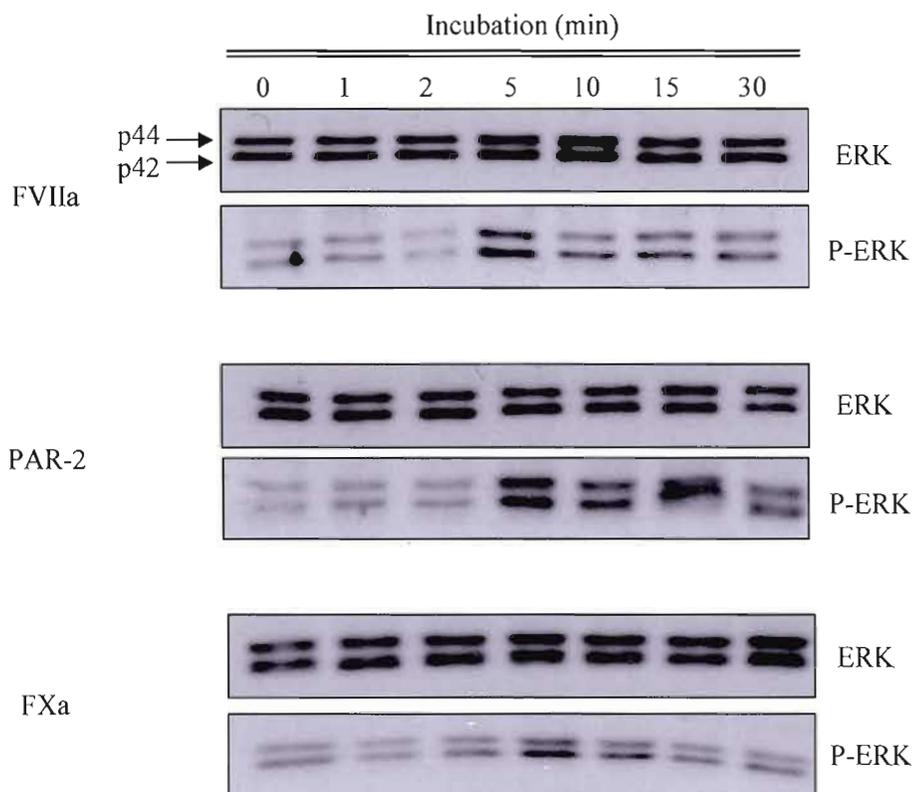


Figure 3.17: Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules métastatiques de carcinome rénal au FVIIa, FXa et à l'agoniste de PAR-2

Les Caki-1 sont sevrées pendant 24 heures avant de subir une cinétique de stimulation avec 1 nM de FVIIa, 20 nM de FXa et 50 μ M d'agoniste de PAR-2. Les cellules sont lysées, les protéines sont dosées et déposées à quantité égale (10 μ g) sur un gel de SDS-PAGE, 9% acrylamide. Un immuno-buvardage de type western et une immuno-détection sont effectués en utilisant les anti-corps anti-ERK et anti-phospho-ERK dilués 1: 10 000 et 1: 5000. Représentation de trois expériences indépendantes.

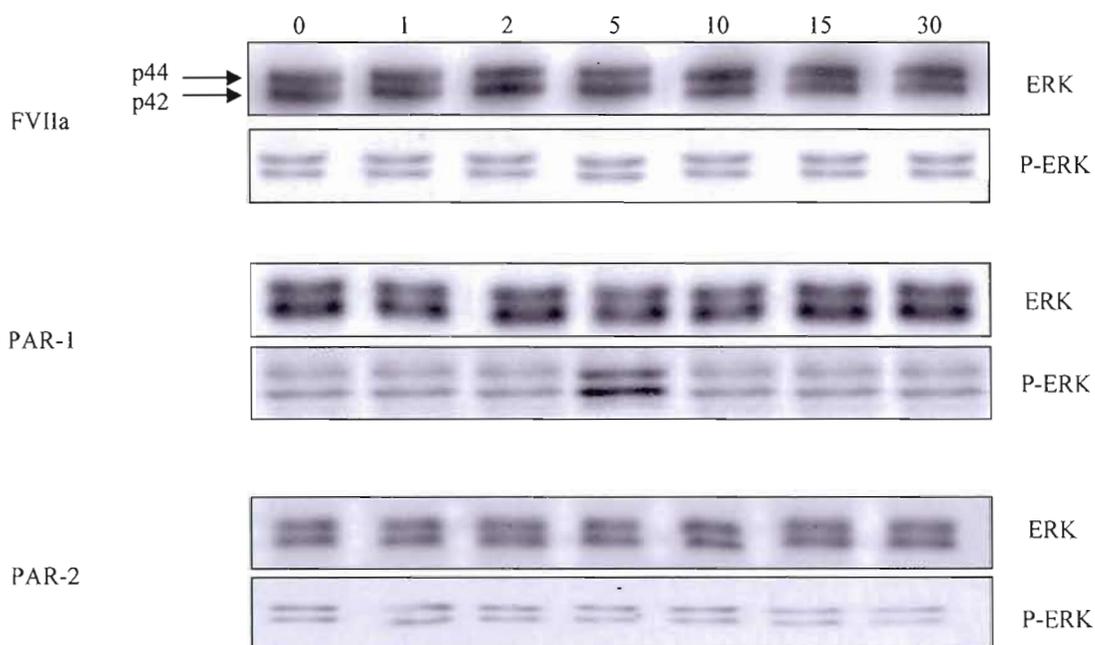


Figure 3.18: Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules non- métastatiques de carcinome rénal au FVIIa et aux agonistes de PAR-1 et de PAR-2

Les Caki-2 sont sevrées pendant 24 heures avant de subir une cinétique de stimulation en présence de 1 nM de FVIIa et 50 μ M d'agoniste de PAR-1 et PAR-2. Les cellules sont lysées, les protéines sont dosées et déposées à quantité égale (10 μ g) sur gel SDS-PAGE 9 % acrylamide. Un immunobuvardage de type western et une immuno-détection sont effectués en utilisant les anti-corps anti-ERK et anti-phospho-ERK dilués 1: 10 000 et 1: 5000. Représentation de trois expériences indépendantes.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les tumeurs sont souvent comparées aux plaies qui ne guérissent pas. En effet, certaines similitudes permettent le rapprochement entre l'angiogenèse tumorale et la cicatrisation d'un tissu normal (Dvorak, 1986). Dans les deux cas, les mécanismes de coagulation permettent la synthèse d'une matrice de fibrine qui, durant la revascularisation, sert de support pour la migration des cellules endothéliales (Nash, Walsh et Kakkar, 2001). En conditions physiologiques, le tissu regagne une normoxie et la matrice de fibrine est dégradée par fibrinolyse. Tandis qu'en conditions tumorales, l'hyperperméabilité particulière des vaisseaux et le taux de prolifération élevé des néoplasmes ne permettent pas l'atteinte de la normoxie (Brown et Giaccia, 1998). Il y a alors répétition de plusieurs cycles de coagulation/fibrinolyse facilitant le dépôt de fibrine dans les sites intra et extravasculaires de la tumeur (Denko et Giaccia, 2001). Ce phénotype pro-coagulant caractérise plusieurs types de cancer dont le carcinome de cellules rénales (Wojtukiewicz et al., 1990; Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986) qui représente la troisième plus grande forme de cancer urologique qui apparaît chez l'homme (Heidenreich, Schrader et Varga, 2003). Le facteur tissulaire (TF) est le maillon qui relie la coagulation et l'angiogenèse. D'une part, il initie la cascade de coagulation lorsqu'il y a atteinte de l'intégrité vasculaire en liant le facteur VII (FVII) son ligand naturel qui est uniquement compartimenté dans le sang (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003). D'autre part, il participe à l'angiogenèse en activant les voies de signalisation qui régulent la synthèse du VEGF et de son récepteur, des enzymes protéolytiques dont les métalloprotéases (MMP), ainsi que la prolifération et la morphologie cellulaire (Carmeliet, 2003). Sa surexpression au niveau des tumeurs et de

leurs vaisseaux sanguins est corrélée avec un pronostic défavorable associé aux développements de métastases et aux désordres thrombotiques (Contrino et al., 1996).

Cette étude a permis d'illustrer que la surexpression du TF chez les cellules endothéliales induit un phénotype pro-angiogénique seulement en présence d'une solution sérique (BCS) et de la sphingosine-1-phosphate (S-1-P). À l'inverse, la présence unique du FVII activé (FVIIa) n'a pas influencé la migration cellulaire ni la formation de structures de type capillaire. Chez les cellules épithéliales de carcinome rénal, la migration des cellules métastatiques (Caki-1) est stimulée par la formation du complexe TF/FVIIa ainsi que par la présence de l'agoniste peptidique de PAR-2 tandis que chez les cellules non-métastatiques (Caki-2), ces mêmes composés n'induisent aucune élévation du potentiel migratoire. La migration des Caki-1 induite par le FVIIa est diminuée en présence des inhibiteurs du récepteur du facteur de croissance épidermal (EGF-R) ainsi qu'en présence des inhibiteurs des MMP et de la voie des MAP kinases. Quant à la migration des Caki-2, celle-ci est plutôt sensible à la présence de l'inhibiteur de la voie des MAP kinases. Finalement, une immunodétection de la protéine *extracellular signal regulated kinase* (ERK) chez les Caki-1 et les Caki-2 stimulées par le FVIIa et les agonistes de PAR-1 et 2 a permis de mettre en évidence certaines différences au niveau de la rapidité et de la spécificité de la signalisation cellulaire.

4.1 Le TF induit un phénotype pro-angiogénique des cellules endothéliales

4.1.1 Le TF induit une élévation du potentiel de migration

L'activation des cellules quiescentes s'effectue lorsqu'une tumeur hypoxique déverse dans son milieu environnant de nombreux agents angiogéniques tels que le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le facteur de croissance épidermal (EGF), l'interleukine-8 (IL-8), le facteur de croissance dérivant des plaquettes activées (PDGF) ainsi que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Folkman, 2003). La synthèse de ce dernier est régulée à la hausse lorsque la tumeur exprime de manière aberrante le TF en comparaison à sa contrepartie non-maligne (Zhang et al., 1994). La diffusion du VEGF à

travers la matrice extracellulaire (MEC) permet non seulement la prolifération et la migration des cellules mais aussi la surexpression endothéliale du TF (Fernandez, Patierno et Rickles, 2004).

L'activation des cellules endothéliales quiescentes peut alors être effectuée par plusieurs facteurs permettant l'induction d'un meilleur phénotype angiogénique. Cette synergie angiogénique a déjà été observée *in vitro* ainsi que *in vivo* en présence du VEGF et du FGF (Pepper et al., 1992, 2001). Cette observation confirme alors que la migration cellulaire *in vitro* peut résulter de la combinaison de plusieurs stimulations et/ou de l'expression de certaines protéines (Pepper et al., 1992).

Les cellules endothéliales de l'aorte bovine (BAEC) ont été utilisées lors de cette étude étant donnée qu'elles n'expriment pas le TF à un état quiescent (Nawroth, 1985). La surexpression de cette protéine a été assurée en employant la méthode de transfection au FuGENE 6. Les résultats obtenus illustrent que la migration induite par le TF est optimale en présence d'une solution sérique de 10 % (BCS) et de la S-1-P mais pas en présence du FVIIa qui est le ligand naturel du TF. Ces résultats sont à l'écart de ceux qui ont été rapportés pour deux lignées exprimant constitutivement le TF, les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales issues de tumeurs du sein (MDA-MB-231), où la formation du complexe pro-coagulant TF/FVIIa est suffisant pour stimuler la migration cellulaire (Hjortoe et al., 2004; Sato et al., 1997). L'absence de la migration endothéliale en présence du FVIIa indique alors que la formation du complexe pro-coagulant TF/FVIIa ne suffit pas pour induire un phénotype pro-angiogénique. Un résultat similaire a été observé chez les cellules Adr-MCF-7 qui sont également des cellules épithéliales issues de tumeur de sein exprimant constitutivement le TF. En effet, la migration de ces cellules n'a pas été stimulée par le FVIIa car la présence simultanée du FVIIa et du facteur X (FX) était nécessaire (Jiang et al., 2004). Il est alors probable que la migration des cellules endothéliales surexprimant le TF nécessite aussi la présence simultanée du FVIIa et du FX.

La migration endothéliale qui est observée en présence de la S-1-P et du BCS est davantage stimulée lorsque les cellules surexpriment le TF. La S-1-P est un lysophospholipide qui est relargué par les plaquettes activées lors de la coagulation sanguine. Ce composant est un puissant chimio-attractant permettant d'induire une forte élévation de la migration cellulaire. Celui-ci est également contenu dans le sérum où il participe aussi à la hausse du potentiel migratoire en combinaison avec les autres facteurs de croissance qui sont présents dans la solution sérique (English et al., 2000). Les effets du BCS et de S-1-P sur la migration des cellules endothéliales transfectées avec le vecteur d'expression (pcDNA) ont été observés mais la migration de leur contre partie surexprimant le TF a été davantage notée. Ce résultat illustre qu'une combinaison de l'effet du chimio-attractant et de la surexpression du TF permet l'induction de la migration endothéliale. Il est à noter qu'un phénomène similaire a été observé lors de l'étude de l'effet de la surexpression de la métalloprotéase matricielle de type-1 (MT1-MMP) sur la migration des BAEC (Langlois, Gingras et Béliveau, 2004).

Ces résultats sont les parmi les premiers à indiquer que la migration des cellules endothéliales surexprimant le TF s'effectue en absence de FVIIa et donc selon des mécanismes indépendants de l'hémostase (Fernandez et Rickles, 2002; Rosen et al., 1997). Le TF est un récepteur transmembranaire qui possède trois sites de phosphorylation au niveau cytosolique dont deux, Ser²⁵³ et Ser²⁵⁸, qui peuvent participer à la signalisation intracellulaire. La phosphorylation de ces résidus est normalement effectuée une fois que le FVIIa se lie à l'ectodomaine du TF. Cependant, une phosphorylation est également possible même en absence de FVIIa et ceci via l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Rickles, Patieno et Fernandez, 2003).

L'activation de la PKC est possible via la signalisation induite par la S-1-P suite à sa liaison aux récepteurs de la famille *endothelial differentiation gene* (EDG-1) exprimés à la surface endothéliale (Mehta et al., 2005). Par conséquent, une augmentation de la concentration cytosolique des ions calciques (Ca²⁺) est observée permettant d'activer la PKC. Celle-ci acquiert alors la capacité d'induire la phosphorylation des résidus de tyrosine/sérine

des protéines cytosoliques dont les résidus contenus dans la queue cytoplasmique du TF (Mehta et al., 2005; Wang et al., 1999). Une fois phosphorylée, la portion cytoplasmique du TF peut s'associer à la portion carboxylique de la *actin binding protein-280* (ABP-280) afin d'induire son activation. Cette dernière utilise sa portion N-terminale afin d'interagir avec les filaments d'actine provoquant leur réorganisation ainsi que l'altération du cytosquelette (Ott et al., 1998; Rickles, Patierno et Fernandez, 2002). De plus, il a été démontré que l'interaction du TF avec la ABP-280 induit l'activation de la voie des MAP kinases ainsi que la phosphorylation des *focal adhesion kinases* (FAK) stimulant les processus de migration et d'adhésion cellulaire (Ott et al., 1998; Rickles, Patierno et Fernandez, 2003).

L'implication du TF dans l'embryogenèse a été illustrée en évaluant la survie *in utéro* des embryons murin qui n'expriment pas le TF (TF *-/-*). Ces embryons meurent *in utéro* vers le dixième jour du développement embryonnaire à cause d'un défaut de vascularisation, indiquant alors que le rôle du TF ne se limite pas à l'initiation de la coagulation (Bugge et al., 1996; Carmeliet et al., 1996; Toomey et al., 1996). De plus, les effets du FVIIa dans la néo-vascularisation embryonnaire ont été évalués à l'aide des embryons FVIIa *-/-*. Les résultats de cette étude soulignent la survie des embryons indiquant alors que la formation du complexe TF/FVIIa n'est pas absolument nécessaire lors de la réorganisation des cellules endothéliales en nids vasculaires. Ceci indique alors que le TF peut contribuer au développement vasculaire indépendamment de la présence du FVIIa en activant la signalisation qui médie la migration et l'adhésion cellulaire (Rosen et al., 1997).

La probabilité de phosphorylation du TF par les protéines kinases couplées au récepteurs extracellulaires augmente considérablement lorsque les cellules sont en présence de sérum. La panoplie de facteurs de croissance dont la S-1-P, la trypsine, le VEGF, le FGF et le EGF (Langlois, Gingras et Béliveau, 2004), ainsi que la présence de tous les facteurs de coagulation dont les facteurs II, V, VII, VIII, IX et X (Hoffman, 2003), favorisent la migration des cellules endothéliales en activant différentes voies de signalisation qui dépendent ou non de l'hémostase (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003). En effet, une étude démontre que la formation du complexe TF/FVIIa/FXa à la surface cellulaire permet

l'activation de PAR-2, suivi de la phosphorylation marquée de la portion cytoplasmique du TF (Ahamed et Ruf, 2004). Il a été également illustré que la portion cytoplasmique du TF régule l'angiogenèse tumorale et que sa phosphorylation permet de lever l'inactivation du récepteur PAR-2 qui induit une signalisation intracellulaire pro-angiogénique (Belting et al., 2004). Finalement, il faut tenir en considération que toute induction du potentiel de migration effectuée en présence de BCS peut être provoquée par la présence individuelle des différents facteurs de croissance et de coagulation ou par la combinaison de leurs effets respectifs.

À la lueur de ces résultats, il est probable que la présence unique du FVIIa n'induit pas une phosphorylation significative du TF, ceci est reflété par l'absence de l'induction de la migration effectuée en absence de sérum. Par contre, le FVII contenu dans le sérum en combinaison avec les autres facteurs de coagulation et de croissance provoque une induction de la migration cellulaire. La formation du complexe TF/FVIIa/FXa active la pro-thrombine en thrombine qui lie les récepteurs PAR-1 des cellules endothéliales, permettant l'induction de la migration (Kataoka et al., 2003). La migration cellulaire peut également être induite par la trans-activation des récepteurs PAR-2 suite à la formation du complexe TF/FVIIa (Hjortoe et al., 2004; Sato et al., 1997) ou du complexe TF/FVIIa/FXa (Jiang et al. 2004). Il est à noter que les récepteurs PAR-2 ne sont pas activés par l'action protéolytique de la thrombine mais plutôt par l'action de la trypsine contenue dans la solution sérique de BCS (Camerer, Huang et Coughlin, 2000).

Malgré la multitude de facteurs de croissance et de la présence des facteurs de coagulation, le sérum possède également une panoplie d'inhibiteurs dont le *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) ainsi que l'anti-thrombine (English et al., 2000). Le premier est l'inhibiteur spécifique des complexes TF/FVIIa et TF/FVIIa/FXa tandis que le deuxième s'associe avec la thrombine activée afin d'induire son inhibition. La présence de ces inhibiteurs permet de réguler l'activation et l'amplification de la cascade de coagulation ainsi que des mécanismes d'angiogenèse qui sont dépendants de l'hémostase (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003). La présence de ces inhibiteurs explique la similitude entre la migration

endothéliale obtenue avec une solution homogène de S-1-P et une solution hétérogène de sérum.

Pour récapituler, l'induction du potentiel migratoire des cellules endothéliales surexprimant le TF est vraisemblablement due à la combinaison entre la signalisation exécutée par chimio-attractant ainsi que celle induite par la portion cytosolique du TF qui est nouvellement phosphorylée.

4.1.2 Le TF induit la formation de structures de type capillaire

La surexpression du TF a déjà été mise en valeur *in situ* sur l'endothélium vascularisant les cellules cancéreuses du sein (Contrino et al., 1996). Dans un tel contexte, le TF entre en contact avec le FVII, le FX, la pro-thrombine ainsi que tous les autres facteurs de coagulation induisant la synthèse d'une matrice de fibrine dans le stroma tumoral ainsi qu'à proximité de l'endothélium vasculaire (Contrino et al., 1996). Les résultats de cette étude illustrent plutôt que la surexpression du TF induit la réorganisation des cellules endothéliales en structures de type capillaire en présence de la S-1-P et du BCS mais pas en présence du FVIIa.

La réorganisation des cellules endothéliales en structures de type capillaire dépend de deux processus: l'altération des liaisons intégrines-ligands entre les cellules et la MEC ainsi que la migration cellulaire qui est un processus permettant le rapprochement des cellules afin qu'elles établissent un réseau apparenté aux capillaires sanguins. L'importance de ces processus a été préalablement soulignée en évaluant les effets de l'intégrine cadhérine 5 ainsi que du *cluster of designation* (CD) 31 sur la réorganisation des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) en structures de type capillaire (Matsumura, Wolff et Petzelbauer, 1997). En effet, l'inhibition simultanée de ces molécules entrave le rapprochement et le contact inter-cellulaire empêchant alors la formation de structures de type capillaires *in vitro* et *in vivo*. De plus, la neutralisation de ces molécules a également induit l'inhibition de la réorganisation de l'actine filamenteuse retrouvée au niveau du

cytosquelette permettant de conclure que la formation de structures apparentées aux capillaires dépend des interactions du CD 31 et de la cadhérine 5 avec l'active filamenteuse du cytosquelette (Matsumura, Wolff et Petzelbauer, 1997).

Il a été récemment démontré que le domaine 5G9 de la portion extracellulaire du TF interagit avec les intégrines qui possèdent une sous-unité β_1 . Plus spécifiquement, le TF peut adhérer aux surfaces cellulaires qui expriment les intégrines de la famille $\alpha_v\beta_3$ ou qui possèdent une sous-unité β_1 ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$). Il a également été rapporté que cette interaction TF/intégrine est abolie lorsque les cellules sont en présence des anticorps dirigés vers les intégrines (Dorfleutner et al., 2004). Cette étude a pu mettre en évidence qu'une surexpression du TF induit l'inhibition de la migration des cellules exprimant les intégrines $\alpha_3\beta_1$. Il a été également observé que cette régulation négative est levée seulement suite à la phosphorylation des résidus cytoplasmiques du TF qui peut être effectuée directement par sa liaison au FVIIa ou par la formation du complexe TF/FVIIa suivi de l'activation des récepteurs PAR-2 (Belting et al., 2004; Dorfleutner et al., 2004). Ces observations ont alors souligné un rôle supplémentaire du TF qui permet de le dissocier davantage de l'initiation de la cascade de coagulation.

Une autre étude démontre que les effets de la S-1-P sur la migration des cellules endothéliales nécessite l'expression des récepteurs EDG-1 et 3 ainsi que l'activation des intégrines de la famille $\alpha_v\beta_3$ ou qui possèdent une sous-unité β_1 (Paik et al., 2001). Cette étude souligne que la S-1-P induit une signalisation intracellulaire qui permet l'activation des protéines G monomériques, Rho A et Rac, qui activent les intégrines de type $\alpha_v\beta_3$ stimulant alors la migration cellulaire. L'ajout d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces intégrines abolit complètement la migration cellulaire (Paik et al., 2001). Une autre étude complémentaire illustre que la liaison de la S-1-P à son récepteur EDG-1 induit l'activation de la protéine G_i provoquant une élévation de la concentration cytosolique des ions Ca^{2+} qui favorise la formation de jonctions d'adhésion intercellulaire via un mécanisme Rac dépendant (Mehta et al., 2005).

Pour récapituler, les résultats de cette étude indiquent que la surexpression endothéliale du TF en combinaison à la présence de la S-1-P et du BCS permettent la différenciation morphologique des cellules endothéliales en structures apparentées aux capillaires sanguins. Tel que mentionné plus haut, la S-1-P induit une signalisation intracellulaire qui élève la concentration cytosolique des ions Ca^{2+} permettant alors d'activer la PKC, celle-ci peut maintenant phosphoryler les résidus de sérine/thréonine retrouvés chez les protéines intracellulaires dont les résidus cytosoliques du TF. De plus, cette signalisation peut induire l'activation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ ainsi que la formation des jonctions d'adhésion. Ces processus sont impliqués dans la migration ainsi que dans la réorganisation endothéliale en structures apparentées aux capillaires sanguins (Mehta et al., 2005; Paik et al., 2004). De plus, il a été démontré que le TF, possédant une portion cytosolique phosphorylée, peut interagir avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ exprimées chez les cellules permettant la migration cellulaire ainsi que l'établissement des interactions inter-cellulaires. La phosphorylation du TF est essentielle pour l'interaction avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sinon la migration est inhibée (Dorfleutner et al., 2004). Toutes ces observations corrént alors avec les résultats de cette étude qui indiquent que la S-1-P possède la plus grande capacité à induire la réorganisation des cellules endothéliales en structures capillaires *in vitro*.

Le sérum permet également aux cellules surexprimant le TF a se réorganiser en structures apparentées aux capillaires. Malgré la présence de tous les facteurs de coagulation ainsi que des différents agents angiogéniques, le taux d'induction obtenue avec le BCS est inférieur à celui obtenu avec la solution homogène de la S-1-P. Ceci indique que la solution hétérogène de BCS possède également des inhibiteurs tels que le TFPI qui inhibe le complexe TF/FVIIa/FXa. Ce dernier a la capacité d'induire un phénotype angiogénique selon un mécanisme hémotase dépendant c'est-à-dire en assurant le clivage de la pro-thrombine en thrombine active qui pourra ensuite activer les récepteurs PAR-1 et PAR-4 exprimés à la surface endothéliale (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003). L'acquisition d'un phénotype pro-angiogénique selon une manière hémotase indépendante et ceci via la phosphorylation de la queue cytoplasmique du TF suite à l'activation des récepteurs EDG-1 et EDG-3 par la S-1-P (Mehta et al., 2005; Wang et al., 1999). Étant donnée la complexité du mélange du BCS, il est difficile de déterminer avec certitude les différentes voies de signalisation qui sont

activées par tous les facteurs présents. La réorganisation des cellules en structures capillaires est alors le résultat de la combinaison de la surexpression du TF ainsi que la présence de la panoplie de facteurs de croissance et de coagulation qui induisent la signalisation régulant la migration et la formation de jonctions d'adhésion (English et al, 2000; Mehta et al., 2005; Rickles, Patierno et Fernandez, 2003).

Quant à lui, la présence unique du FVIIa n'influence la réorganisation des cellules endothéliales en structures capillaires *in vitro*. Ceci indique que la formation du complexe TF/FVII ne suffit pas pour induire la réorganisation des cellules en structures capillaires. Ceci peut être interpréter de deux manières soit que la liaison du FVIIa au TF n'induit pas la phosphorylation de ces résidus de sérine soit que la phosphorylation de la queue cytoplasmique s'effectue suite à l'activation de PAR-2 par le complexe TF/FVIIa/FXa. Le deuxième scénario est plausible étant donné l'absence du FX et de la formation de structures de type capillaire lors de l'essai *in vitro*.

4.1.3 Limitations des méthodes employées lors de l'étude du phénotype angiogénique

Les cellules endothéliales de l'aorte bovine (BAEC) ont été utilisées lors de cette étude pour deux raisons principales: ces cellules ne possèdent pas un phénotype pro-thrombotique et donc n'expriment pas le TF à un état quiescent et parce que ces cellules ne forment pas spontanément des structures des types capillaire lorsque ensemencées sur une matrice de matrigel™ (Nawroth et al., 1985). Cette dernière caractéristique a été exploitée car il s'agissait d'une manière simple, rapide et visuelle permettant de déterminer si les lots de BAEC maintenaient leur phénotype suite à la transfection et à l'étape de récupération cellulaire.

La surexpression du TF à la surface des cellules endothéliales a été possible suite à la transfection de l'ADNc du TF humain. Toutes les transfusions ont été vérifiées par immuno-détection et la fonctionnalité de la protéine surexprimée a été évaluée par un test d'activité

pro-coagulante qui est basé sur la capacité du TF a reconnaître et a lier son ligand naturel le FVIIa (Dietzen, Page et Tetzloff, 2004).

Certaines limitations ont par contre été rencontrées lors de la surexpression de la protéine. Certains lots de BAEC n'étaient pas transfectables car l'immuno-détection ne permettait pas la mise en évidence d'une protéine de 47 kDa. Le même problème a été rencontré chez plusieurs lots de cellules. Afin de vérifier l'intégrité de l'ADNc utilisé lors de ces essais, ce dernier a été transfecté chez les cellules épithéliales de rein de singe (Cos-7) suivi d'une immuno-détection qui a permis de mettre en valeur la présence d'une protéine de 47 kDa. De plus, le dosage de l'activité pro-coagulante a illustré que le TF surexprimé par transfection reconnaît son ligand le FVIIa et le complexe TF/FVIIa formé possède une activité protéolytique qui assure l'activation du FX en FXa qui a son tour clive le composé chromogénique afin de générer un composé colorimétrique (para-nitro-aniline ou pNA) qui absorbe fortement à 405 nm.

Étant donné les difficultés rencontrées plusieurs mesures ont été prises afin de vérifier l'intégrité de l'ADNc du TF ainsi que celui des BAEC. Premièrement tous les nouvelles préparations d'ADNc du TF ont été analysées par digestions enzymatiques en présence du BstX I et du BamH I/EcoR I afin de vérifier que le vecteur d'expression contient encore l'ADNc du TF et que celui-ci se retrouve toujours dans la bonne orientation. Deuxièmement, les BAEC provenant directement du fournisseur ont étéensemencées sur matrigel™ afin de déterminer avant même la transfection si elles forment spontanément des structures de type capillaire. Ultimement, la meilleure solution à ces limitations aurait été de trouver un lot de cellules qui ne forme pas spontanément des structures capillaires afin de générer une lignée qui exprime stablement le TF ou encore générer des virus afin d'infecter les cellules. Ces méthodes auraient permis de court-circuiter les problèmes rencontrés lors de la transfection et de la surexpression du TF.

4.2 Les cellules épithéliales de carcinome rénal surexpriment constitutivement le TF

En conditions physiologiques, le TF est exprimé de manière ubiquitaire au niveau des sites extravasculaires où son taux d'expression varie proportionnellement par rapport à la vascularisation de l'organe (Pawlinski et al, 2004). Les organes tels que le cerveau, les poumons, le cœur et *les reins* sont alors classés parmi ceux qui expriment des taux élevés de TF (Drake, Morrissey et Edington, 1989; Fleck et al., 1990; Hartzell et al., 1989; Mackman et al., 1993). Tandis qu'en conditions pathologiques, l'expression de cette protéine peut devenir aberrante tel qu'observé chez plusieurs types de tumeurs dont les gliomes, les leucémies ainsi que chez les cancers du colon, du pancréas et du sein (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003). De plus, il a été démontré que l'expression du TF est plus élevée chez les lignées malignes que bénignes (Abdulkadir et al., 2000; Koomagie et al., 1998; Seto et al., 2000).

La surexpression de cette protéine est également reliée à une élévation de la densité de microvaisseaux tumoraux ainsi qu'au phénotype de résistance multiple aux médicaments (MDR). Toutes ces corrélations sont alors synonymes de mauvais pronostic et de faible survie pour le patient atteint de cancer (Lwaleed et Cooper, 2000). En effet, plusieurs études cliniques ont démontré la capacité du TF à promouvoir la progression et la dissémination tumorale (Ruf et Mueller, 1996). Tous ces processus peuvent s'effectuer selon des mécanismes qui dépendent ou non de la coagulation extrinsèque déclenchés par la formation du complexe TF/FVIIa (Lykke et Nielson, 2003; Rickles, Patierno et Fernandez, 2003; Ruf, 2003; Versteeg et al., 2004).

D'une part, la liaison du FVII à l'ectodomaine du TF entraîne la phosphorylation de ses résidus de Ser²⁵³ et Ser²⁵⁸ situés dans la portion cytosolique du TF induisant alors une signalisation intracellulaire qui permet la progression tumorale. En effet, la cellule augmente sa production de cytokines et de facteurs de croissance (Bromberg et al., 1999; Camerer et al., 2002) tout en assurant la survie cellulaire par l'induction de signaux anti-apoptotiques principalement via l'activation de la voie de la phosphatidyl inositol 3'-kinase (PI3-K)/Akt (Sorensen et al., 2003). En dirigeant des anticorps contre la portion extracellulaire du TF, une

diminution du taux de métastases est observée dans les modèles murins (Wang et al. 2004). D'une autre part, le complexe pro-coagulant TF/FVIIa peut s'associer au FX et ce complexe trimérique induira la formation de la thrombine qui peut activer les récepteurs PAR-1 et 4 et induire une signalisation similaire à celle induite par la queue phosphorylée du TF (Lykke et Nielson, 2003; Rickles, Patierno et Fernandez, 2003; Ruf, 2003; Versteeg et al., 2004).

Outre l'activation de la signalisation intracellulaire, la formation du complexe TF/FVIIa peut déclencher la synthèse d'une matrice de fibrine dans le stroma tumoral. En effet, il a été démontré que les tumeurs rénales humaines sont cliniquement caractérisées par des dépôts massifs de fibrine dans leur espaces intra et extravasculaires (Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986). Ce comportement souligne alors la suractivation locale des mécanismes de coagulation extrinsèque au niveau du stroma tumoral. Ce fait est d'autant plus confirmé par la présence de FVII et de FX dans les espaces intercellulaires ainsi que par l'accumulation de plaquettes activées à la surface tumorale. Ces observations confirment donc que les tumeurs rénales possèdent un phénotype pro-coagulant (Zacharski, Memoli et Rousseau, 1986).

L'expression du TF a été préalablement démontrée chez les cellules épithéliales de carcinome rénal issues directement de patients cancéreux. En effet, une étude a déjà illustré que le taux d'expression du TF chez les tumeurs est inférieur par rapport à celui observé chez les tissus rénaux provenant de patients sains (Förster et al, 2003). Les résultats de la présente étude ont révélé la présence du TF chez les cellules épithéliales non-métastatiques (Caki-2) et métastatiques (Caki-1) de carcinome rénal. Cette observation a été ultérieurement corrélée avec une activité pro-coagulante supérieure chez la lignée cellulaire non métastatique (Caki-2). Ces résultats s'opposent complètement à ceux d'une étude démontrant que les cellules issues de tumeurs métastatiques expriment un taux supérieur de TF et donc possèdent une activité pro-coagulante plus élevée que leur contrepartie non-métastatique (Hu et al., 1994).

Plusieurs études ont préalablement démontré qu'une expression constitutive du TF n'est pas nécessairement un indice de l'activité pro-coagulante étant donné qu'une proportion du TF se retrouve sous un état inactif, plus spécifiquement sous un état cryptique (Bach, 1998; Carson et Bromberg, 2000; Nemerson et Giesen, 1998; Rao et Pendurthi, 1998; Wolberg et al., 1999). Cette observation explique pourquoi les cellules endothéliales qui expriment *in vivo* le TF ne subissent pas une auto-nécrose par thrombose excessive (Fernandez et Rickles, 2002). Plusieurs facteurs régulent l'état d'activation du TF dont la symétrie phospholipidique de la membrane cellulaire ainsi que la régulation des complexes quaternaires TF/FVIIa/FXa/TFPI suite à leur translocation dans les domaines cavéolaires (Sevinsky, Rao et Ruf, 2001; Shi et Abraham, 2001). Les résultats de la présente étude indiquent que les Caki-2 expriment plus de TF mais celui-ci ne semble pas inactivé étant donné que son activité de pro-coagulation est supérieure à celle des Caki-1. La migration cellulaire *in vitro* de ces cellules a alors été étudiée en présence de FVIIa afin de déterminer si la formation du complexe TF/FVIIa promouvait un comportement impliqué dans la progression et la dissémination tumorale.

4.2.1 Les effets du FVIIa sur l'induction du potentiel migratoire

La migration des cellules musculaires lisses ainsi que celle des cellules issues de carcinome du sein (MDA-MB-231) a déjà été étudiée en présence de FVIIa dont l'éventail de concentration s'étale de 0,1 à 100 nM. Dans tous les cas étudiés, la formation du complexe a permis d'induire la migration soit directement en induisant une signalisation avec sa portion cytosolique phosphorylé soit en trans-activant le récepteur PAR-2 (Hjortoe et al., 2004; Sato et al., 1997).

Les résultats de la présente étude soulignent l'implication du complexe TF/FVIIa dans la migration des cellules épithéliales de carcinome rénal. La migration des Caki-1 est induite en présence de 10 nM de FVIIa, ce qui correspond à la concentration physiologique (Fair, 1983). De plus, le potentiel de migration de ces cellules est maximale à 10 nM tandis qu'une baisse est observée au delà de cette concentration probablement due à la saturation du TF. Ce

comportement semble être caractéristique aux Caki-1 car chez la lignée MDA-MB-231, la migration est proportionnelle à la concentration de FVIIa utilisée (Hjortoe et al., 2004).

La régulation du nombre de complexes TF/FVIIa formés à la surface cellulaire est assurée par leur endocytose qui peut être effectuée de plusieurs manières. Il a été démontré que chez les fibroblastes l'internalisation et la dégradation du FVIIa lié au TF peut s'effectuer par sa liaison au TFPI. L'internalisation du complexe TF/FVIIa est également possible via son interaction avec le récepteur des lipoprotéines (LRP) (Iakhiaev et al., 1999). Un de ces modes d'endocytose peut alors être impliqué dans la baisse du potentiel de migration surtout au delà de la concentration physiologique de 10 nM de FVIIa.

La migration basale des Caki-1 est inférieure à celle des Caki-2. En effet, cette lignée non-métastatique maintient un taux de migration basal même lorsqu'en présence de concentrations croissantes de FVIIa. Ces résultats indiquent que la formation du complexe TF/FVIIa n'induit pas davantage la migration basale de cette lignée non-métastatique tandis que la situation inverse est observée chez la lignée métastatique. Un résultat similaire a été observé lors de la migration de deux lignées tumorales issues de carcinome du sein. Plus spécifiquement la migration des MDA-MB-231 a été induite lorsqu'en présence du FVIIa tandis que chez les Adr-MCF-7 le FVIIa n'induit aucun effet sur la migration (Hjortoe et al., 2004; Jiang et al., 2004).

4.2.2 Les implications des récepteurs PAR dans la migration des cellules épithéliales de carcinome rénal

Les résultats de la présente étude démontrent que la migration des Caki-1 est stimulée lorsque le complexe pro-coagulant TF/FVIIa est formé. Celui-ci peut alors initier une signalisation intracellulaire à partir de sa portion cytoplasmique nouvellement phosphorylée. De plus, ce complexe peut trans-activer des récepteurs avoisinants qui peuvent également contribuer à l'induction de la migration (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003). En effet, il a été illustré que le complexe TF/FVIIa trans-active les récepteurs PAR-2 chez les cellules

musculaires lisses (Maratsuka et al., 2002; Sato et al., 1997) ainsi que chez les cellules de carcinome du sein de type MDA-MB-231 (Hjortoe et al., 2004). De plus, une étude ultérieure a illustré que le complexe TF/FVIIa induit la trans-activation du EGF-R qui est couramment exprimé chez les cellules de carcinome rénal (Merseburger et al., 2005; Paule et Brion, 2003; Wiiger et Prydz, 2004).

Les résultats de cette étude illustrent que le FVIIa et l'agoniste peptidique de PAR-2 induisent à un taux similaire l'élévation de la migration des Caki-1. Étant donné la similitude, il est probable que la migration des Caki-1 s'effectue selon un mécanisme qui dépend de la formation du complexe TF/FVIIa suivi de la trans-activation du récepteur PAR-2. Quant à la migration des Caki-2, l'agoniste de PAR-1 est le seul composé qui élève la migration mais celle-ci est non-significative par rapport à la migration basale. Par conséquent, ces résultats indiquent que la migration des Caki-2 n'est pas stimulée par la thrombine excluant alors la possibilité de trans-activation des récepteurs PAR-1 et 4 par le complexe TF/FVIIa. De plus, l'ajout de l'agoniste de PAR-2 n'a pas induit davantage la migration indiquant alors que la formation du complexe TF/FVIIa ou du complexe TF/FVIIa/FXa ne suffit pas pour une élévation du potentiel migratoire par trans-activation du récepteur PAR-2.

Il ne faut pas exclure la possibilité que la trans-activation de récepteur PAR-1, 2 et 4 s'effectue mais que la signalisation qui en résulte active un processus cellulaire outre que la migration. En effet, il a été démontré que le complexe TF/FVIIa trans-active le récepteur PAR-2 qui à son tour stimule la prolifération cellulaire des BOSC23 qui sont des cellules rénales provenant d'embryon humain (Fan et al., 2005). Un tel phénomène a été illustré autrement lors de l'étude de la migration des cellules de carcinome du sein de type Adr-MCF-7. En effet, cette étude souligne que la migration cellulaire est induite suite à la formation du complexe TF/FVIIa/FXa. Cette migration s'effectue de manière indépendante à l'activation du récepteur PAR-1 tel que démontré suite à la comparaison des profils d'activation de la voie des MAP kinase obtenu par stimulation à l'agoniste peptidique de PAR-1 et par stimulation au FVIIa combiné au FX (Jiang et al., 2004).

4.2.3 Les effets de différents inhibiteurs sur la migration des cellules de carcinome rénal

Le comportement migratoire des cellules qui est induit par le FVIIa et les agonistes de PAR-1 et 2 a été évalué en présence des inhibiteurs du EGF-R (AG1478), des MMP (BB94) et de ERK (PD98059). L'implication de ces voies dans la migration des cellules épithéliales de carcinome rénal a été étudiée parce que la surexpression du EGF-R et des MMP a été préalablement décrite chez les cellules épithéliales issues directement des tumeurs rénales (Hemmerlein et al., 2004; Kitagawa et al., 1999; Merseburger et al., 2005).

Jusqu'à présent, les résultats de cette étude ont souligné l'importance de la formation du complexe TF/FVIIa lors de l'induction du potentiel migratoire des Caki-1. Ceci indique alors que l'exposition ainsi que le positionnement du TF à la surface cellulaire contribue directement au succès de la formation de ces complexes pro-coagulants (Fernandez et Rickles, 2002). De plus, certaines études ont démontré que le TF peut se retrouver sous un état inactif qui est communément appelé cryptique. L'inactivation du TF peut être levée lorsque la symétrie du feuillet externe de la membrane plasmique est altérée pour accommoder une plus grande présence de phosphatidylsérine (PS) (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003). Ce type de phospholipide de charge négative établit des interactions électrostatiques avec le domaine 4-carboxyglutamate (Gla) du FVII qui est chargé positivement (Furie et Furie, 1988; Mann, 1984). En effet, une étude parallèle a démontré que le TF est souvent localisé dans des invaginations membranaires communément appelées cavéoles qui sont dépourvues de phospholipides de charge négative défavorisant alors toute interactions avec la portion Gla du FVII. Une activation de cette portion cryptique est possible suite à un traitement cellulaire avec des solvants tels que le peroxyde d'hydrogène qui induisent la réorganisation des lipides membranaires (Mulder et al. 1996). De plus, l'état cryptique du TF diminue lorsqu'une grande partie du TF actif s'associe au TFPI sous la forme suivante TF/FVIIa/FXa/TFPI (Bach, 1998; Carson et Bromberg, 2000; Nemerson et Giesen, 1998; Rao et Pendurthi, 1998; Wolberg et al., 1999).

Les résultats de la présente étude illustrent que la migration des Caki-1 qui est induite par le FVIIa est d'autant plus marquée lorsqu'en présence de diméthyle sulfoxyde (DMSO). Il est alors probable que la présence de ce solvant modifie la symétrie phospholipidique du feuillet externe de la membrane plasmique favorisant davantage les interactions entre le FVIIa et le TF (Furie et Furie, 1988; Mann, 1984). Par conséquent, les complexes TF/FVIIa formés sont plus nombreux induisant alors une élévation plus marquée du potentiel migratoire. La migration effectuée en présence de l'agoniste de PAR-2 est également plus marquée lors de l'ajout du DMSO indiquant alors que la symétrie membranaire influence également l'interaction de l'agoniste peptidique avec son récepteur PAR-2. La modification de la symétrie membranaire induit alors une augmentation de la migration qui est vraisemblablement due à l'exposition et à l'activation de sites cryptiques de TF (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003). La présence de l'inhibiteur du EGF-R (AG1478) inhibe complètement l'induction de la migration observée préalablement par le FVIIa lorsqu'en présence de DMSO. Ce comportement implique que le complexe TF/FVIIa trans-active le EGF-R et la signalisation qui en résulte participe à l'induction du potentiel migratoire. Des résultats similaires ont été obtenus chez une lignée humaine de kératinocytes, les HaCat. Plus spécifiquement le complexe TF/FVIIa induit la phosphorylation du EGF-R ainsi que de la protéine *proline rich tyrosine kinase 2* (PYK2) cependant la signalisation induite ainsi que ces conséquences cellulaires demeurent peu élucidées (Wiiger et Prydz, 2004). Les résultats de cette étude indiquent alors que la signalisation induite par la trans-activation du EGF-R participe à l'induction du potentiel migratoire des Caki-1. Quant à la migration induite par l'agoniste de PAR-2, la présence du AG1478 n'altère pas l'induction observée lorsqu'en présence du DMSO. Ceci pourrait signifier que le complexe TF/FVIIa induit une trans-activation simultanée du EGF-R et du récepteur PAR-2 et que ces derniers activeront des voies de signalisation possédant des médiateurs intracellulaires communs. Ce scénario expliquerai pourquoi le taux de migration ne diminue pas même si la phosphorylation du EGF-R est inhibée. La présence du BB94 induit une diminution de la migration lorsqu'en présence du FVIIa et de l'agoniste de PAR-2. Ce résultat indique que le complexe TF/FVIIa peut trans-activer PAR-2 ainsi que certaines MMP matricielles exprimées chez les cellules épithéliales de carcinome rénal. Il est également probable que le complexe TF/FVIIa induit la trans-activation du récepteur PAR-2 qui à son tour déclenche une cascade de signalisation qui

active les MMP matricielles. La combinaison de toutes ces voies induit alors l'induction du potentiel migratoire. Quant à lui, l'inhibiteur de ERK (PD98059) met en valeur que la migration cellulaire dépend de l'activation de la voie des MAP kinases, tel que préalablement illustré chez plusieurs lignées cellulaires (Hanahan et Weinberg, 2000; Gingras et al., 2001). La migration de base qui est effectuée en absence de chimio-attractant est inhibée par rapport à celle obtenue en présence de DMSO, le même phénomène est observé en présence du FVIIa et des agonistes de PAR. Finalement la migration en présence de l'agoniste de PAR-1 n'a pas été altérée en présence des différents inhibiteurs testés indiquant que le complexe TF/FVIIa n'interagit pas avec le récepteur PAR-1 afin d'induire la migration cellulaire.

Le comportement migratoire des Caki-2 diffère significativement de celui observé chez les Caki-1. Tout d'abord, les résultats soulignent qu'en absence d'inhibiteur que le FVIIa et l'agoniste de PAR-2 n'induisent pas l'élévation de la migration par rapport à la migration observée en absence d'inhibiteur et de chimio-attractant. Ce manque d'induction ne peut être contribué à la faible expression du TF chez les Caki-2 car l'immuno-détection de cet antigène a été clairement mise en évidence tout en illustrant que la surexpression est plus marquée chez les Caki-2 que chez les Caki-1. Malgré une haute surexpression du TF la présence du FVIIa ne stimule pas la migration cellulaire. Un résultat semblable a été observé chez les cellules Adr-MCF-7 où la formation du complexe TF/FVIIa à la surface cellulaire ne suffisait pas pour induire la migration. Cette situation a par contre été remédiée suite à l'ajout du FX au système cellulaire permettant alors la trans-activation du récepteur PAR-2 qui a ensuite stimulé le potentiel migratoire (Jiang et al., 2004). Il est peu probable que le même scénario explique le manque de migration chez les Caki-2 car l'ajout de l'agoniste de PAR-2 n'a pas stimulé la migration cellulaire. Ceci indique alors que la formation du complexe TF/FVIIa n'induit pas une élévation du potentiel migratoire de ces cellules. Il est difficile d'expliquer pourquoi la migration des Caki-2 n'est pas induite en présence de FVIIa. Malgré la modification de la symétrie phospholipidique il est alors probable que la formation du complexe TF/FVIIa médie une signalisation qui régule un processus cellulaire qui exclut la migration. En effet, il a été démontré que le complexe TF/FVIIa induit la prolifération cellulaire (Fan et al., 2005) ainsi que des propriétés anti-apoptotiques (Sorensen et al., 2003). Ces deux processus sont indispensables à la survie et au développement de la tumeur

primaire (Rickles, Patierno et Fernandez, 2003). La présence du AG1478 n'altère pas le comportement migratoire des Caki-2 indiquant que la voie de signalisation activée par le EGF-R n'est pas impliquée parmi le processus de migration. Quant au BB94, celui-ci affecte la migration cellulaire de manière similaire peu importe le chimio-attractant utilisé. Cette observation souligne alors l'implication des MMP matricielles lors de la migration des Caki-2 tout en indiquant que celles-ci ne subissent pas d'activation supplémentaire lorsqu'en présence du FVIIa et de l'agoniste de PAR-2. Quant à lui, le PD98059 illustre encore une fois que la migration cellulaire est un processus qui engendre et qui dépend de l'activation de la voie des MAP kinases, ce phénomène a été préalablement souligné chez plusieurs lignées cellulaires (Hanahan et Weinberg, 2000; Gingras et al., 2001).

Pour récapituler, la migration des Caki-1 est vraisemblablement effectuée à partir de la trans-activation du EGF-R et du récepteur PAR-2 par le complexe pro-coagulant TF/FVIIa. De plus, les résultats suggèrent que la signalisation déclenchée par PAR-2 induit l'activation des MMP matricielles qui participent également à l'élévation de la migration. Quant aux Caki-2, le taux de migration basal est partiellement dû à l'activité des MMP matricielles. De plus, la migration ne semble pas être stimulée par la voie activée par le EGF-R. Finalement, l'activation de la voie des MAP kinases et plus spécifiquement la protéine ERK est nécessaire lors du processus de migration des lignées métastatiques et non-métastatiques de carcinome rénal humain. Par conséquent, son inhibition entraîne une baisse marquée de la migration peu importe les conditions testées.

4.2.4 Le dosage de l'activité pro-coagulante des cellules épithéliales de carcinome rénal

Jusqu'à présent les résultats de cette étude ont clairement illustré que les cellules épithéliales non-métastatiques de carcinome rénal (Caki-2) expriment un taux élevé de TF par contre celui-ci n'induit pas la migration cellulaire lorsqu'en présence du FVIIa. La situation inverse est observée chez la contrepartie métastatique car les Caki-1 expriment un plus faible taux de TF mais lorsqu'en complexe avec le FVIIa, celui-ci participe à l'induction du potentiel migratoire selon un mécanisme qui permet la trans-activation du EGF-R, du

récepteur PAR-2 et indirectement des MMP matricielles. Étant donné les divergences sur le plan de l'expression protéique et sur le plan de la migration cellulaire, un test de l'activité pro-coagulante a été effectué afin de vérifier la fonctionnalité des complexes TF/FVIIa à la surface cellulaire de chaque lignée.

De manière générale, cette analyse a confirmé que les Caki-2 possèdent une activité pro-coagulante nettement supérieure en comparaison à celle des Caki-1. Ceci confirme davantage que les complexes TF/FVIIa qui se forment à la surface des Caki-2 sont plus nombreux que ceux formés chez les Caki-1. Cette observation indique également qu'un plus faible nombre de complexe TF/FVIIa possède la capacité d'induire la migration cellulaire chez les Caki-1. Ces constatations ont alors permis de souligner une grande différence entre le comportement migratoire et pro-coagulant des cellules métastatiques et non-métastatiques dérivant d'une même lignée cellulaire. Il est donc probable que la signalisation intracellulaire qui est déclenchée par le TF modifie en fonction du phénotype métastatique de la lignée cellulaire.

Tel qu'illustré lors de la migration cellulaire, la présence du DMSO permet la formation d'un plus grand nombre de complexes TF/FVIIa à la surface cellulaire. Ce phénomène est vraisemblablement provoqué par la modification du feuillet externe de la membrane plasmique entraînant l'exposition des phosphatidylsérines. La redistribution des lipides influence alors la fonction biologique du TF car elle permet davantage les interactions électrostatiques entre le TF et le FVIIa favorisant la formation des complexes TF/FVIIa et donc l'élévation de l'activité pro-coagulante *in vitro* (Bach et Rifkin, 1990; Nermerson, 1968). Par contre le DMSO contenu dans les inhibiteurs AG1478, BB94 et PD98059 ne peut induire l'élévation de l'activité pro-coagulante. Il est alors possible que la présence des molécules inhibitrices entrave la modification de la symétrie membranaire préalablement observée avec le DMSO. Ceci suggère que l'interaction des inhibiteurs avec leurs cibles cellulaires entraînerai la diminution de la symétrie ainsi que de la fluidité membranaire entraînant une baisse marquée de l'exposition du TF par rapport à celle observée en présence du DMSO. En effet, la symétrie et la fluidité membranaire des Caki-1 qui est observée en

présence de tous les inhibiteurs testés est semblable à celle obtenue en absence d'inhibiteurs car les activités pro-coagulantes mesurées sont similaires. Ces résultats illustrent alors que la présence des inhibiteurs n'altère pas la capacité du TF à lier son ligand naturel le FVIIa. Il est à noter que le dosage de l'activité pro-coagulante du complexe TF/FVIIa est basée sur la capacité du TF à reconnaître et à lier le FVIIa. Tandis que la migration cellulaire effectuée en présence de ces mêmes inhibiteurs permet d'étudier la capacité du complexe TF/FVIIa à induire la migration même suite à l'inactivation des voies de signalisation ciblées par le AG1478, le BB94 et le PD98059.

Chez les Caki-2, l'activité pro-coagulante du complexe TF/FVIIa est supérieure à celle des Caki-1. De plus, cette analyse a permis de souligner que la présence du DMSO n'influence pas l'activité pro-coagulante des Caki-2. Ceci indique alors que la membrane plasmique ne subit pas un réarrangement de ces constituants lipidiques afin d'activer une portion cryptique de TF. Ce phénomène peut être expliqué de deux manières: d'une part il est possible que la distribution membranaire du TF est uniforme chez les Caki-2 signifiant alors que la présence du DMSO ne peut induire l'exposition supplémentaire du TF, de l'autre part il est probable que la membrane des Caki-2 possède un faible contenu de phosphatidylsérines et/ou de phospholipides chargés négativement défavorisant alors la modification de la symétrie membranaire. Lorsque les molécules inhibitrices BB94 et PD98059 sont ajoutées au DMSO l'activité pro-coagulante qui est obtenue est légèrement supérieure par rapport à celle obtenue en présence de DMSO. Il est alors probable que la liaison de ces inhibiteurs avec leurs cibles cellulaires entraîne une réorganisation des composés lipidiques ainsi qu'une augmentation de la fluidité membranaire permettant alors une augmentation légère de l'activité pro-coagulante des Caki-2. Tandis que la combinaison du DMSO et de l'inhibiteur AG1478 entraîne plutôt une baisse marquée de l'activité pro-coagulante en comparaison à celle obtenue en présence de DMSO et en absence d'inhibiteurs. Ce résultat indique que le AG1478 interfère lors de la formation des complexes TF/FVIIa. Les résultats indiquent que cet inhibiteur a la capacité de provoquer une diminution marquée de la symétrie et de la fluidité membranaire provoquant alors une baisse au niveau de la formation des complexes TF/FVIIa.

Pour récapituler, les résultats de la présente étude illustrent que l'activité de pro-coagulation est augmentée lorsque la symétrie et la fluidité membranaire est altérée, cet effet est surtout observé chez les Caki-1 mises en présence de DMSO. Par contre lorsque ce solvant est supplémenté avec les différents inhibiteurs testés, l'activité pro-coagulante obtenue est semblable à celle observée en absence d'inhibiteurs indiquant que leur présence n'induit aucune interférence lors de la liaison entre le TF et le FVIIa. Tandis que chez les Caki-2, le comportement pro-coagulant diffère en présence de DMSO car, il n'induit pas l'altération de la fluidité membranaire ni d'augmentation de l'activité pro-coagulante. De plus la présence des inhibiteurs affecte la formation du complexe TF/FVIIa. Le BB94 et le PD98059 induisent une légère augmentation indiquant que possiblement que leur présence dans le DMSO provoque une faible réorganisation lipidique tandis que le AG1478 induit une baisse marquée de l'activité de pro-coagulation possiblement due à une diminution de la fluidité membranaire, celle-ci devient probablement plus visqueuse et le TF qu'y se retrouve interagit moins bien avec le FVIIa possiblement à cause des raisons reliées à l'encombrement stérique ou à la faible présence de phosphatidylsérine à proximité de la protéine.

4.2.5 La signalisation induite par le complexe TF/FVIIa

La formation du complexe pro-coagulant TF/FVIIa déclenche une cascade de signalisation intracellulaire qui varie selon la lignée cellulaire étudiée. Plus spécifiquement, l'association du FVIIa à son récepteur cellulaire provoque l'oscillation de la concentration cytosolique des ions Ca^{2+} chez les fibroblastes et les oocytes de *Xenopus* (Petersen et al., 2000; Camerer et al., 1996; Rottingen et al., 1995), la phosphorylation des résidus de tyrosine intra-cytosoliques chez les monocytes, la synthèse du VEGF chez les fibroblastes (Ollivier et al., 1998), l'altération du cytosquelette par l'activation de la ABP-280 (Ott et al., 1998) ainsi que l'activation de la famille de Src (c-Src, Lyn et YES) suivi de l'activation des petites protéines G dont Rac et Cdc42 (Versteeg et al., 2000). La présente étude a alors évalué la capacité du complexe TF/FVIIa à induire une signalisation intracellulaire qui aboutit à l'activation de ERK, une protéine dont l'activation est impliquée dans la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire (Rubinfeld et Seger, 2005).

Il a été préalablement illustré que l'activation de ERK est impliquée lors du processus de la migration cellulaire (Gingras et al., 2001). En effet, la capacité du complexe TF/FVIIa à induire l'activation de ERK a été préalablement observée chez les cellules embryonnaires rénales de hamster (BHK) surexprimant transitoirement le TF (Sorensen et al; 1999; Poulsen et al., 1998). Les résultats de la présente étude indiquent que l'association du FVIIa à son récepteur cellulaire, le TF, induit une signalisation cellulaire qui provoque l'activation et dont la phosphorylation de ERK chez les cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal (Caki-1). En effet, une phosphorylation optimale a été observée à partir de 5 minutes de stimulation en présence d'une concentration physiologique de 10 nM de FVIIa (Cirillo et al., 2004; Fair, 1983).

Une cinétique d'activation similaire a été rapportée chez les cellules musculaires lisses stimulées en présence de 100 nM de FVIIa, une concentration qui est dix fois supérieure à la valeur physiologique (Cirillo et al., 2004; Fair, 1983). De plus, la même étude indique que l'activation de ERK a été maintenue pendant 20 minutes avant de retourner à un état basal d'activation (Cirillo et al., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus avec les Caki-1 car l'activation optimale de ERK a été observée à partir de 5 minutes de stimulation et maintenue même après 15 minutes de stimulation au FVIIa. Ces résultats sont les premiers à décrire la cinétique d'activation de ERK chez un modèle physiologique de cellules épithéliales issues de carcinome rénal humain qui ont été mises en présence d'une concentration physiologique de FVIIa (Cirillo et al., 2004).

L'activation de la voie des MAP kinases par le FVIIa a été préalablement illustrée mais la rapidité de la stimulation ainsi que la concentration du FVIIa sont nettement supérieurs que les conditions employées lors de la stimulation des Caki-1 (Poulsen et al., 1998; Sorensen et al., 1999). Chez les Caki-1, une courte stimulation de 5 minutes en présence de 1 et de 10 nM de FVIIa assure la phosphorylation de ERK. Tandis qu'une stimulation de 10 minutes en présence de 12,5 nM de FVIIa est nécessaire afin d'activer la phosphorylation de ERK chez les BHK surexprimant transitoirement le TF. De plus, cette étude a illustré que la

phosphorylation de cette protéine est proportionnelle à la concentration de FVIIa utilisée (Sorensen et al., 1999), ce phénomène n'a pas été observé lors de la stimulation des Caki-1.

Ces résultats illustrent qu'en présence du FVIIa les Caki-1 induisent une signalisation intra-cellulaire qui aboutit à l'activation de ERK qui est un membre important dans la famille des MAP kinases (Rubinfeld et Seger, 2005). Cette activation a été observée après 1 minute de stimulation en présence d'une concentration physiologique de FVIIa ainsi qu'après 5 minutes de stimulation en présence de 1 nM de FVIIa. Ces données illustrent alors la spécificité de reconnaissance du TF pour son ligand naturel, le FVIIa, ainsi que la rapidité d'induction de la signalisation intracellulaire qui permet l'activation de ERK.

4.2.6 Le complexe TF/FVIIa trans-active les récepteurs PAR

Étant donné que la migration est un processus cellulaire qui dépend de l'activation de ERK, cette portion de l'expérimentation a porté sur la capacité du FVIIa et des agonistes de PAR-1 et 2 à induire la phosphorylation de ERK. De plus, ces profils d'activation ont été comparés afin de déterminer si le complexe TF/FVIIa induit la trans-activation de ces récepteurs qui à la suite induisent une signalisation permettant d'activer ERK.

Lorsque le FVIIa lie son récepteur cellulaire, le complexe TF/FVIIa qui est formé déclenche une signalisation intracellulaire qui assure l'activation/phosphorylation de ERK. Ce processus est caractérisé par sa rapidité ainsi que par son efficacité car une stimulation de 5 minutes en présence de 1 nM de FVIIa permet de souligner l'activation de la voie des MAP kinases. De plus, les résultats obtenus indiquent que le FXa ainsi que l'agoniste de PAR-2 induisent l'activation de ERK selon une cinétique qui est similaire à celle du FVIIa. Ceci pourrait indiquer que le complexe TF/FVIIa induit la trans-activation des récepteurs PAR-2 qui déclenchent une signalisation assurant ainsi l'activation de ERK. Étant donné les implications du récepteur PAR-2 dans la migration des Caki-1, il est probable que ce mécanisme d'activation participe à l'induction de leur potentiel migratoire. De plus, les

résultats illustrent que le FXa assure l'activation de ERK selon une cinétique semblable à celle du FVIIa et de l'agoniste de PAR-2. Il est alors probable que la présence du FX favorise davantage la migration *in vivo* des Caki-1 en s'associant au complexe TF/FVIIa avant de trans-activer les récepteurs PAR-2. Il est à noter que la migration *in vitro* des Caki-1 a été effectuée en absence du FX, ceci indique alors que sa présence n'est pas obligatoire afin d'assurer l'induction du potentiel migratoire. Finalement, les résultats de cette étude ont illustré que le FVIIa et le FX induisent une phosphorylation ponctuelle de ERK tandis que l'agoniste de PAR-2 assure une activation qui s'éteint graduellement même après 30 minutes de stimulation afin de retrouver son état basal de d'activation. Ceci indique que l'activation *in vivo* de PAR-2 permet une phosphorylation plus prolongée de ERK impliquant alors l'existence d'autres substrats qui ont la capacité d'activer ce récepteur dont la trypsine et la tryptase mastocytaire (Camerer, Huang et Coughlin, 2000). Une activation prolongée de cette protéine de la voie des MAP kinases signifie que les Caki-1 induisent les processus qui permettent leur survie, leur prolifération, leur différenciation oncologique ainsi que leur migration/invasion cellulaire. Tous ces processus favorisent alors la progression et la dissémination tumorale à travers de l'organe cible et/ou à travers de l'organisme (Rubinfeld et Seger, 2005; Folkman, 2003).

La phosphorylation de ERK chez les Caki-1 a été également observée en présence des agonistes de PAR-1 et 4. Plus spécifiquement, les résultats illustrent que la pro-thrombine, qui est la forme zymogène de la thrombine, peut induire l'activation de ERK. Ceci permet d'obtenir un profil d'activation qui est semblable à celui obtenu en présence de l'agoniste du récepteur PAR-4. L'activation ponctuelle de ERK qui est observée en présence de la thrombine ressemble partiellement à celle obtenue avec l'agoniste de PAR-1 car ce dernier entraîne une cinétique d'activation qui est plus rapide et qui dure quelques minutes de plus par rapport à celle de la thrombine. Ces résultats démontrent que l'activation de la voie de ERK ne se traduit pas nécessairement en une induction de la migration cellulaire. Ceci a été reflété lors de la migration *in vitro* des Caki-1 car celles-ci maintiennent leur taux basal de migration même en présence de l'agoniste de PAR-1. L'activation protéolytique *in vivo* de ces récepteurs par la thrombine permettra alors l'activation de la voie des MAP kinases et plus spécifiquement de ERK. Il est alors probable que l'activation de ERK contribue à la

différenciation et à la prolifération des Caki-1 deux processus qui permettront la survie et la progression des cellules tumorales par rapport à l'environnement hostile de l'organisme qui est activé et maintenu par le système immunitaire (De Ciera, 2003; Hedstrom, 2002).

L'activation de la voies de MAP kinases chez les cellules épithéliales non-métastatiques de carcinome rénal (Caki-2) diffère énormément de celle observée chez les Caki-1. En effet, la phosphorylation de ERK n'a pas été observée en présence du FVIIa et de l'agoniste de PAR-2. Il est alors probable que complexe TF/FVIIa nouvellement formé à la surface des Caki-2 n'induit pas de signalisation qui aboutit à l'activation de la voie de ERK. Cette explication est plausible car les Caki-2 expriment un taux élevé de TF qui en association avec le FVIIa possède une activité pro-coagulante supérieure à celle des Caki-1. Ces observations confirment alors que l'absence de l'activation de la voie de ERK n'est pas due à l'absence des complexes pro-coagulants à la surface de la cellule. Ces résultats signifient également que le complexe TF/FVIIa ne peut induire la trans-activation d'autres récepteurs qui peuvent à leur tour activer le voie de ERK. Ceci a été partiellement confirmé en utilisant l'agoniste de PAR-2, les résultats illustrent que cet agoniste ne permet pas l'activation de ERK. Quant à lui, l'agoniste de PAR-1 a été le seul composé qui a pu induire une phosphorylation ponctuelle de ERK. Cette observation confirme alors que le complexe TF/FVIIa ne trans-active pas le récepteur PAR-1 tout en indiquant que la thrombine induit une signalisation qui régule les processus de survie, de prolifération et de différenciation (Rubinfeld et Seger, 2005). De plus, la migration *in vitro* des Caki-2 a indiqué que l'agoniste de PAR-1 ne peut pas stimuler la migration au-delà de la migration basale.

Pour récapituler, les cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal (Caki-1) peuvent induire l'activation de la voie de ERK suite à la formation du complexe TF/FVIIa à la surface cellulaire. Cette activation est vraisemblablement due à la trans-activation du récepteur PAR-2. L'ajout du FX participe à cette trans-activation en s'associant au complexe TF/FVIIa. L'activation qui a été observée en présence de l'agoniste de PAR-1 et de PAR-4 indique que la thrombine peut activer certains processus cellulaires excluant la migration car celle-ci est régulée par la trans-activation du PAR-2 via le complexe TF/FVIIa. Quant aux

cellules non-métastatiques, les Caki-2, l'activation de ERK est uniquement observée en présence de l'agoniste de PAR-1 indiquant alors que la signalisation est assurée selon un mécanisme dépendant de l'activation de l'hémostase. Tandis que chez les Caki-1 la signalisation est effectuée selon des mécanismes qui dépendent et non de l'hémostase.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Plusieurs études ont souligné la surexpression du TF chez un grand nombre de lignées tumorales. En effet, cette glycoprotéine appartenant à la superfamille des cytokines est surtout reconnue pour l'initiation de la coagulation extrinsèque. En effet, elle assure l'intégrité vasculaire en formant une enveloppe pro-coagulante autour des vaisseaux sanguins. Par conséquent, sa surexpression chez les tumeurs rénales assure l'acquisition de leur caractère pro-coagulant provoquant alors de nombreux dépôts de fibrine dans les espaces intra et extravasculaires de la tumeur.

D'une part, les résultats de cette étude ont démontré que la surexpression du TF induit un phénotype pro-angiogénique chez les cellules endothéliales de l'aorte bovine selon des mécanismes qui sont dépendants et indépendants de l'hémostase. D'une autre part, les résultats ont illustré que le complexe TF/FVIIa trans-active le récepteur PAR-2 qui déclenche une signalisation induisant la migration uniquement chez les cellules épithéliales métastatiques de carcinome rénal même si leur contrepartie non-métastatique possède une activité pro-coagulante plus forte, une expression plus élevée du TF ainsi qu'une migration basale supérieure à celle des cellules métastatiques. En effet, cette étude illustre que la migration de la lignée métastatique est régulée par la voie des MAP kinases tout en étant stimulée par la trans-activation du récepteur du facteur de croissance épidermal ainsi que par les métalloprotéases de type matriciel. Finalement, la cinétique d'activation de la voie de ERK a mis en valeur le couplage entre le complexe TF/FVIIa et le récepteur PAR-2 qui permet vraisemblablement l'induction du potentiel migratoire des cellules épithéliales

métastatiques. L'activation de cette voie a été également observée en présence de l'agoniste de PAR-1 et 4 signifiant que, lorsque présente *in vivo*, la thrombine joue un rôle dans la transmission de signaux intracellulaires qui aboutissent à l'activation de ERK. Par contre, ces agonistes n'ont pas pu induire une élévation du potentiel migratoire des cellules métastatiques excluant alors la capacité de la thrombine à stimuler *in vivo* la migration des ces cellules. Quant aux cellules épithéliales non-métastatiques, l'activation de la voie de ERK est uniquement observée en présence de l'agoniste de PAR-1, cela ne s'est par contre pas traduit en stimulation de la migration des cellules non-métastatiques au-delà de leur taux de migration basal. Ces résultats illustrent vraisemblablement que la régulation des processus cellulaires, à l'exception de la migration, est exécutée selon des mécanismes qui sont dépendants de la thrombine.

Les tumeurs rénales sont caractérisées par un phénotype pro-coagulant ainsi que par une haute vascularisation tumorale. Ces tumeurs demeurent hautement résistantes aux traitements de chimiothérapie confirmant alors la nécessité de mieux caractériser les effets de la surexpression du TF sur l'endothélium ainsi que sur le tissu tumoral métastatique et non-métastatique. En effet, les résultats de cette étude préliminaire illustrent en partie que le TF constitue un des maillons reliant l'hémostase à l'angiogenèse ainsi qu'à la progression tumorale.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Wahed, M. M., N. Y. Assad et M. Aleskandarany. 2004. «Expression of matrix metalloproteinase-2 in renal cell carcinoma». *Journal of the Egyptian Cancer Institute*, vol. 16, no 3, p. 168-177.
- Abdulkadir, S. A., G. F. Carvalhal, Z. Kaleem, W. Kisiel, P. A. Humphrey, W. J. Catalona et J. Milbrandt. 2000. «Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma». *Human Pathology*, vol. 31, no 4, p. 443-447.
- Abe, K., M. Shoji, J. Chen, A. Bierhaus, I. Danave, C. Micko, K. Casper, D. Dillehay, P. Nawroth et Rickles. 1999. «Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no 15, p. 8663-8668.
- Ahamed, J., et W. Ruf. 2004. «Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no 22, p. 23038-23044.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Pagé, D. Gingras et R. Béliveau. 2001. «Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains». *Biochemical Journal*, vol. 353, no 3, p. 547-553.
- Bach, R., et D. B. Rifkin. 1998. «Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 18, p. 6995-6 999.
- Bach, R. 1998. «Mechanism of tissue factor activation on cells». *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 9, no S1, p. S37-S43.
- Baffy, G., L. Yang, S. Raj, D. R. Manning et J. R. Williamson. 1994. «G protein coupling to the thrombin receptor in Chinese hamster lung fibroblasts». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no 11, p. 8483-8487.
- Banner, D. W., A. D'Arcy, C. Chene, F. K. Winkler, A. Guha, W. H. Konigsberg, Y. Nemerson et D. Kirchhofer. 1996. «The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor». *Nature*, vol. 380, no. 6569, p. 41-46.

- Barbui, T., G. Finazzi et A. Falanga. 1996. *Leukaemia: The management of bleeding and thrombosis in leukaemia*. Philadelphie, États-Unis: maison d'édition n/d, p. 291-311.
- Bazan, J. F. 1990. «Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no 18, p. 6934-6938.
- Belham, C. M., R. J. Tate, P. H. Scott, A. D. Pemberton, H. R. Miller, R. M. Wadsworth, G. W. Gould et R. Plevin. 1996. «Trypsin stimulates proteinase-activated receptor-2-dependent and independent activation of mitogen-activated protein kinases». *Biochemical Journal*, vol. 320, no 3, p. 939-946.
- Belting, M., M. Dorrell, S. Sandgren, E. Aguilar, J. Ahamed, A. Dorfleutner, P. Cameliét, B. M. Mueller, M. Friedlander et W. Ruf. 2004. «Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling». *Nature Medicine*, vol. 10, no 5, p. 502-509.
- Benka, M. L., M. Lee, G. R. Wang, S. Buckman, A. Burlacu, L. Cole, A. DePina, P. Dias, A. Granger, B. Grant, A. Hayward-Lester, S. Karki, S. Mann, O. Marcu, A. Nussenweig, P. Piepenhagen, M. Raje, F. Roegiers, S. Rybak, A. Salic, J. Smith-Hall, J. Waters, N. Yamamoto, J. Yanowitz, K. Yeow, W. B. Busa et M. E. Mendelsohn. 1995. «The thrombin receptor in human platelets is coupled to a GTP binding protein of the G alpha q family ». *FEBS Letters*, vol. 363, no 1-2, p. 49-52.
- Bertram, J. S. 2001. «The molecular biology of cancer». *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 21, no 6, p. 167-223.
- Blum, S., K. Issbrucker, A. Willuweit, M. Lucerna, D. Mechtcheriakova, D. von der Ahe, E. Hofer et M. Clauss. 2001. «An inhibitory role of phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway in vascular endothelial growth factor induced tissue factor expression». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no 36, p. 33428-33434.
- Bohm, S. K., W. Kong, D. Bromme, S. P. Smeekers, D. C. Anderson, A. Connolly, M. Kahn, N. A. Nelken, S. R. Coughlin, D. G. Payan et W. Bunnett. 1996. «Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2». *Biochemical Journal*, vol. 314, no Pt 3, p. 1009-1016.
- Bromberg, M. E., W. H. Konigsberg, J. F. Madison, A. Pawashe et A. Garen. 1995. «Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no 18, p. 8205-8209.
- Bromberg, M. E., R. Sundaram, R. J. Homer, A. Garen et W. H. Konigsberg. 1999. «Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule». *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 82, no 1, p. 88-92.

- Brown, J. M., et A. J. Giaccia. 1998. «The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy». *Cancer Research*, vol. 58, no. 7, p. 1408-1416.
- Bugge, T. H., Q. Xiao, K. W. Kombrinck, M. J. Flick, K. Holmback, M. J. Danton, M. C. Colbert, D. P. Witte, K. Fukikawa, E. W. Davie et J. L. Degen. 1996. «Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell associated initiator of blood coagulation». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no 13, p. 6258-6263.
- Butenas, S., C. van't Veer, K. Caethern, K. E. Brummel et K. G. Mann. 2000. «Models of blood coagulation». *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 11, no 1, p. S9-S13.
- Cain, G., P. S. Stonelake, G. Y. H. Lip et S. T. Kehoe. 2002. «The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate». *Neoplasia*, vol. 4, no 6, p. 465-473.
- Camerer, E., J. A. Rottingen, J.-G. Iversen et H. Prydz. 1996. «Coagulation factor FVII and X induce Ca^{2+} oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteotically active». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no 46, p. 29034-29042.
- Camerer, E., W. Huang et S. R. Coughlin. 2000. «Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa». *Proceedings of the National Academy of sciences*, vol. 97, no 10, p. 5255-5260.
- Camerer, E., E. Gjernes, M. Wiiger, S. Pringle et H. Prydz. 2002. «Binding of FVIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no 9, p. 6580-6585.
- Canada, Agence de la santé publique, Statistique Canada, Société canadienne du cancer/Institut national du cancer du Canada. 2005. *Statistiques canadiennes sur le cancer*. Ottawa: Imprimeur de la Reine.
- Carmeliet, P., N. Mackman, L. Moons, T. Luther, P. Gressens, I. Van Vlaenderen, H. Demmunk, M. Kasper, G. Breier, P. Evrard, M. Muller, W. Riseau, T. Edgington et D. Collen. 1996. «Role of tissue factor in embryonic blood vessel development». *Nature*, vol. 383, no 6595, p. 73-75.
- Carmeliet, P. 2003. «Angiogenesis in health and disease». *Nature Medicine*, vol. 9, no 6, p. 653-660.
- Carson, S. D., et M. E. Bromberg. 2000. «Tissue factor encruption/de-encryption is not altered in the absence of the cytoplasmic domain». *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 84, no 4, p. 657-663.

- Casali, B., M. G. Lamougnani, M. Riganti, A. Niewiarowska, G. Alessio, L. Mussoni, N. Semraro et M. B. Donati. 1988. «DMSO-induced changes in the procoagulant and fibrinolytic activity of B16 melanoma cells: influence on lung colony formation». *Clinical and Experimental Metastasis*, vol. 6, no 5, p. 377-385.
- Cirillo, P., C. Gaetano, P. Golino, P. Calabrò, L. Forte, S. De Rosa, M. Pacileo, M. Ragni, F. Scopacasa, L. Nitsch et M. Chiariello. 2004. «Tissue factor binding of activated FVIIa triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase». *Circulation*, vol. 109, no 23, p. 2911-2916.
- Clarke, B. J., F. A. Ofori, R. D. Bona, F. R. Rickles et M. A. Blajchman. 1992. «The first epidermal growth factor domain of human coagulation factor VIIa is essential for binding with tissue factor». *FEBS Letters*, vol. 298, no 2-3, p. 206-210.
- Connolly, A. J., H. Ishihara, M. L. Kahn, R. V. Farese Jr. et S. R. Coughlin. 1996. «A role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor». *Nature*, vol. 381, no 6582, p. 516-519.
- Contrino, J., G. Hair, D. L. Kreutzer et F. Rickles. 1996. «*In situ* detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease». *Nature Medicine*, vol. 2, no 2, p. 209-215.
- Corvera, C. U., O. Dery, K. McConalogue, S. K. Bohm, L. M. Khitin, G. H. Caughey, D. G. Payan et N. W. Bunnett. 1997. «Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 100, no 6, p. 1383-1393.
- Corvera, C. U., O. Dery, K. McConalogue, P. Gamp, M. Thoma, B. Al-Ani, G. H. Caughey, M. D. Hollenburg et N. W. Bunnett. 1999. «Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptor-1 and -2». *Journal of Physiology*, vol. 517, no 3, p. 741-756.
- De Ciera, E. 2003. «Thrombin interactions». *CHEST*, vol. 124, no 3, p. 11-17.
- Denko, N. C., et A. Giaccia. 2001. «Tumor hypoxia, the physiological link between Trousseau's syndrome (carcinoma-induced coagulopathy) and metastasis». *Cancer Research*, vol. 61, no 3, p. 795-798.
- Derian, C. K., B. P. Damiano, M. R. D'Andrea et P. Andrade-Gordon. 2002. «Thrombin regulation of cell function through protease-activated receptors: implications for therapeutic intervention». *Biochemistry (Moscow)*, vol. 67, no 1, p. 66-67.
- Dery, O., C. U. Corvera, M. Stenhoff et N. W. Bunnett. 1998. «Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases». *American Journal of Physiology*, vol. 274, no 6, p. C1429-C1452.

- Dietzen, D. J., K. L. Page et T. A. Tetzloff. 2004. «Lipid rafts are necessary for tonic inhibition of cellular tissue factor procoagulant activity». *Blood*, vol. 103, no 8, p. 3038-3044.
- Donaldson D. J., M. K. Dunlap, 1981. «Epidermal cell migration during attempted closure of skin wounds in the adult newt: observations based on a cytochalasin treatment and scanning electron microscopy». *Cell and Tissue Research*, vol. 217, no 1, p. 33-43.
- Donati, M. B. 1995. «Cancer and thrombosis: from phlegmasia alba dolens to transgenic mice». *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 74, no 1, p. 278-281.
- Dorfleutner, A., E. Hintermann, T. Tarui, Y. Takada et W. Ruf. 2004. «Cross-talk of integrin $\alpha_3\beta_1$ and tissue factor in cell migration». *Molecular Biology of the Cell*, vol. 15, no 10, p. 4416-4425.
- Drake, T. A., J. H. Morrissey, T. S. Edgington. 1989. «Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of haemostasis and thrombosis». *American Journal of Pathology*, vol. 134, no 5, p. 1087-1097.
- Dupuy, E., A. Habib, M. Lebreton, R. Yang, S. Levy-Toledar et G. Tobelem. 2003. «Thrombin induces angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in human endothelial cells: possible reference to HIF- α ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 1, no 5, p. 1096-1102.
- Dvorak, H. F. 1986. «Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing». *New England Journal of Medicine*, vol. 315, no 26, p. 1650-1659.
- Dvorak, H. F., J. A. Nagy, J. T. Dvorak et A. M. Dvorak. 1988. «Identification and characterization of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules». *American Journal of Pathology*, vol. 133, no 1, p. 95-109.
- Dvorak, H.F., J. A. Nagy, D. Feng, L. F. Brown et A. M. Dvorak. 1999. «Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis». *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 237, p.97 -132.
- Eberhard, A., S. Kahlert, V. Goede, B. Hemmerlein, K. H. Plate et H. G. Augustin. 2000. «Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: Implications for antiangiogenic tumor therapies». *Cancer Research*, vol. 60, no 5, p. 1388-1393.
- Edgington, T. S., N. Mackman, K. Brand et W. Ruf. 1991. «The structural biology of expression and function of tissue factor». *Thrombosis Research*, vol. 66, no 1, p. 67-79.

- Eilertsen, K.-E., et B. Osterud. 2004. «Tissue factor (patho)physiology and cellular biology». *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 15, no 7, p. 521-538.
- Ellis, C. A., A. B. Malik, A. Gilchrist, H. Hamm, R. Sandoval, T. Voyno-Yasenetskaya et C. Tirupatthi. 1999. «Thrombin induces proteinase-activated receptor-1 gene expression in endothelial cells via activation of G_i linked Ras/mitogen-activated protein kinase pathway». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no 19, p. 13718-13727.
- English, D., Z. Welch, A. T. Kovala, K. Harvey, O. V. Volpert, D. A. Brindley et J. G. N. Garcia. 2000. «Sphingosine 1-Phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link of between hemostasis and angiogenesis». *FASEB Journal*, vol. 14, no 14, p. 2255-2265.
- Erickson, H. P., et W. E. Fowler. 1983. «Electron microscopy of fibrinogen, its plasmatic fragments and small polymers». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 408, p. 146-163.
- Erlich, J., G. C. Parry, C. Fears, M. Muller, P. Carmeliet, P. Luther et N. Mackman, 1999. «Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no 14, p. 8138-8143.
- Fair, D. S. 1983. «Quantification of FVII in the plasma of normal and warfarin-treated individuals by radioimmunoassay». *Blood*, vol. 62, no 4, p. 784-791.
- Falanga, A., et F. R. Rickles. 1999. «Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient». *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, vol. 25, no 2, p. 173-182.
- Fan, L., W. V. Yotov, T. Zhu, L. Esmailzadeh, J. S. Joyal, F. Sennlaub, N. Heveker, S. Chemtob et G. E. Rivard. 2005. «Tissue Factor enhances protease-activated receptor-2-mediated factor VIIa cell proliferative properties». *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, no 5, p. 1056-1063.
- Fernandez, P. M., et F. R. Rickles. 2002. «Tissue factor and angiogenesis in cancer». *Current Opinion in Hematology*, vol. 9, no 5, p. 401-406.
- Fernandez, P. M., S. R. Patierno et F. R. Rickles. 2004. «Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis». *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, vol. 30, no 1, p. 31-43.
- Fleck, R. A., L. V. Rao, S. I. Rappaport et N. Varki. 1990. «Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific antibodies, polyclonal anti-human tissue factor antibody». *Thrombosis Research*, vol. 59, no 2, 421-437.

- Folkman, J. 1971. «Tumor angiogenesis: therapeutic implications». *New England Journal of Medicine*, vol. 285, no 21, p. 1182-1186.
- Folkman, J., K. Watson, D. Ingber et D. Hanahan. 1989. «Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia». *Nature*, vol. 339, no 6219, p. 58-61.
- Folkman, J., et Y. Shing. 1992. «Angiogenesis». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no 16, p. 10931-1-934.
- Folkman, J. 1995. «Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease». *Nature Medicine*, vol. 1, no 1, p. 27-31.
- Folkman, J. 2003. «Fundamental concepts of the angiogenic process». *Current Molecular Medicine*, vol. 3, no 7, p. 643-651.
- Förster, Y., A. Meye, S. Albrecht, M. Kotzsch, S. Fussel, M. Wirth et B. Schwenzer. 2003. «Tissue specific expression and serum levels of human tissue factor in patients with urological cancer». *Cancer Letters*, vol. 193, no 1, p. 65-73.
- Furie, B., et B. C Furie. 1988. «The molecular basis of blood coagulation». *Cell*, vol. 53, no 4, p. 505-518.
- Gastl, G., T. Hermann, M. Steure, J. Zmija, E. Gunsilius, C. Unger et A. Kraft. 1997. «Angiogenesis as a target for tumor treatment». *Oncology*, vol. 54, no 3, p. 177-184.
- Genève, Organisation mondiale de la santé. 2005. *Rapport sur la santé dans le monde*. Genève: Les Presses IARC.
- Giensen, P. L., U. Rauch, B. Bohrmann, D. Kling, M. Roque, J. T. Fallon, J. J. Badimon, J. Himber, M. A. Riederer et Y. Nemerson. 1999. «Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no 5, p. 2311-2315.
- Gingras, D., et R. Béliveau. 1997. «L'angiogenèse tumorale: une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse». *Médecine/Science*, vol. 13, no 10, p. 1428-1435.
- Gingras, D., M. Pagé, B. Annabi et R. Béliveau. 2000. «Rapid activation of matrix metalloproteinase-2 by glioma cells occurs through a posttranslational MT1-MMP-dependent mechanism». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1497, no 3, p. 341-350.
- Gingras, D., N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M. P. Lachambre, B. Annabi, et R. Béliveau. 2001. «Activation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *FEBS Letters*, vol. 507, no 2, p. 231-236.

- Gordon, S. G. 1992. «Cancer cell procoagulants and their role in malignant disease». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 18, no 4, p. 424-433.
- Gorkun, O. V., Y. I. Veklich, L. V. Medved, A. H. Henschen et J. H. Weisel. 1994. «Role of α C domains of fibrin in clot formation». *Biochemistry*, vol. 33, no 22, p. 6986-6997.
- Grimstad, I. A., et H. Prydz. 1988. «Thromboplastin release, but not content, correlates with spontaneous metastasis of cancer cells». *International Journal of Cancer*, vol. 41, no 3, p. 427-431.
- Grunstein, J., W. G. Roberts, C. O. Mathieu, D. Hanahan et R. S. Johnson. 1999. «Tumor derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function». *Cancer Research*, vol. 59, no 7, p. 1592-1598.
- Hamada, K., J. Karatsu, Y. Saitoh, H. Takeshima, T. Nishi et Y. Ushio. 1996. «Expression of tissue factor in glioma». *Cancer*, vol. 77, no 2, p. 1877-1883.
- Hanahan, D., et R. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*, vol. 100, no 1, p. 57-70.
- Hanly, A. M., A. Hayanga, D. C. Winter et D. J. Bouchier-Hayes. 2005. «Thrombomodulin: tumor biology and prognostic implications». *Journal of Cancer Surgery*, vol. 31, no 3, p. 217-220.
- Hartzell, S., K. Ryder, A. Lanahan, L. F. Lau et D. Nathan. 1989. «A growth factor-responsive gene of murine BALB/c 3T3 cells encodes a protein homologous to human tissue factor». *Molecular Cell Biology*, vol. 9, no 6, p. 2567-2573.
- Hashizume, H., P. Baluk, S. Morikawa, J. W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R. K. Jain et D.M. McDonald. 2000. «Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness». *American Journal of Pathology*, vol. 156, no 4, p. 1363-1380.
- Hedstrom, L. 2002. «Serine protease mechanism and specificity». *Chemical Reviews*, vol. 102, no 12, p. 4501-4524.
- Heidenreich, A., A. J. Schradeder et Z. Varga. 2003. «Basic science and research in renal cell carcinoma: from workbench to bedside». *Current Opinion in Urology*, vol. 13, no 6 p. 457-462.
- Hemmerlein, B., U. Johanns, J. Halbfass, T. Bottcher, M. Heuser, H. J. Radzun et P. Thelen. 2004. «The balance between MMP-2/-9 and TIMP-1/-2 is shifted towards MMP in renal cell carcinomas and can be further disturbed by hydrogen peroxide». *International Journal of Oncology*. vol. 24, no 5, p. 1069-1074.

- Hezi-Yamit, A., P. Wong, N. Bien-Ly, L. Komuves, K. Prasad, D. Phillips et U. Sinha. 2005. «Synergistic induction of tissue factor by coagulation factor Xa and TNF: evidence for involvement of negative regulatory signaling cascades». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no 32, p. 12077-12082.
- Hjortoe, G. M., L. C. Peterson, T. Albrektsen, B. B. Sorenxen, P. L. Norby et S. K. Mandal. 2004. «Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration». *Blood*, vol. 103, no 8, p. 3029-3037.
- Hobbs, S. K., W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin et R. K. Jain. 1998. «Regulation of transport pathways in tumor vessels : role of tumor type and microenvironment». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no 8, p. 4607-4612.
- Hoffman, M. 2003. «A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa». *Blood Reviews*, vol. 17, no 1, p. 1-5.
- Hollenberg, M. D. 1999. «Protease-activated receptors: PAR-4 and counting: how long is the course? ». *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 20, no 7, p. 271-273.
- Hori, A., R. Sasada, E. Matsutani, K. Naito, Y. Sakura, T. Fujita et Y. Kozai. 1991. «Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor». *Cancer Research*, vol. 51, no 22, p. 6180-6184.
- Hu, T., R. R. Bach., W. H. Koningsberg et M. B. Tod. 1994. «Procoagulant activity in cancer cells is dependent on tissue factor expression». *Oncology Research.*, vol. 6, no 7, p. 321-327.
- Hung, D. T., Y. H. Wong, T. K. Vu et S. R. Coughlin. 1992. «The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenyl cyclase». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no 29, p. 20831-20834.
- Iakhiaev, A., U. R. Penurthis, J. Voigt, M. Ezban et L. V. M. Rao. 1999. «Catabolism of factor VIIa bound to tissue factor in fibroblasts in the presence and absence of tissue factor pathway inhibitor». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no 52, p. 36995-37003.
- Ishihara, H., A. J. Connolly, D. Zeng, M. L. Khan, Y. W. Zheng, C. Timmons, T. Tram et S. R. Coughlin. 1997. «Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans». *Nature*, vol. 386, no 6624, p. 502-506.

- Jiang, X., M. A. Bailly, T. S. Panetti, M. Cappello, W. H. Konigsberg et M. E. Bromberg. 2004. «Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells». *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 2, no 1, p. 93-101.
- Johnson, M. J, M. W. Sproule et J. Paul. 1999. «The prevalence of associated variables of deep venous thrombosis in patients with advanced cancer». *Clinical Oncology*, vol. 11, no 2, p. 105-110.
- Kandel, J., E. Bossy-Wetzel, F. Radvanyi, J. Folkman et D. Hanahan. 1991. «Neovascularisation is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma». *Cell*, vol. 66, no 6, p. 1095-1104.
- Kahn M. L., Y. W. Zheng, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R. V. Farese, C. Tam et S. R. Coughlin. 1998. «A dual thrombin receptor system for platelet activation». *Nature*, vol. 394, no 6694, p. 690-694.
- Kataoka, H., J. R. Hamilton, D. D. McKeney, E. Camerer, Y.-W. Zheng, A. Cheng, C. Griffin et S. R. Coughlin. 2003. «Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells». *Blood*, vol. 102, no 9, p. 3224-3231.
- Kaufmann R., U. Junker, K. Nuske, M. Westermann, P. Henklein, J. Scheel et K. Junker. 2002a. «PAR-1 and PAR-3-type thrombin receptor expression in primary cultures of human renal cell carcinoma cells». *International Journal of Oncology*, vol. 20, no 2, p. 177-180.
- Kaufmann R., U. Junker, K. Junker, K. Nuske, C. Ranke, M. Zieger et J. Scheele. 2002b. «The serine proteinase thrombin promotes migration of human renal carcinoma cells by a PKA-dependent mechanism». *Cancer Letters*, vol. 180, no 2, p. 183-190.
- Kawabata, A., R. Kuroda, H. Nishikawa, et K. Kawai. 1999. «Modulation by protease activated receptors of the rat duodenal motility *in vitro*: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation». *British Journal of Pharmacology*, vol. 128, no 4, p. 865-872.
- Kawabata, A., et R. Kuroda. 2000. «Protease-activated receptor (PAR), a novel family of G protein-coupled seven trans-membrane domain receptors: activation mechanisms and physiological roles». *Japanese Journal of Pharmacology*, vol. 82, no 3, p. 171-174.
- Kedar, D., C. H. Kedar, J. J. Killion, C. P. Dinney et I. J. Fidler. 2002. «Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling inhibits angiogenesis leading to regression of human renal cell carcinoma growing orthotopically in nude mice». *Clinical Cancer Research*, vol. 8, no 11, p. 3592-3600.

- Kitagawa, Y., K. Kunimi, T. Uchibayashi, H. Sato et M. Namiki. 1999. «Expression of messenger RNAs for membrane-type 1, 2 and 3 matrix metalloproteinase in human renal cell carcinoma». *Journal of Urology*, vol. 162, no 3, p. 905-909.
- Kong, W., K. McConalogue, L. M. Khittin, M. D. Hollenberg, D. G. Payan, S. K. Bohm et N. W. Bunnett. 1997. «Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no 16, p. 8884-8889.
- Koomagi, R., et M. Volm. 1998. «Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis». *International Journal of Cancer*, vol. 79, no 1, p. 19-22.
- Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Béliveau. 2004. «Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveoline-1 induces its association with membrane type 1-matrix metalloproteinase». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no 50, p. 52132-52140.
- Langlois, S., D. Gingras et R. Béliveau. 2004. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation». *Blood*, vol. 103, no 103, p. 3020-3028.
- Langlois, S., G. Di Tomasso, D. Boivin, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Béliveau. 2005. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism». *Experimental Cell Research*, vol. 307, no 2, p. 452-464.
- Lewin, B. 1999. *Gènes VI*. Trad. de l'anglais par Chrystelle Sanlaville. Paris: De Boeck Université, 1268 p.
- Liotta, L. A., P. S. Steeg et W. G. Stetler-Stevenson. 1991. «Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation». *Cell*, vol. 64, no 2, p. 327-336.
- Lorand, L. 1972. «Fibrinolyse: the fibrin-stabilizing factor system of blood plasma». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 202, p. 6-30.
- Luther, T. et N. Mackman. 2001. «Tissue factor in the heart: multiple role in hemostasis, thrombosis and inflammation». *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 11, no 8, p. 307-312.
- Lwaleed, B. A., et A. J. Cooper. 2000. «Tissue factor expression and multidrug resistance in cancer: two aspects of common cellular response to a hostile milieu?». *Medical Hypotheses*, vol. 55, no 6, p. 470-473.

- Lwaleed, B. A. 2002. «The clinical value of measuring tissue factor activity in patients with cancer». *Medical Hypotheses*, vol. 58, no 6, p. 521-522.
- Lykke, J., et H. J. Nielson. 2003. «The role of tissue factor in colorectal cancer». *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 29, no 5, p. 417-422.
- Mackman, N., M. S. Sawdey, M. R. Keaton et D. J. Loskutoff. 1993. «Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide». *American Journal of Pathology*, vol. 143, no 1, p. 76-84.
- Mann, K. G. 1984. «Membrane-bound enzyme complexes in blood coagulation». *Progress in Hemostasis and Thrombosis*, vol. 7, p. 1-23.
- Maratsuka, K., K. Hatakeyama, Y. Sato, A. Yamashita, A. Sumiyoshi et Y. Asada. 2002. «Protease-activated receptor 2 (PAR-2) mediates vascular smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex». *Thrombosis Research*, vol. 107, no 5, p. 271-276.
- Marieb, E. N. 1993. *Anatomie et physiologie humaines*. Trad. de l'anglais par J.-P. Artigau, S. Chapleau, M.-C. Désorcy et J.-L. Riendeau. Montréal: Renouveau pédagogique, 1014 p.
- Matsumura, T., K. Wolff et P. Petzelbauer. 1997. «Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin». *The Journal of Immunology*, vol. 158, no 7, p. 3408-3416.
- Maynard, J. R., D. J. Fintel, F. A. Pitlick et Y. Nemerson. 1976. «Tissue factor in cultured cells: pharmacologic effects». *Laboratory Investigation*, vol. 35, no 6, p. 550-557.
- McCallum, C. D., B. Su, P. F. Neuenschwander, J. H. Morrissey et A. E. Johnson. 1997. «Tissue factor positions and maintains the FVIIa active site far above the membrane surface even in the absence of the VIIa Gla domain, A fluorescence resonance energy transfer study». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no 48, p. 30160-30166.
- McCallum, C. D., R. C. Hapak, P. F. Neuenschwander, J. H. Morrissey et A. E. Johnson. 1996. «Tissue location of the active site of blood coagulation factor VIIa above the membrane surface and its reorientation upon association with tissue factor. A fluorescence energy transfer study». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no 45, p. 28168-28175.
- McNamara, C. A., I. J. Sarembock, L. W. Gimple, J. W. Fenton II, S. R. Coughlin et G. K. Owens. 1993. «Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by proteolytic activated receptor». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 91, no 1, p. 94-98.

- Mechtcheriakova, D., A. Wlackos, H. Holzmuller, B. R. Binder et E. Hofer. 1999. «Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1». *Blood*, vol. 93, no 11, p. 3811-3823.
- Mehta, D., M. Konstantoulaki, G. U. Ahmmed et A. B. Malik. 2005. «Sphingosine 1-phosphate-induced mobilization of intracellular Ca^{2+} mediates Rac activation and adherens junction assembly in endothelial cells». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no 17, p. 17320-17328.
- Merseburger, A. S., J. Hennenlotter, P. Simon, S. Kruch, E. Koch, M. Horstmann, U. Kuehs, R. Kufer, A. Stenzl et M. A. Kuczyk. 2005. «Membranous expression and prognostic implications of epidermal growth factor receptor protein in human renal cell cancer». *Anticancer Research*, vol. 25, no 3B, p. 1901-1907.
- Morrissey, J. H., H. Fakhrai et T. S. Edgington. 2004. «Tissue factor (patho)physiology and cellular biology». *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 15, no 7, p. 521-538.
- Mueller, B. M., R. A. Reisfeld, T. S. Edgington et W. Ruf. 1992. «Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no 24, p. 11832-11836.
- Mueller, B. M., et W. Ruf. 1998. «Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor dependent experimental metastasis». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 101, no 7, p. 1372-1378.
- Mulder, A. B., J. W. Smit, V. J. J. Bom, N. R. Blom, M. H. J. Ruiters, M. R. Halie et J. van der Meer. 1996. «Association of smooth muscle cell tissue factor with caveolae». *Blood*, vol. 88, no 4, p. 1306-1313.
- Nagy, J. A., L. F. Brown, D. R. Senger, N. Lanir, L. van de Water, A. M. Dvorak et H. F. Dvorak. 1989. «Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition». *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 948, no 3, p. 305-326.
- Nakagaki, T., D. C. Foster, K. L. Berkner et W. Kisiel. 1991. «Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII». *Biochemistry*, vol. 30, no 45, p. 10819-10824.
- Nakagawa, K., Y. Zhang, H. Tsuji, M. Yoshizumi, T. Kasahara, H. Nishimura, P. P. Nawroth et M. Nakagawa. 1998. «The angiogenic effect of tissue factor on tumors and wounds». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 24, no 3, p. 207-210.
- Nakasaki, T., H. Wada, C. Shigemori, C. Miki, E. C. Gabazza, T. Mobiri, S. Nakamura et H. Shiku. 2002. «Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer». *American Journal of Hematology*, vol. 69, no 4, p. 247-254.

- Nash, G. F., D. C. Walsh et A. K. Kakkar. 2001. «The role of the coagulation system in tumor angiogenesis». *Lancet Oncology*, vol. 2, no 10, p. 608-613.
- Nawroth, P., D. Stern, W. Kiesel et R. Bach. 1985. «Cellular requirements for tissue factor generation by bovine aortic endothelial cells in culture». *Thrombosis Research.*, vol. 40, no 5, p. 677-91.
- Nemerson, Y. 1968. «The phospholipids requirement of tissue factor in blood coagulation». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 47, no 3, p. 72-80.
- Nemerson, Y. 1992. «The tissue factor pathway of blood coagulation». *Seminars in Hematology*, vol. 29, no 3, p. 170-176.
- Nemerson, Y., et P. Giesen. 1998. «Some thoughts about localization and expression of tissue factor». *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 9, no S1, p. S45-S47.
- Neuenschwander, P. F., et J. H. Morrissey. 1994. «Roles of membrane-interactive regions of factor VIIa and tissue factor. The FVIIa Gla domain is indispensable for binding to tissue factor but important for activation of FX». 1994. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no 11, p. 8007-8013.
- Nystedt S., K. Emilsson, C. Wahlestedt et J. Sundelin. 1994. «Molecular cloning of a potential protease activated receptor». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no 20, p. 9208-9212.
- Nystedt S., A. K. Larsson, H. Aberg et J. Sundelin. 1995. «The mouse proteinase receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no 11, p. 5950-5955.
- Offermanns, S., C. F. Toombs, Y. H. Yu et M. I. Simon. 1997a. «Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice». *Nature*, vol. 389, no 6647, p. 183-186.
- Offermanns, S., V. Mancino, J. P. Revel et M. I. Simon. 1997b. «Vascular system defect and impaired cell chemokinesis as a result of G-alpha₁₃ deficiency». *Science*, vol. 275, no.5299, p. 533-536
- Ollivier, V., S. Bentolila, J. Chabbat, J. Hakim et D. de Prost. 1998. «Tissue factor-dependent vascular endothelial growth factor production by human fibroblasts in response to activated factor VII». *Blood*, vol. 91, no 8, p. 2698-2703.
- Ollivier, V., J. Chabbat, J. M. Hebert, J. Hakim et D. de Prost. 2000. «Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to FVIIa binding to tissue factor involves thrombin and FXa». *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 20, no. 5, p. 1374-1381.

- Ossovsckaya, V. S., et N. W. Bunnett. 2003. «Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease». *Physiological Reviews* vol. 84, no 67, p. 579-621.
- Ott, I., E. G. Fischer, Y. Minagi, B. M. Mueller et W. Ruf. 1998. «A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin binding protein 280». *Journal of Cell Biology*, vol. 140, no 5, p. 1241-1253.
- Paik, J. H., S.-S. Chae, M.-J. Lee, S. Thangada et T. Hla. 2001. «Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of $\alpha_v\beta_3$ - and β_1 -containing integrins». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no 15, p. 11830-11837.
- Parry, G. C. N., et N. Mackman. 1995. «Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells». *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 15, no 5, p. 612-621.
- Paule, B., et Brion, N. 2003. «EGF receptors in urological cancer. Molecular basis and therapeutic involvements». *Annales de Médecine Interne (Paris)*, vol. 154, no 7, p. 448-456.
- Pawlinski, R., B. Pedersen, J. Erlich et N. Mackman. 2004. «Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice». *Thrombosis Haemostasis*, vol. 92, no 3, p. 444-450.
- Pelmont, J. 1995. *Enzymes: Catalyseurs du monde vivant*. France: Presses Universitaires de Grenoble, 1039 p.
- Pendurthi, U. R., D. A. Alok et L. V. M. Rao. 1997. «Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells: up-regulation of poly(A) polymerase». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no 23, p. 12598-12603.
- Pepper, M. S., N. Ferrera, L. Orci et R. Montesano. 1992. «Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 189, no 2, p. 824-831.
- Pepper, M. S. 2001. «Extracellular proteolysis and angiogenesis». *Thrombosis Haemostasis*, vol. 86, no 1, p. 346-355.
- Petersen, L. C., O. Thastrup, G. Hagel, B. B. Sorensen, P.-O. Freskgard, L. V. M. Rao et M. Ezbam. 2000. «Exclusion of known protease activated receptors in factor VIIa-induced signal transduction». *Thrombosis Haemostasis*, vol. 83, no 4, p. 571-576.

- Petersen, L. C., P. L. Norby, S. Branner, B. B. Sorensen, T. Elm, R. Stennicke, E. Persson et S. E. Bjorn. 2005. «Characterization of recombinant murine factor VIIa and recombinant murine tissue factor: a human-murine species compatibility study». *Thrombosis Research*, vol. 116, no 1, p. 75-85.
- Pirie-Shepherd, S. 2003. «Regulation of angiogenesis by the hemostatic system». *Frontiers in Bioscience*, vol. 8, p. d286-d293.
- Poulsen, L. K., N. Jacobsen, B. B. Sorensen, N. C. H. Bergenheim, J. D. Kelly, D. C. Foster, O. Thastrup, M. Ezban et L. C. Petersen. 1998. «Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no 11, p. 6228-6232.
- Randolph, G. J., T. Luther, S. Albrecht, V. Magdoken et W. A. Mueller. 1998. «Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to trafficking through endothelium *in vitro*». *Blood*, vol. 92, no 11, p. 4167-4177.
- Rao, L., et U. Pendurthi. 1998. «Tissue factor on cells». *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 9, p. S27-S35.
- Rasmussen, U. B., V. Vouret-Craviari, S. Jallat, Y. Scjlesinger, G. Pages, A. Pavirani, J. P. Lecqoc, J. Pouysegur et E. Van-Obberghen-Schilling. 1991. «cDNA cloning and expression of hamster α -thrombin receptor coupled to Ca^{2+} mobilization». *FEBS Letters*, vol. 288, no 1-2, p. 23-28.
- Rickles, F. R., et R. L. Edwards. 1983. «Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited». *Blood*, vol. 62, no 1, p. 14-31.
- Rickles, F. R., et M. N. Levine. 1998. «Venous thromboembolism in malignancy and malignancy in thromboembolism». *Haemostasis*, vol. 28, no. 3, p. 43-49.
- Rickles, F. R., S. Patierno, P. Fernandez. 2003. «Tissue factor, thrombin, and cancer». *CHEST*, vol. 124, no 3, p. 58S-68S.
- Roitt, I., J. Brostoff et D. Male. 1997. *Immunologie*. Trad. de l'anglais par J.-P. Revillard et W. H. Fridman. Paris: De Boeck Université, 406 p.
- Rosen, E. D., J. C. Y. Chang, E. Idusogie, F. Clotman, G. Vlasuk, T. Luther, L. R. Jalbert, S. Albrecht, L. Zhong, A. Lissens, L. Schoonjans, L. Moons, D. Collen, F. J. Castellino et P. Carmeliet. 1997. «Mice lacking FVII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding». *Nature*, vol. 390, no 6657, p. 290-294.
- Rottingen, J., T. Enden, E. Camerer, J. Iversen et H. Prydz. 1995. «Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca^{2+} signals in J82 cells, transfected Cos-1 cells, Mandin Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no 9, p. 4650-4660.

- Rubinfeld, H., R. Seger. 2005. «The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling». *Molecular Biotechnology*, vol. 31, no 2, p. 151-174.
- Ruf, W., A. Rehemtulla et T. S. Edgington. 1992. «Tissue factor residues 157-167 are required for efficient proteolytic activation of factor X and factor VIIa». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 31, p. 22206-22210.
- Ruf, W. et T. S. Edgington. 1994. «Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo». *FASEB Journal*, vol. 8, no 6, p. 385-390.
- Ruf, W. et B. M. Muller. 1996. «Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis». *Current Opinion in Hematology*, vol. 3, no 5, p. 379-384.
- Ruf W., et Mueller B. M. 1999. «Tissue factor signaling». *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 82, no 2, p. 175-182.
- Ruf, W. 2001. «Molecular regulation of blood clotting in tumor biology ». *Haemostasis*, vol. 31, p. 5-7.
- Ruf, W. 2003. «Tissue-factor dependent signaling in tumor biology». *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, vol. 33, no Supp 1 1, p. 28-30.
- Sahni, A., C. A. Baker, L. A. Sporn et C. W. Francis. 2000. «Fibrinogen and fibrin protect fibroblast growth factor-2 from proteolytic degradation». *Thrombosis Haemostasis*, vol. 83, no 5, p. 736-741.
- Santulli, R. J., C. K. Derian, A. L. Darrow, K. A. Tomko, A. J. Eckardt, M. Seiberg, R. M. Scarborough et P. Andrade-Gordon. 1995. «Evidence of the presence of protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 5, p. 9151-9155.
- Sato, Y., K. Marutsuka, K. Hatakeyama, Y. Kamikubo et A. Sumiyoshi. 1997. «Tissue factor pathway inhibitor inhibits aortic smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex». *Thrombosis Haemostasis*, vol. 78, no 3, p. 1138-1141.
- Scheraga, H. A. 2004. «The thrombin-fibrinogen interaction». *Biophysical Chemistry*, vol. 112, no 2-3, p. 117-130.
- Schirmacher, V. 1985. «Experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies». *Advanced Cancer Research*, vol. 43, no 23, p. 1-32.
- Schmidt, V. A, W. C. Nierman, D. R. Maglott, L. D. Cupit., J. A Wainer et W. F. Bahou. 1998. «The human proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) gene. Identification within a PAR gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelets». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no 24, p. 15061-15068.

- Semmaro, N. et M. Colucci. 1997. «Tissue factor in health and in disease». *Thrombosis Haemostasis*, vol. 78, no 1, p. 759-764.
- Seto, S., H. Onodera, T. Kaido, A. Yoshikawa, S. Ishigamu, S. Ari et M. Imamura. 2000. «Tissue Factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis». *Cancer*, vol. 88, no. 2, p. 295-301.
- Sevinsky, J. R., J. V. M Rao et W. Ruf. 1996. «Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway». *Journal of Cell Biology*, vol. 133, no 2 p. 293-304.
- Shi, J.-S., et S. N. Abraham. 2001. «Caveolae-not just craters in the cellular landscape». *Science*, vol. 293, p. 1447-1448.
- Shi, W., et Siemman, D. W. 2002. «Inhibition of renal cell carcinoma angiogenesis and growth by antisens oligonucleotides targeting vascular endothelial growth factor». *British Journal of Cancer*, vol. 87, p. 119-26.
- Shu, X., Wu, W., Mosteller, R. D. et Broek D. 2002. «Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras mitogen-activated protein kinases». *Molecular and Cell Biology*, vol. 22, no. 22, p. 7758-7768.
- Sorensen, B. B., P. O. Freskgard, L. S. Nielsen, L. V. Rao, M. Ebzan et L. C. Peterson. 1999. «Factor VIIa-induced p44/p42 mitogen activated protein kinase activation requires the proteolytic activity of FVIIa and is independent of the tissue factor cytoplasmic domain». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no 30, p. 21349-21354.
- Sorensen, B. B., L. V. Rao, D. Tornehave, S. Gammeltoft et L. C. Peterson. 2003. «Anti-apoptotic effect of coagulation factor VIIa». *Blood*, vol. 102, no. 5, p. 1708-1715.
- Spicer, E. K., R. Horton, R. Bach, K. R. Williams, A. Guha, J. Kraus, T. C. Lin, Y. Nemerson et W. H. Konigsberg. 1987. « Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no 15, p. 5148-5152.
- Stadeven, K. F., R. A. S. Ariëns et P. J. Grant. 2005. «The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function». *Blood Reviews*, vol. 19, no 5, p. 275-288.
- Staton, C. A., N. J. Brown et C. E. Lewis. 2003. «The role of fibrinogen and related fragments in tumor angiogenesis and metastasis». *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 3, no 7, p. 1105-1120.
- Tallman, M. S., H. C. Kwan, D. Hakimian et F. R. Rickles. 1993. «New insights into the pathogenesis of coagulation dysfunction in acute promyelocytic leukemia». *Leukemia and Lymphoma*, vol. 11, no 1-2, p. 27-36.

- Taylor, F. B., A. C. Chang, G. Peer, A. Li, M. Ezban et U. Hebner. 1998. «Active site inhibited VIIa (DEGR) attenuates the IL-6 and -8 but not tumor necrosis factor, responses of the baboon to LD100 *Escherichia coli*». *Blood*, vol. 91, no 5, p. 1609-1615.
- Tonini, T., F. Rossi et P. Claudio. 1991. «Molecular basis of angiogenesis and cancer». *Oncogene*, vol. 22, no 42, p. 6549-6556.
- Toomey, J. R., K. J. Smith et D. W. Stafford. 1991. «Localization of the human tissue factor recognition determinant of human factor VIIa». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no 29, p. 19198-19202.
- Toomey, J. R., K. E. Kratzer, N. M. Lasky, J. J. Stanton et G. J. Broze Jr. 1996. «Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality». *Blood*, vol. 88, no 5, p. 1583-1587.
- Trousseau, A. 1865. *Clinique médicale de l'hôtel-Dieu de Paris*, Paris: Ballière et fils, 712 p.
- Turcotte, S., R. Desrosier et R. Béliveau. 2004. «Hypoxia upregulates von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein through RhoA-dependent activity in renal cell carcinoma». *American Journal of Renal Physiology*, vol. 286, no 2, p. F338-F348.
- Turcotte, S., R. Desrosier, G. Brand et R. Béliveau. 2004. «Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein stimulation by thrombin involves RhoA activation». *International Journal of Cancer*, vol. 112, no 5, p. 777-786.
- Ubl, J. J., C. Vohringer et G. Reiser. 1998. «Co-existence of two types of $[Ca^{2+}]_i$ inducing protease-activated receptors (PAR-1 and PAR-2) in rat astrocytes and C6 glioma cell». *Neuroscience*, vol. 86, no 2, p. 319-330.
- Vailhé, B., D. Vittet et J.-J. Feige. 2001. «In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis». *Laboratory Investigation*, vol. 81, no 4, p. 439-452.
- Van Hinsberg, V. W. M., A. Collen et P. Koolwijk. 2001. «Role of fibrin in angiogenesis». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 936, p. 426-437.
- Versteeg, H. H., I. Hoedemaeker, S. H. Diks, J. C. Stam, M. Spaargaren, P. M. P. Bergen en Henegouwen, S. J. H. Deventer, M. P. Peppelenbosch. 2000. «Factor VIIa/tissue factor-induced signaling via activation of Src-like kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no 37, p. 28750-28756.
- Versteeg, H. H., M. P. Peppelenbosch et C. A. Spek. 2003. «Tissue factor signaling transduction in angiogenesis». *Carcinogenesis*, vol. 24, no 6, p. 1009-1013.

- Versteeg, H. H., C. A. Spek, M. P. Peppelenbosch et D. Richel. 2004. «Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways». *Molecular Medicine*, vol. 10, no 1-6, p. 6-11.
- Voet, D., et J. G. Voet. 2002. *Biochimie*. Trad. de l'anglais par Y. Gaudemer. Paris: De Boeck Université, 1361 p.
- Vouret-Craviari, V., E. Van Obberghen-Schilling, U. B. Rasmussen, A. Pavirani, J. P. Lecocq et J. Pouyssegur. 1992. «Synthetic alpha thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis». *Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 1, p. 95-102.
- Vouret-Craviari, V., P. Boquet, J. Pouyssegur et E. V. Oberghen-Schilling. 1998. «Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function». *Molecular Biology of the Cell*, vol. 9, no. 9, p. 2639-2653.
- Vrana, J. A., M. T. Stang, J. P. Grade et M. J. Getz. 1996. «Expression of tissue factor in tumors stroma correlates with progression to human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell mediated members of the transforming growth factor beta family». *Cancer Research*, vol. 56, no 21, p. 5063-5070.
- Vu, T. K., D. T Hung, V. I Wheaton et S. R. Coughling. 1991. «Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation». *Cell*, vol. 64, no 6, p. 1057-1068.
- Walker, T. R., S. M. Moore, M. F. Lawson, R. A. Panettieri Jr. et E. R. Chilvers. 1999. «Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B; role in mediating airway smooth muscle proliferation». *Molecular Pharmacology*, vol. 54, no 6, p. 1007-1015.
- Wang, F., J. R. Brocklyn, J. O. Hobson, S. Movafagh, Z. Zukowska-Grojec, S. Milstien et S. Spiegel. 1999. «Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G_i-coupled cell surface receptor». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no 50, p. 35 343-35 350.
- Wang, X., M. Wang, M. Amarzguioui, F. Liu, O. Fodstad et H. Prygz. 2004. «Downregulation of tissue factor by RNA interference in human melanoma LOX-L cells reduces pulmonary metastasis in nude mice». *International Journal of Cancer*, vol. 112, no 6, p. 994- 1002.
- Waxman, E., W. R. Laws, T. M. Laue, Y. Nemerson et J. B. Ross. 1993. «Human factor VIIa and its complex with soluble tissue factor: evaluation of asymmetric and conformational dynamics by ultracentrifugation and fluorescence anisotropy decay methods». *Biochemistry*, vol. 32, no 12, p. 3005-3012.

- Weisel, J. W., Y. I. Veklich et O. V. Gorkun. 1993. «The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots». *Journal of Molecular Biology*, vol. 232, no 1, p. 285-297.
- Weisel, J. W., et L. Medved. 2001. «The structure and function of the alpha C domains of fibrinogen». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 936, p. 312-327.
- Wiiger, M. T., et H. Prydz. 2004. «The epidermal growth factor receptor (EGFR) and proline rich tyrosine kinase 2 (PYK2) are involved in tissue factor dependent factor VIIa signaling in HaCaT cells». *Thrombosis Haemostasis*, vol. 92, no 1, p. 13-22.
- Wolberg, A., D. Monroe, H. Roberts et M. Hoffman. 1999. «Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms». *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 10, no 4, p. 201-210.
- Wojtukiewicz, M. Z., L. R. Zacharski, V. A. Memoli, W. Kisiel, B. J. Kudryk, S. M. Rousseau et D. C. Stump. 1990. «Fibrinogen-fibrin transformation in situ renal cell carcinoma ». *Anticancer Research*, vol. 10, no 3, p. 579-582.
- Wu, S., et Aird, W. 2005. «Thrombin, TNF- α and LPS exert overlapping but non-identical effects on gene expression in endothelial cell and vascular smooth muscle cells». *Heart and Circulatory Physiology*, vol. 289, no 2, p. H873-H885.
- Xu, W.-F., H. Andersen, T. E. Whitmore, S. R. Presnell, D. P. Yee, A. Ching, T. Gilbert, E. W. Davie et D. C. Foster. 1998. «Cloning and characterization of protease-activated receptor 4». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no 12, p. 6642-6646.
- Yu, Z., S. Ahmad, J. L. Schwartz, D. Banville et S. H. Shen. 1997. «Protein-tyrosine phosphatase SHP2 is positively linked to proteinase-activated receptor 2-mediated mitogenic pathway». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no 11, p. 7519-7524.
- Zacharski, L. R., V. A. Memoli et S. M. Rousseau. 1986. «Coagulation cancer interaction in situ in renal cell carcinoma». *Blood*, vol. 68, no 2, p. 394-399.
- Zhang, Y., Y. Deng, T. Luther, M. Muller, R. Ziegler, R. Waldherr, D. M. Stern et P. P. Nawroth. 1994. «Tissue factor controls the balance of angiogenic and anti-angiogenic properties of tumor cells in mice». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 94, no. 7, p. 1320-1327.
- Zhang, Y., Y. Deng, J. Lin, B. Liliensiek, J. Greten, A. Bierhaus, B. Chen, M. She, S. Bachmann, D. Mannel, R. Waldherr, R. Ziegler, D. Stern et P. P. Nawroth. 1995. «Tissue factor controls the balance of angiogenic and anti-angiogenic properties of tumor cells in mice». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 94, no 3, p. 1320-1327.

Zhang, E., R. St-Charles et A. Tulinsky. 1999. «Structure of extracellular tissue factor complexed with factor VIIa inhibited with BPTI mutant». *Journal of Molecular Biology*, vol. 285, no 5, p. 2089-2184.