

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DES FACTEURS DE CROISSANCE PLAQUETTAIRES DANS LES  
COMPARTIMENTS VASCULAIRES ET TUMORAUX CÉRÉBRAUX

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR  
JINANE DOUMIT

JANVIER 2011

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 no 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

À tout seigneur, tout honneur. Il me faut tout d'abord remercier le Dr Richard Béliveau, dont l'inépuisable énergie et l'incorrigible optimisme sont l'âme de ce laboratoire. Merci et encore merci de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Médecine Moléculaire.

Je tiens surtout à remercier sincèrement le Dr Borhane Annabi pour son encadrement constant, pour sa disponibilité, sa patience et son expertise scientifique.

J'adresse mes remerciements à Yanick Bertrand pour son encadrement lors de ma première année.

En ce qui concerne le présent travail, je suis reconnaissante à mes membres du jury pour avoir bien voulu lire patiemment ce travail et me faire part de leurs commentaires, critiques et suggestions.

Je remercie aussi Julie Poirier, Simon Lord-Dufour et Jean-Christophe Currie pour toute l'aide technique qu'ils m'ont apportée mais aussi pour leur agréable présence.

Sans oublier mes collègues Asmaa Sina, Karine Plouffe, Nancy Berger-Thibault, Nicolas Fontaine et Elizabeth Tahanian : merci pour les bons moments passés ensemble.

Un mot à ma mère, mon père, mon frère et mon fiancé: j'espère vous avoir toujours aussi présents à mes côtés. Je vous aime fort, merci.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	viii
RÉSUMÉ.....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 LE CANCER.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 La carcinogenèse.....	2
1.2 L'ANGIOGENÈSE TUMORALE.....	3
1.2.1 Définition.....	3
1.2.2 Étapes de l'angiogenèse tumorale dans l'endothélium vasculaire tumoral.....	4
1.2.3 Hypoxie : stimulante de l'angiogenèse.....	5
1.2.4 Hémostase .....	6
1.2.5 Facteurs plaquettaires et leurs implications physiopathologiques dans le cancer ..	8
1.3 RÉCEPTEURS/RÉGULATEURS DE LA PROGRESSION TUMORALE .....	11
1.3.1 LPAR : définition .....	11
1.3.2 LRP : rôles dans la progression tumorale.....	13
1.4 LES CELLULES SOUCHES CANCÉREUSES (CSC) .....	15
1.4.1 Définition .....	15
1.4.2 La résistance aux agents thérapeutiques.....	17
1.4.3 CD133 : marqueur de surface des CSC.....	18
1.5 MODÈLES CELLULAIRES EXPÉRIMENTAUX .....	20
1.5.1 HBMEC.....	20
1.5.2 DAOY parentales et DAOY CD133(+) .....	20
1.6 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE .....	21
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	32
2.1 MATÉRIEL.....	32
2.2 MÉTHODES .....	32

2.2.1 Culture cellulaire .....	32
2.2.2 Migration cellulaire .....	33
2.2.3 Lyse cellulaire .....	34
2.2.4 Dosage des protéines selon la méthode du microBCA.....	34
2.2.5 Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage..	35
2.2.6 Immunodétection des protéines.....	35
2.2.7 Extraction de l'ARN total .....	36
2.2.8 RT-PCR semi-quantitative .....	36
2.2.9 PCR quantitative en temps réel .....	36
2.2.10 Transfection.....	37
2.2.11 Enrichissement des cellules CD133(+) par tri cellulaire magnétique sur colonne MACS.....	38
2.2.12 Cytométrie de flux.....	38
CHAPITRE III	
RÉSULTATS .....	40
3.1 RÉPONSE AUX FACTEURS PLAQUETTAIRES DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES CÉRÉBRALES.....	40
3.1.1 Comparaison du comportement migratoire avec le SIP et le LPA .....	40
3.1.2 Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases avec le LPA.....	40
3.1.3 Comparaison du comportement migratoire stimulé au LPA en normoxie et en hypoxie .....	41
3.2 ÉTUDE DES RÉCEPTEURS DU FACTEUR PLAQUETTAIRE LPA DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES CÉRÉBRALES .....	41
3.2.1 Comparaison du profil d'expression génique des récepteurs au LPA en normoxie et en hypoxie .....	41
3.2.2 Validation des ARN interférents si-LPAR-1 et si-LPAR-3 .....	42
3.2.3 Effet de l'invalidation des récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 sur la migration cellulaire.....	42
3.3 RÉPONSE AUX FACTEURS PLAQUETTAIRES DES CELLULES DÉRIVÉES DE MÉDULLOBLASTOME DAOY .....	43

3.3.1 Comparaison du comportement migratoire des DAOY CD133(-) et DAOY CD133(+) en présence de LPA et de S1P .....	43
3.3.2 Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases avec le LPA dans les DAOY CD133(-) et les DAOY CD133(+) .....	43
3.3.3 Expression génique des récepteurs au LPA dans les cellules DAOY CD133(+). ....	44
3.3.4 Effet de la déprivation de sérum sur le profil d'expression génique des LRP dans les DAOY de médulloblastome .....	44
3.3.5 Effet de la déprivation de sérum sur l'expression protéique de LRP-1 et de CD133 dans les DAOY .....	45
3.3.6 Surexpression génique des récepteurs LRP régulateur de facteurs plaquettaires dans les DAOY CD133(+) .....	46
CHAPITRE IV	
DISCUSSION .....	60
4.1 RÉPONSE TUMORALE : EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES LPAR .....	60
4.1.1 Environnement hypoxique : surexpression génique des LPAR-1 et 3 dans le modèle cellulaire endothélial tumoral vasculaire .....	60
4.1.2 Surexpression génique des LPAR-2 et 4 dans le modèle cellulaire cérébral de résistance tumoral .....	62
4.2 RÉPONSE TUMORALE : EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES LRP .....	64
4.2.1 Réponse adaptative au sevrage: surexpression protéique de CD133 et de LRP-1 dans les médulloblastomes .....	64
4.2.2 Surexpression génique des LRP-1, LRP-1b et LRP- 5 dans les DAOY sevrés et dans les DAOY CD133(+) .....	65
CHAPITRE V	
CONCLUSION .....	67

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Les six altérations du cancer .....	23
Figure 1.2 : L'évolution du cancer .....	24
Figure 1.3 : La balance angiogénique.....	25
Figure 1.4 : Le processus de l'angiogenèse.....	26
Figure 1.5 : Régulation par HIF-1 $\alpha$ de gènes induits en hypoxie.....	27
Figure 1.6 : L'hémostase .....	28
Figure 1.7 : Vue générale des voies de régulation signalétique de la SIP et du LPA .....	29
Figure 1.8 : Membres de la famille des récepteurs au LDL .....	30
Figure 1.9 : Implication de cellules souches et/ou progénitrices dans l'émergence de tumeurs cérébrales.....	31
Figure 3.1 : Effets du S1P et du LPA sur la migration des cellules endothéliales cérébrales ....	47
.....	
Figure 3.2 : Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules endothéliales par le LPA .....	48
Figure 3.3 : Effet de l'hypoxie sur la migration des cellules endothéliales cérébrales stimulées par le LPA .....	49
Figure 3.4 : L'hypoxie et son effet sur l'expression génique des récepteurs du LPA dans les cellules endothéliales cérébrales.....	50
Figure 3.5 : Validation de la transfection des si-LPAR-1 et si-LAPR-3 dans les cellules endothéliales cérébrales par PCR en temps réel.....	51
Figure 3.6 : Validation de l'implication des récepteurs LPAR1 et LPAR3 dans la migration des cellules HBMEC stimulées par le LPA en condition hypoxique .....	52
Figure 3.7 : Effets du S1P et du LPA sur la migration des DAOY CD133(-) et CD133(+)	53
Figure 3.8 : Cinétique différentielle de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules de médulloblastome DAOY CD133(-) et DAOY CD133(+)	55
Figure 3.9 : Modulation de l'expression génique des récepteurs du LPA dans les cellules de médulloblastome DAOY CD133(-) et CD133(+)	56
Figure 3.10 : Modulation de l'expression génique des récepteurs lipoprotéiques de basse densité (LRP) dans les cellules DAOY de médulloblastomes sevrées en <i>in vitro</i>	57

Figure 3.11 : Induction de l'expression protéique de LRP-1 et de CD133 par le sevrage .....	58
Figure 3.12 : Profil différentiel de l'expression génique des récepteurs LRP entre les cellules DAOY parentales et les DAOY enrichies en CD133 .....	59

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AKT	Protéine kinase B
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
APS	Persulfate d'ammonium
ATCC	American Tissue Culture Collection
BCA	Acide bicinchoninique
CE	Cellules endothéliales
CET	Cellules endothéliales tumorales
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CSC	Cellule souche cancéreuse
ECL	Signal de chimiluminescence
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
ERK	Kinase modulée par des signaux extracellulaires
FACS	Trieur de cellules par fluorescence
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
HBMEC	Cellules endothéliales cérébrales micro-vasculaires humaines
HIF-1	Facteur-1 induit par l'hypoxie
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LPA	Acide lysophosphatidique
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
MAPK	Protéine kinase activée par les agents mitogènes
MEC	Matrice extracellulaire
NP-40	Nonidet P-40
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PMSF	Fluorure d'alpha-phényl méthyl sulfonyle
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
qPCR	PCR en temps réel
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium

RT-PCR	Réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SiARN	Petit ARN interférent
S1P	Sphingosine 1-phosphate
SV-40LT	Antigène large T du virus simien 40
TBS	Tampons Tris salin
TBST	Tampons Tris salin contenant du tween-20
TEMED	N,N,N', N'-tétraméthylènediamine
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## RÉSUMÉ

Si certains cancers sont maintenant traités avec succès, la lutte à finir avec plusieurs autres tels les cancers cérébraux, passe impérativement par une meilleure connaissance des cellules constituant ces tumeurs et de ce qui les entoure. Les tumeurs cérébrales sont isolées du reste du corps par la barrière hémato-encéphalique, ce qui rend le traitement de ces dernières un défi de taille. Cibler le microenvironnement dans lequel évoluent ces tumeurs est un nouveau moyen d'augmenter peut être l'efficacité des thérapies anticancéreuses. En effet, les cellules endothéliales tumorales (CET) sont connues pour avoir un phénotype distinct des CE normales. Ces CE peuvent donc être une cible potentielle supplémentaire pour l'inhibition sélective de la croissance tumorale. En même temps, les tumeurs semblent être dirigées et initiées par une sous-population de cellules au sein de la tumeur, les cellules souches cancéreuses (CSC). Le concept des CSC a pris de l'envergure ces trois dernières années et la recherche de caractéristiques intrinsèques particulières des CSC semblerait un bon début pour l'avancement de l'oncologie. Une des signatures phénotypiques de plusieurs CSC est le marqueur CD133 ou Promininine-1. Comme les cellules cancéreuses ne sont pas la seule cible thérapeutique envisageable, les cellules endothéliales, composantes du milieu tumoral, ont servi de modèle pour l'étude de récepteurs aux facteurs plaquettaires. À l'aide de la lignée HBMEC (human brain microvascular endothelial cell), nous avons mis en évidence une migration préférentielle marquée des HBMEC en réponse à l'acide lysophosphatidique (LPA) comparativement à la sphingosine 1-phosphate (S1P), le LPA et la S1P étant deux facteurs plaquettaires. La voie des MAP (Mitogen-activated protein) kinases semble être une des voies activée chez les HBMEC stimulées au LPA. Nous avons démontré sous condition hypoxique, que cette migration était fortement inhibée (>50%) suite à l'invalidation de l'un ou l'autre des récepteurs au LPA, LPAR-1 ou LPAR-3, deux récepteurs qui s'exprimaient à la hausse suite à l'étude du profil génique des LPAR chez les HBMEC. Dans le but d'investiguer la réponse au LPA et à la S1P dans un modèle de résistance tumorale, une sous-population de cellules CD133(+) a été triée à partir de la lignée cellulaire de médulloblastome DAOY. Il a été observé que les cellules CD133(+) sont plus sensibles au LPA que les CD133(-), fait qui a été constaté via une réponse précoce et plus intense de l'activation de la voie des MAP kinases chez les cellules CD133(+) ainsi que par une surexpression des récepteurs au LPA, en particulier, LPAR-2 et LPAR-4 chez cette même sous-population. En plus, la résistance des cellules CD133(+) a été reliée à un phénotype d'expression différentielle des récepteurs lipoprotéiques de basse densité (LRP). En effet, la déprivation en nutriments régule à la hausse l'expression des récepteurs LRP-1, LRP-1b et LRP-5 ainsi que celle du marqueur CD133. En somme, nous proposons que les LPAR constituent une cible propice pour combattre le cancer, que ce soit au niveau du compartiment tumoral cérébral ou vasculaire cérébral. Nos résultats suggèrent aussi que les CSC s'adaptent entre autre par l'intermédiaire de récepteurs LRP, qui constituent une autre cible thérapeutique du compartiment tumoral cérébral.

Mots clés : cellule endothéliale, cellule souche cancéreuse, CD133, acide lysophosphatidique, récepteur au LPA, médulloblastome, low-density lipoprotein receptor-related protein

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Le cancer

##### 1.1.1 Généralités

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le cancer entraîne chaque année la mortalité de 7,6 millions de personnes dans le monde. Il y a 40 ans, le cancer était un fléau affectant essentiellement les pays développés. Cependant, les dernières données de l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC), confirment que la plupart des nouveaux cas de cancer et de décès se produisent dans les pays en développement. Publié le 1<sup>er</sup> juin, dans le CIRC de GLOBOCAN 2008 (The, 2010), une ressource en ligne qui fournit les estimations les plus exactes sur l'incidence du cancer, montre qu'en 2008, 53% des 12.7 millions de nouveaux cas de cancer et 63% des 7.6 millions de décès causés par le cancer dans le monde, se sont produits dans les pays en développement. GLOBOCAN 2008 suggère également que cette tendance est susceptible de rester tout au long des deux prochaines décennies. Ces statistiques illustrent parfaitement toute l'ampleur du défi qui attend la recherche oncologique du 21<sup>ème</sup> siècle.

Comprendre les mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans le développement de la maladie s'avère donc nécessaire. Contrairement à ce que l'on peut croire, le cancer n'apparaît pas du jour au lendemain; il s'agit d'une maladie dont le développement s'échelonne sur plusieurs années. Ce durant, le génome des cellules pré-cancéreuses accumule une panoplie de mutations. À date, plus de 350 gènes ont été prouvés pour être impliqués dans l'acquisition du phénotype tumoral (Futreal et al, 2004) contribuant en conséquence au développement d'environ 200 types de tumeurs pouvant affecter tous les tissus du corps. Ces affections résultent toutes de l'acquisition et du maintien par les cellules de caractères anormaux : l'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance, la résistance aux signaux inhibant la croissance, la résistance à la mort cellulaire programmée ou apoptose,

l'acquisition d'un potentiel réplicatif illimité, la capacité à susciter la genèse de vaisseaux sanguins ou angiogenèse, et la capacité à former des métastases. Ces six propriétés, chacune plus ou moins développées selon les cancers, résultent de l'altération de l'expression ou de la séquence d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (Hanahan et Weinberg, 2000). Les altérations sont résumées à la figure 1.1.

### 1.1.2 La carcinogenèse

Le développement d'une tumeur maligne, ou cancer, est une évolution en plusieurs étapes dans laquelle interviennent plusieurs cancérogènes, exogènes et endogènes. Classiquement, on distingue deux étapes principales : l'initiation et la progression. Les initiateurs sont les principaux acteurs de l'initiation et sont des agents mutagènes provoquant des dommages irréversibles à l'ADN de la cellule. À la promotion, correspondent les promoteurs qui stimulent la prolifération cellulaire ou altèrent les communications intercellulaires de manière à immortaliser la cellule (Tubiana, 2008; Béliveau et Gingras, 2005). Malgré cette séparation artificielle du processus de développement tumoral, elle garde son intérêt, et il faut savoir que la majorité des cancérogènes identifiés ne sont pas des initiateurs génotoxiques, mais sont des promoteurs (alcool, amiante...) (Tubiana, 2008). L'initiation, comme son nom l'indique est l'étape initiale du processus cancéreux : la cellule somatique acquiert une mutation génétique irréversible qui ne lui est pas létale mais dont les cellules filles hériteront (Valko et al, 2006). À ce stade la cellule est dite initiée mais n'est pas jugée cancéreuse. Cette première mutation entraîne généralement l'apparition de mutations additionnelles contribuant à la formation d'une tumeur primaire capable de se développer de manière autonome. L'on croit qu'à cette étape, ces tumeurs peuvent être maintenues à l'état latent les empêchant de développer un cancer. Cependant, dans le cas échéant, la promotion des tumeurs est favorisée (Béliveau et Gingras, 2005). À ce stade, ce sont les promoteurs tumoraux, pouvant être des stimuli externes ou internes, qui agissent comme des activateurs géniques et non les carcinogènes. La cellule subit à ce stade une expansion clonale phénotypique qui peut être le résultat d'effets directs du promoteur tumoral ou encore d'effets indirects d'un promoteur tumoral provenant de cellules adjacentes. Seules les cellules initiées sont stimulées à proliférer. C'est dans la troisième étape de la cancérogenèse multi-étapes que

ces cellules effectuent une conversion maligne. Ce processus est généralement lent, et la cellule se caractérise par une instabilité génétique ainsi que par une rupture de l'intégrité des chromosomes. À cette étape, la croissance cellulaire est davantage dérégulée et la cellule opère de manière incontrôlée (Klaunig et Kamendulis, 2004; Valko et al, 2006). La progression est l'étape qui caractérise un cancer à l'état mature possédant les six caractéristiques citées plus haut avec la capacité de se répandre dans d'autres tissus de l'organisme sous forme de métastases (Béliveau et Gingras, 2005). La figure 1.2 résume les trois étapes du développement d'un cancer : l'initiation, la promotion et la progression.

## **1.2 L'angiogenèse tumorale**

### 1.2.1 Définition

L'angiogenèse est le processus de formation de néo-vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (Hanahan et Folkman, 1996). Physiologiquement, elle est le principal mécanisme de vascularisation lors de l'embryogenèse, mais aussi plus tard, dans la transformation cyclique de l'endomètre, dans la génération du placenta et dans les phénomènes de cicatrisation tissulaire et d'adaptation des tissus à une hypoxie ou une inflammation locale (Folkman, 2003; Feron et al, 2007). Par contre, dans le cas d'un cancer, l'angiogenèse est pathologique : la croissance tumorale et la formation de métastases, dépendent d'une très forte augmentation du nombre de vaisseaux; elle est alors destinée à répondre aux besoins métaboliques de la tumeur. L'angiogenèse physiologique et pathologique nécessite la coordination de plusieurs systèmes de signalisation, dont le plus important est celui du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF et de ses récepteurs (Feron et al, 2007). D'autres maladies que le cancer sont caractérisées ou causées par une angiogenèse excessive; on pourrait citer le psoriasis et l'arthrite, mais aussi l'obésité, l'asthme et l'athérosclérose (Carmeliet, 2003).

L'angiogenèse a une place importante dans l'évolution d'une tumeur. La croissance tumorale peut être divisée en deux phases. Dans la première phase les nutriments nécessaires sont fournis par les vaisseaux du tissu normal et est donc caractérisée par l'absence d'un

réseau vasculaire, elle est dite avasculaire. Passé une certaine taille soit supérieure à 3 mm<sup>3</sup>, les besoins ne pourront être assurés que par de nouveaux vaisseaux qui viendront irriguer la tumeur et accompagner sa croissance. Il s'agit de la phase vasculaire (Folkman, 1995). Ce recrutement de nouveaux vaisseaux est assuré par l'expression d'une série de facteurs de stimulation de la prolifération des cellules endothéliales normales. C'est un processus de conversion ou encore le « switch angiogénique » qui sépare la phase avasculaire de la phase vasculaire. L'angiogenèse est en effet un équilibre entre activation et inhibition mais une augmentation de l'expression des facteurs pro-angiogéniques n'est pas une étape suffisante pour permettre l'acquisition du phénotype angiogénique par la tumeur. En effet, simultanément à cette augmentation des activateurs de l'angiogenèse, il doit se produire une diminution marquée des facteurs anti-angiogéniques (figure 1.3) (Bergers et Benjamin, 2003).

#### 1.2.2 Étapes de l'angiogenèse tumorale dans l'endothélium vasculaire tumoral

L'endothélium vasculaire tumoral se distingue de son pendant normal de par un manque de muscles lisses, un recouvrement inadéquat des vaisseaux par les péricytes, une désorganisation des patrons de ramification et une perméabilité accrue des vaisseaux (Eberhard et al, 2000; Hashizume et al, 2000). Dans l'endothélium vasculaire tumoral, il est connu maintenant que la néo-vascularisation tumorale procède à l'élaboration des vaisseaux sanguins en cinq différentes étapes (Carmeliet et Jain, 2000). L'angiogenèse requiert la contribution des cellules endothéliales (CE) et les mécanismes moléculaires et cellulaires débutent par l'activation de ces dernières. À la première étape, la tumeur produit différentes molécules pro angiogéniques qui cibleront les vaisseaux sanguins à proximité. Un exemple de ces molécules est le VEGF qui ira interagir avec les récepteurs VEGFR exprimés à la surface des CE. La perméabilité de sa couche endothéliale vasculaire augmente suite à l'activation des cellules endothéliales par le VEGF. Ce dernier contribue à l'activation des CE via nombreux autres mécanismes (Nagy et al, 2008). À cette deuxième étape, les CE activées sont alors capables de migrer et de proliférer pour former, par bourgeonnement, de nouveaux tubes vasculaires à partir des extrémités et des parois latérales des vaisseaux préexistants. C'est l'étape de la prolifération des CE. C'est un réseau essentiellement de type

capillaire qui se forme puisque les sites privilégiés de formation de ces bourgeons sont les capillaires. (Scoazec, 2000). La troisième étape est la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Elle implique une série de métalloprotéinases (MMPs) qui agissent non seulement pour créer un espace pour les cellules endothéliales migrantes mais aussi pour libérer des facteurs de croissance comme le facteur de croissance fibroblastique (FGF) ou le VEGF qui, en l'absence de dégradation, resteraient séquestrés dans la matrice. En effet, l'espace extracellulaire n'est pas un secteur vide et apte à recevoir les cellules endothéliales migrantes ; il est composé d'un réseau complexe et dense de matrice extracellulaire que les cellules endothéliales doivent dégrader avant de pouvoir y migrer (Carmeliet et Jain, 2000). La quatrième étape est celle de la migration des CE. L'augmentation de la perméabilité vasculaire permet l'extravasation d'une quantité de protéines plasmatiques qui forment dans l'espace interstitiel une matrice provisoire permettant d'offrir un support à la migration des CE. En plus, la migration de ces dernières est très favorisée grâce à la dégradation de la membrane basale par les protéases cellulaires et les CE migrent donc en direction du stimulus angiogénique (Stupack et Cheresh, 2004). La cinquième et dernière étape est celle du remodelage et de la stabilisation. Elle est le fait d'un équilibre entre dégradation et élaboration de la matrice extracellulaire. Cette étape implique la perte des caractéristiques du phénotype angiogénique et la formation d'une stabilisation entre les CE et leur microenvironnement. Il y a de ce fait une réorganisation de la paroi vasculaire se caractérisant par la sécrétion endothéliale d'une lame basale riche en laminine et en collagène IV (Davis et Senger, 2005). L'accolement des cellules musculaires lisses sera possible grâce à des facteurs de croissances comme le PDGF permettant la stabilisation des néo-capillaires alors que la prolifération des cellules endothéliales est freinée par les péricytes (Armulik et al, 2005). Une image simplifiée de l'angiogenèse est retrouvée à la figure 1.4.

### 1.2.3 Hypoxie : stimulante de l'angiogenèse

Une tumeur agressive contient certes des régions hypoxiques. L'hypoxie est une caractéristique des tumeurs solides tels les cancers cérébraux. Des évidences montrent que 50-60% des tumeurs solides avancées contiennent des régions hypoxiques qui ont une tension en oxygène plus basse que les tissus normaux (Liu et al, 2010). Le faible niveau d'oxygène

intra-tumoral influence une série de paramètres biologiques qui peuvent modifier le potentiel malin d'un néoplasme et le rendre plus résistant aux thérapies (Melillo, 2006). Au niveau cellulaire, l'hypoxie déclenche l'activation de voies moléculaires complexes, sous la dépendance du complexe HIF (Hypoxia-Inducible Factor), qui stimulent l'expression d'une multitude de gènes permettant l'adaptation de la cellule à l'hypoxie et aussi promeuvent l'angiogenèse. HIF est un régulateur clé jouant un rôle principal dans l'activation de la transcription de gènes régulant la prolifération cellulaire, la survie de la cellule, le métabolisme glucidique et la migration cellulaire (Li et Ye, 2010, Patiar et Harris, 2006). Le VEGF, acteur principal de l'angiogenèse est ciblé par HIF afin d'augmenter le débit sanguin vers les tissus non oxygénés. Cette régulation de l'angiogenèse par HIF en réponse à l'hypoxie est essentielle durant le développement embryonnaire mais aussi après une ischémie afin de revasculariser le tissu ou l'organe. L'angiogenèse est un phénomène d'entretien physiologique qui va favoriser la croissance tumorale, le cas d'une tumeur (Simon, 2007).

HIF est donc l'un des principaux joueurs en condition hypoxique. Il s'agit d'un facteur transcriptionnel hétérodimérique qui, en se liant au HRE (Hypoxia-response elements), lors de l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie, permet la stimulation de l'angiogenèse (via VEGF), la prolifération cellulaire, la survie, le métabolisme glucidique, la régulation du pH et de la migration (MMP) (Patiar et Harris, 2006). HIF-1 est un hétérodimère constitué des deux sous-unités HIF-1 $\alpha$  et ARNT1 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) /HIF-1 $\beta$ . En situation physiologique de normoxie, la sous-unité alpha de la protéine HIF est hydroxylée par les prolines et asparagines hydroxylases. HIF-1 alpha est ainsi complexé par les ubiquitines grâce à la protéine VHL (von Hippel-Lindau). La formation du complexe HIF-1  $\alpha$ -pVHL aboutit à la destruction de HIF-1 $\alpha$  par le protéasome. En situation d'hypoxie ou en cas de mutation d'HIF alpha, l'hydroxylation est impossible et les sous-unités alpha et bêta d'HIF peuvent s'associer. La translocation nucléaire d'HIF-1 $\alpha$  et  $\beta$  permet son interaction avec des promoteurs de gène codant les facteurs pro-angiogéniques tel le VEGF (figure 1.5). Le stress hypoxique est donc mené par la stabilisation et l'activation de la sous-unité (HIF-1 $\alpha$ ) du facteur de transcription central, HIF-1 (Brahimi et Pouyssegur, 2006).

#### 1.2.4 Hémostase

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme contre une hémorragie en activité ou imminente survenant à la suite d'un dommage subi au niveau de l'endothélium (Guyton et Hall, 2003). Les réactions d'hémostase ont pour fonction principale de former des bouchons hémostatiques constitués principalement de plaquettes et de fibrinogène permettant de combler les brèches vasculaires. Le bouchon doit se former rapidement, doit adhérer fermement au pourtour de la brèche et doit être assez solide afin d'empêcher le retour à l'hémorragie jusqu'à la guérison complète. Il faut savoir que l'hémostase primaire et la coagulation sanguine dite encore hémostase secondaire travaillent en concertation étroite pour former le bouchon hémostatique (Jobin, 1995; Becker et al, 2000). L'hémostase primaire entraîne d'abord, la formation du clou plaquettaire hémostatique; elle se centre donc sur les plaquettes et est la plus rapide (3 à 5 minutes) à livrer son produit hémostatique. La coagulation sanguine par contre, fait intervenir une dizaine de protéines plasmatiques de coagulation produisant le caillot de fibrine. Le clou plaquettaire est renforcé par la contraction plaquettaire active du caillot de fibrine et l'agrégat plaquettaire final forme le bouchon hémostatique (figure 1.6). Il faut noter que tout au long de l'hémostase primaire, les plaquettes interagissent tour à tour avec des facteurs et des enzymes de la coagulation, avec des cofacteurs de la coagulation, avec les érythrocytes et en premier lieu avec la paroi vasculaire lésée. L'on distinguera pour ceci les rôles du vaisseau en hémostase qui ne font que délimiter les trois étapes de l'hémostase : la vasoconstriction (étape d'interaction avec les facteurs plaquettaires), l'activation des plaquettes par la paroi vasculaire (étape de formation du clou plaquettaire) et enfin, l'activation de la coagulation sanguine par la paroi vasculaire lésée. La vasoconstriction est immédiate et ne dure qu'une minute : la sérotonine et la thromboxane  $A_2$  ( $TXA_2$ ) sont libérées par les plaquettes et entraînent la contraction des cellules musculaires lisses obligeant l'hémostase à former le bouchon à calibre correspondant au vaisseau rupturé. Durant l'activation des plaquettes par la paroi vasculaire, le collagène et d'autres fibres du sous-endothélium entraînent l'adhésion des plaquettes à la brèche vasculaire. L'adhésion au collagène dure 2 à 3 secondes. Enfin, le vaisseau lésé active la coagulation en dénudant le sous-endothélium de son collagène et trois voies de coagulation (intrinsèque, extrinsèque et intermédiaire) sont activées. La lésion est alors réparée et le caillot fibrineux est dissout (ou fibrinolyse) (Jobin, 1995).

Une relation entre le cancer et l'hémostase semble cependant être établie puisque des coagulopathies surviennent chez 80% des patients atteints de cancers (Nash et al, 2001). Ce lien fut confirmé pour la première fois par Armand Trousseau en 1865 : il remarqua une grande incidence de thromboembolies veineuses chez plusieurs patients atteints de carcinomes gastrointestinaux (Boccaccio et Comoglio, 2005). En effet, une augmentation de la sensibilité du système hémostatique peut mener à la formation excessive de thromboses, un phénomène couramment observé chez les patients cancéreux (Furie et al, 2008). Selon Wojtukiewicz et al, 2001, des patients atteints d'un cancer présentent des dysfonctions de la coagulation telles des thromboembolies et des thrombophlébites. Une augmentation des concentrations de fibrine ou de produits de dégradation du fibrinogène suite à la fibrinolyse dans le sang caractérisent les désordres de coagulation chez ces patients atteints de cancer (Nash et al, 2001). Le taux de plaquettes sanguines est également plus élevé que la normale chez ces patients (Lee, 2002). Ainsi, le VEGF qui comme dit plus tôt à la section 1.2.2 augmente la perméabilité des cellules endothéliales, entraîne aussi le passage du fibrinogène sanguin vers la tumeur menant à la formation d'une matrice de fibrine par l'activité pro-coagulante associée aux cellules tumorales (Pirie-Shepherd, 2003). Ainsi, l'activation de la coagulation induite par la tumeur et la formation de fibrine sont impliquées dans l'angiogenèse et la formation de métastases (Lee, 2002). La fibrine étant présente dans l'environnement de la tumeur constitue aussi un substrat de liaison et d'activation des plaquettes sanguines. Les plaquettes libèrent alors une série de facteurs angiogéniques incluant le VEGF, PDGF (platelet derived growth factor), TGF (transforming growth factor), bFGF (fibroblast growth factor) et l'IL-6 et leur libération stimule les CE et soutient l'angiogenèse (Nash et al, 2001; Pinedo et al, 1998). Enfin, l'activation des plaquettes durant la coagulation entraîne la libération de lipides bioactifs tels que la sphingosine1-phosphate (S1P) et l'acide lysophosphatidique (LPA) (English et al, 2002).

#### 1.2.5 Facteurs plaquettaires et leurs implications physiopathologiques dans le cancer

Le LPA et la S1P sont donc des phospholipides d'origine plaquettaire qui peuvent être libérés au niveau d'une lésion vasculaire et d'une hémorragie (English et al, 2002). Les rôles

du LPA et de la S1P dans l'angiogenèse, la croissance tumorale et la métastase ont suscité la curiosité de plusieurs chercheurs. Les plaquettes sanguines sont une source importante de LPA et de S1P dans l'organisme. Cependant, le LPA et la S1P peuvent être produits dans d'autres types de cellules, entre autres les cellules cancéreuses exprimant l'autotaxine (une lysophospholipase D qui permet la synthèse du LPA en présence de lysophosphatidyl choline) et la sphingosine kinase respectivement (Peyruchaud, 2009).

Le LPA, phospholipide polaire, fut rapporté comme étant produit dans le sang lors de l'agrégation plaquettaire mais aussi comme étant un puissant facteur pro-agrégant mettant ainsi en évidence le rôle autocrine/paracrine du LPA dans l'agrégation plaquettaire (Mauco et al, 1978; Gerrard et al, 1979). Le LPA est présent dans le sang et est produit par plusieurs types de cellules, en particulier par les plaquettes sanguines activées (Lapierre et al, 2010; Westermann et al, 1998). Le LPA est normalement présent à une basse concentration dans le plasma soit de l'ordre de 100 nM, concentration qui s'élève en cas d'inflammation ou de blessure tissulaire (Lapierre et al, 2010). Après une agrégation plaquettaire par exemple, la concentration de LPA s'élève de 2 à 20  $\mu$ M (Aoki et al, 2002). En plus, il a été observé que l'agrégation des plaquettes sanguines induite par les cellules tumorales contribuait de manière importante dans la propagation métastatique de plusieurs cancers (Peyruchaud et al, 2005). Le LPA promeut l'invasion et les métastases du cancer ovarien en stimulant l'expression de facteurs angiogéniques; en effet, le LPA est présent en forte concentration dans les ascites et le plasma des patientes atteintes de cancer ovarien (Bian et al, 2004). De hauts niveaux de LPA ont également été retrouvés dans le sang de patients souffrant de myélome multiple (Brindley, 2004).

Le LPA induit des effets morphologiques et/ou prolifératifs. En effet, il a été proposé que le LPA soit impliqué dans des processus biologiques importants tels la myélination, la neurogenèse, l'angiogenèse, en stimulant la production de facteurs proangiogéniques tel le VEGF, la réparation tissulaire et la progression tumorale (Contros et al, 2000; Valet et al, 2008). Il a été démontré que le LPA exerçait de puissants effets sur la migration cellulaire (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules épithéliales, cellules cancéreuses) (Imamura, 1993). Le LPA, dans une multitude de types cellulaires normaux ou

cancéreux, augmente la prolifération cellulaire ou renforce l'effet mitogénique d'autres facteurs de croissance comme l'EGF (Valet et al, 1998). Le LPA fut détecté dans des biopsies de tumeur du côlon alors qu'il était absent dans des biopsies de côlons sains (Merchant et al, 1991). Plus tard, le même groupe observa qu'il existait un rapport entre la quantité de LPA présente dans des biopsies de cancers de l'œsophage et leur degré de malignité (Merchant et al, 1999). Le LPA stimule également la production de certaines métalloprotéinases matricielles qui sont d'importantes actrices dans la favorisation du processus de métastase et donc de l'expansion tumorale (Wang et al, 2010a.). Il est également intéressant de noter que l'expression de l'autotaxine, l'ectophosphodiesterase permettant la synthèse du LPA, est fortement augmentée dans les glioblastomes, les neuroblastomes agressifs, les cancers du sein, les carcinomes rénaux, hépatocellulaires et thyroïdiens (David et al, 2010; Nakanaga et al, 2010). Enfin, le LPA est un agent anti-apoptotique *in vivo*, comme démontré sur des cellules cancéreuses mais également sur des cellules normales soumises à des traitements chimiques (cisplatine) ou des irradiations (Fang et al, 2002).

La S1P a été découverte en 1884 par un physicien allemand J.L.W. Tudichum. Elle est synthétisée à partir de la sphingosine via la phosphorylation de son groupe hydroxyle primaire par deux sphingosines kinases (Sphk1 et Sphk2) (Lai et al, 2009). Dans le plasma, les cellules hématopoïétiques (érythrocytes, plaquettes sanguines et leucocytes) constituent la source majeure de S1P. Cependant, les cellules vasculaires et lymphatiques endothéliales sont capables aussi de synthétiser et libérer la S1P. La S1P circule en liberté à travers les différentes membranes mais nécessite un système de transport spécifique pour sa translocation à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Dans les plaquettes sanguines, l'exportation de la S1P se fait via les transporteurs de type ABC, cependant le mécanisme de cette exportation dans d'autres types cellulaires demeure inconnu (Lucke et Levkau, 2010). La S1P potentialise de beaucoup la réponse angiogénique induite par le VEGF et le FGF (Chae et al, 2004). La S1P a été démontrée pour être promotrice de l'angiogenèse tumorale *in vivo* : la progression tumorale a été réduite suite à un traitement avec un anticorps monoclonal qui neutralise la S1P bioactive et ceci dans plusieurs modèles tumorales xénogreffes et allogreffes. Le même anticorps anti-S1P a de plus été utilisé *in vitro* et a inhibé

la migration cellulaire endothéliale mais aussi la formation de capillaires (Lucke et Levkau, 2010).

### **1.3 Récepteurs/régulateurs de la progression tumorale**

#### **1.3.1 LPAR**

En cas de blessure, les niveaux de LPA et de S1P plasmatiques augmentent drastiquement suite à leur libération à partir de plaquettes activées entraînant une série de réponses dans divers tissus. Ces lysophospholipides ont des effets sur la majorité des cellules entraînant des modulations dans les réponses cellulaires de prolifération, de survie, de migration et de différenciation. Plusieurs de ces effets sont médiés par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) de ces lysophospholipides (Pitson et Pébay, 2009). Cinq récepteurs de la S1P (S1P<sub>1-5</sub>) sont connus aujourd'hui (Kluk et Hla, 2002; Pitson et Pébay, 2009) alors que l'on connaît sept récepteurs au LPA incluant les LPA<sub>1,5</sub>. Les récepteurs au LPA et au S1P sont exprimés de manière différentielle et sont liés à différentes protéines G. Les voies de transduction du signal mises en jeu par l'activation des récepteurs du LPA et de la S1P sont étroitement liées à la nature des protéines G auxquelles ils sont couplés et peuvent donc être médiés par l'activation de la kinase ERK1/2 ou de la phospholipase C (PLC) ou de petites GTPases (voir figure 1.7) (Pitson et Pébay, 2009).

Nous nous attarderons sur les récepteurs au LPA suscitant notre intérêt dans cette présente étude et plus particulièrement aux récepteurs LPAR-1/EDG2, LPAR-2/EDG4 LPAR-3/EDG7, LPAR-4 et LPAR-5. Il s'agit de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G et appartenant à la famille EDG (endothelial differentiation gene). De par leur couplage à la protéine Gi (inhibitrice), ces trois récepteurs entraînent l'activation des MAPK (mitogen activated protein kinases) (ERK1/2) et des PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase). Ces activations sont impliquées dans les effets mitogéniques et anti-apoptotiques du LPA. LPAR-2 et LPAR-3 ont une composition en acides aminés homologues à 46 et 54% avec celle du récepteur LPAR-1 (An et al, 1998). Chez l'homme, le récepteur LPAR-1 est distribué dans une variété de tissus et est hautement exprimé dans le

cerveau, le cœur, le placenta, le côlon et le petit intestin; il l'est par contre moins dans le pancréas, les ovaires et la prostate (Hecht et al, 1996). Le récepteur LPAR-2 possède une distribution tissulaire plus restreinte, plus particulièrement dans les testicules et les leucocytes. Le récepteur LPAR-3 possède également une distribution tissulaire restreinte dans le pancréas, la prostate et les testicules (Bandoh et al, 1999). Le récepteur LPAR-4 s'exprime à de très bas niveaux dans la majorité des tissus humains, cependant il est significativement exprimé dans les ovaires (Noguchi et al, 2003). LPAR-5 est modérément exprimé dans le cerveau embryonnaire, au niveau de la peau, de l'estomac, du thymus, du poumon et du foie et est enrichi dans le petit intestin (Lee et al, 2006a).

Il a été démontré que le LPA stimulait l'activation des cellules du cancer ovarien mais aussi qu'il avait un effet anti-apoptotique sur ces mêmes cellules. Il induit aussi l'activation de l'uPA (urokinase plasminogen activator) et des métalloprotéinases matricielles (MMPs), qui sont, comme dit précédemment, d'importants médiateurs de l'invasion et de la migration tumorale (Pustilnik et al, 1999; Fishman et al, 2001; Do et al, 2007). Le LPA accélère aussi par les voies Rho/ROCK/actomyosin et Ras/MEKK1 la formation d'adhésions focales et la migration cellulaire cancéreuse (Sawada et al, 2002; Bian et al, 2004). Des effets similaires ont également été observés dans d'autres types de cancers tels le cancer de l'estomac, du foie et du cerveau (gliomes) (Kim et al, 2008; Genda et al, 1999; Goetzl et al, 1999). Tous les effets du LPA cités ci-dessus sont principalement médiés par les récepteurs LPAR-2 et LPAR-3 alors que le récepteur LPAR-4 participerait à la rétroaction positive de la production du LPA (Wang et al, 2008; Yu et al, 2008; Hope et al, 2009; Ptaszynska et al, 2008). Il a récemment été démontré que le récepteur LPAR-1 est un régulateur négatif du cancer ovarien (Murph et al, 2008). En plus, des mutations du récepteur LPAR-1 ont été retrouvées dans des tumeurs du foie chez le rat (Obo et al, 2009). Il a également été démontré que le LPA induisait l'expression du VEGF pro-angiogénique dans les cellules du cancer de l'ovaire via le récepteur LPAR-2 mais non LPAR-1 (Hu et al, 2001). Ceci laisse suggérer que le LPAR-1, à la différence des autres récepteurs connus du LPA, pourrait agir en tant que gène suppresseur de tumeur. Cependant, ceci reste à confirmer. Une étude effectuée sur une lignée cellulaire humaine MDA-BO2 surexprimant le récepteur LPAR-1, démontra que la surexpression du récepteur LPAR-1 sensibilisait spécifiquement ces cellules à l'action

mitogénique du LPA *in vitro*. *In vivo*, la surexpression de LPAR-1 dans ces cellules augmente de façon dramatique la formation des métastases osseuses, en augmentant la croissance de la masse tumorale, la prolifération cellulaire et la destruction osseuse (Peryuchaud et al, 2005).

### 1.3.2 LRP : rôles dans la progression tumorale

Les récepteurs aux LDL (low-density lipoprotein) sont un groupe de récepteurs cellulaires de surfaces chargés du transport d'un bon nombre de macromolécules à travers les cellules. Il y a neuf membres dans la famille des récepteurs aux LDL dont LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein-1), LRP-1b, LRP-5, VLDLR (very low-density lipoprotein receptor), la mégaline ou LRP-2, apoER2 ou LRP-8 et LRP-11 (Chung et Wasan, 2004).

Le récepteur LRP-1 est un récepteur d'endocytose de 600 kDa. Clivé par une furine, LRP-1 génère une structure à deux chaînes : une chaîne  $\alpha$  extracellulaire de 515 kDa et une chaîne  $\beta$  de 85 kDa contenant le domaine transmembranaire. LRP-1 est impliqué dans le métabolisme de plus de 40 ligands incluant des protéines de la matrice extracellulaire en vue de leur dégradation, des facteurs de croissance, des protéases et des inhibiteurs de protéases (Montel et al, 2007). Plusieurs enzymes protéolytiques impliquées dans l'invasion tumorale sont régulées par l'activité d'endocytose de LRP-1. C'est notamment le cas de certaines métalloprotéases matricielles (MMP9, MMP2 et la MMP13) dont le niveau d'expression et l'activité sont pris en charge par LRP-1 (Herz et Strickland, 2001). LRP-1 semble accélérer aussi la dégradation de l'urokinase uPA, une sérine protéase extracellulaire impliquée dans le remodelage anormal de la matrice lors des progressions tumorales; LRP-1 interagirait directement avec le récepteur uPAR, le menant à éliminer l'uPA de la surface cellulaire. LRP-1 régule une cascade protéolytique impliquée dans la progression de l'invasion tumorale, activité lui conférant des propriétés anti-tumorales (Dedieu et al, 2008). Il a été possible de montrer lors de plusieurs études qu'une perte d'expression de LRP-1 est attribuée à une stimulation de l'agressivité des cellules cancéreuses rapportant ceci dans plusieurs types de cancers (cancer de la prostate, gliomes, cancer thyroïdiens...) (Langlois et al, 2009).

En contradiction avec cette signature anti-tumorale qui lui avait été attribuée, LRP-1 pourrait contribuer à l'agressivité de certaines tumeurs. En effet, selon Dedieu et al, (2008), l'inactivation de LRP-1 engendrait un ralentissement considérable des processus migratoires et invasifs de carcinomes thyroïdiens laissant suggérer un rôle pour LRP-1 dans la capacité des cellules cancéreuses à migrer de manière favorable (Dedieu et al, 2008). Langlois et al, (2009), rapportent qu'en conditions hypoxiques, LRP-1 est surexprimé et que son invalidation entraînait une diminution du VEGF pro-angiogénique ce qui menait à un ralentissement considérable de la croissance métastatique (Langlois et al, 2009). En plus, selon l'équipe de Li, de hauts niveaux d'expression de LRP-1 augmentent le pouvoir invasif des cellules cancéreuses du sein (Li et al, 1998). Il a également été démontré qu'une neutralisation de LRP-1 arrêta la mobilité cellulaire dans des cellules tumorales aussi bien que normales. De plus, Song et al, (2009) rapportent qu'une diminution de la migration cellulaire a été observée dans des cellules humaines de muscle lisse où LRP-1 a été invalidé par un ARN interférent (si-ARN). Le groupe de Song et al, (2009) a démontré que LRP-1 est capable de promouvoir la migration et l'invasion cellulaire en induisant l'expression des MMP-2 et 9 (Song et al, 2009). Tous ces résultats montrent la complexité du rôle de LRP-1 dans l'invasion et la migration tumorale qui dépendent du type de cellules tumorales à l'essai et de la protéine extracellulaire impliquée dans ces processus tumoraux. On pourrait cependant avancer que ces résultats font du blocage ciblé de la fonction de LRP-1 une des perspectives thérapeutiques possible. LRP est impliquée dans la régulation métabolique des lipides et des lipoprotéines dans une grande variété de cellules ce qui laisse suggérer qu'une augmentation des niveaux de LRP pourrait être la conséquence d'une augmentation des besoins en lipides et lipoprotéines de la cellule cancéreuse quand elle est privée de sérum (Uden et al, 2000).

Autre que LRP-1, LRP-1b fait également partie de la famille des récepteurs au LDL. LRP-1b a été identifié comme un candidat suppresseur de tumeur : il a été retrouvé dans 40% des cellules cancéreuses du poumon sous forme inactive. LRP-1b est exprimé dans le cerveau, la thyroïde et les glandes salivaires. Certaines études ont pu démontrer que LRP-1b est un régulateur négatif de la migration cellulaire (Chung et Wasan, 2004). Un autre membre de la famille des LDL est LRP-5, a d'abord été identifié dans des recherches pour la nature

du diabète de type I (Hey et al, 1998). Le rôle fonctionnel de ce récepteur a surtout été attribué à la transduction du signal dans une voie durant le développement embryonnaire des vertébrés et la formation de tumeur. LRP-5 est également un important corécepteur dans la voie de signalisation de Wnt dans trois différentes espèces, la Drosophile (Wehrli et al, 2000), le Xénope (Tamai et al, 2000) et la souris (Pinson et al, 2000). Enfin, six mutations au niveau du gène de LRP-5 ont été identifiées et liées à une augmentation de la densité osseuse chez l'humain (Van Wesenbeeck, 2003). Le récepteur au VLDL est le principal transporteur du triacylglycérol endogène à partir du foie jusqu'au tissu extrahépatique (Chung et Wasan, 2004). LRP-2 ou mégaline est un récepteur de la famille des LDL de 600-kDa. Des souris knockout pour ce récepteur suggèrent son importance dans l'absorption des protéines et dans la récupération des vitamines (Chung et Wasan, 2004). LRP-8 a été identifié dans le cerveau mais aussi dans les testicules et le placenta. LRP-8 joue un rôle important dans la migration neuronale chez la souris. LRP-8 et VLDLR semblent être des récepteurs très importants dans la voie de signalisation de la Réeline, une protéine de la matrice extracellulaire impliquée dans la migration neuronale lors du développement cérébral (Chung et Wasan, 2004). Voir figure 1.8 pour certains récepteurs de la famille du LDL. Nous verrons au cours de cette étude, sous certaines conditions l'expression génique de ces récepteurs dans une lignée de médulloblastome.

## **1.4 Les cellules souches cancéreuses (CSC)**

### **1.4.1 Définition**

Récemment, les études suggèrent la présence d'un lien entre les tumeurs cérébrales et une sous-population de cellules souches cancéreuses présente au sein de la tumeur. Ces cellules souches dans le cervelet pourraient expliquer les médulloblastomes, tumeurs malignes constituant 13 à 20% de toutes les tumeurs cérébrales pédiatriques (Chen et al, 2010). Le concept de cellules souches cancéreuses vient des premiers travaux d'un groupe de chercheurs étudiant la leucémie myéloïde aiguë humaine et qui a prouvé qu'une sous-population de cellules uniques était capable de générer le même type de leucémie aiguë suite à sa transplantation dans des souris immunodéficientes (Emmenegger et Wechsler-Reya,

2008). L'intérêt pour ces cellules est né d'expériences de xénogreffe qui ont montré que l'induction d'une tumeur chez l'animal survenait par la seule capacité des cellules souches tumorales à le faire. Depuis, des populations de cellules similaires ont été retrouvées dans une variété de tumeurs solides telles les cancers du sein, du cerveau, du colon, de la prostate, de la peau et du pancréas. De là, il semblerait que les cellules souches tumorales seraient à l'origine de la croissance de l'ensemble de la tumeur, du maintien de son agressivité et également à l'origine des rechutes (Singh et al, 2004). La validation d'une telle hypothèse, confirmerait que les cellules souches cancéreuses sont bel et bien une cible thérapeutique fondamentale.

Les CSC s'auto-renouvellent, ont une longue durée de vie et sont capables de reproduire l'hétérogénéité tissulaire. Elles vont acquérir autant de propriétés possibles leur permettant de former des métastases et de résister aux traitements anti-tumoraux actuels (Wicha et al, 2006). En effet, les CSC, qui sont altérées génétiquement, acquièrent la propriété de proliférer indéfiniment de manière autonome vis-à-vis de la «niche» environnementale (Wicha et al, 2006), un microenvironnement spécialisé qui en conditions physiologiques normales fournit un contrôle serré de la prolifération des CS (Lu et Mahato, 2009). Donc, toutes les cellules d'une même tumeur n'ont pas la même capacité à proliférer et à assurer la croissance tumorale. En effet, il y a une cellule (CC-IC) initiatrice de cancer parmi  $5.7 \times 10^4$  cellules tumorales non fractionnées (Wang et al, 2010b.). Au contraire, certaines propriétés des CSN sont conservées dans les CSC comme par exemple, l'activation de voies de signalisation anti-apoptotiques, la capacité d'entrer en quiescence, l'activation accrue des transporteurs membranaires et l'augmentation des capacités de migration cellulaire et de résistance à l'hypoxie (Wicha et al, 2006).

Les cellules souches cancéreuses cérébrales sont des cellules tumorales exprimant des marqueurs de cellules souches neurales normales (par exemple CD133) et ayant la capacité de pousser sous la forme de neurosphères, de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules tumorales exprimant des marqueurs astrocytaires, oligodendrogliaux et neuronaux (Singh et al, 2004; Yao et al, 2009) (figure 1.9). Certaines cellules souches cancéreuses partagent certaines caractéristiques phénotypiques avec les cellules souches normales du

même tissu. Ceci est vrai pour les cellules souches cancéreuses de médulloblastomes et de glioblastomes humains qui expriment le marqueur CD133 (promininine) et qui ont la capacité de se propager. Ceci a été mis en évidence par la transplantation de cellules CD133(+) qui a généré des tumeurs identiques à la tumeur originale confirmant que ces cellules souches sont effectivement des cellules souches cancéreuses. Ceci, n'a pas pu être obtenu par la transplantation de cellules CD133(-) (Emmenegger et Wechsler-Reya, 2008). L'origine des cellules souches demeure cependant à discuter. Néanmoins, deux hypothèses sont présentement émises. La première étant que la cellule souche cancéreuse est la résultante d'une cellule souche normale ayant accumulé des mutations suite à une exposition prolongée à des carcinogènes; la deuxième étant que la cellule souche cancéreuse provienne d'une cellule différenciée ayant acquis la capacité d'auto-renouvellement suite à des altérations génétiques (Dean et al, 2005).

#### 1.4.2 La résistance aux agents thérapeutiques

Depuis que la chimiothérapie est devenue l'une des principales stratégies thérapeutiques dans le traitement du cancer, la résistance a souvent suivi (Lu et Mahato, 2009). La récente découverte des CSC, naturellement survivantes à la majorité des chimiothérapies, pourrait expliquer non seulement la résistance thérapeutique d'une tumeur mais aussi le mécanisme de récurrence de celle-ci (Kelly et al, 2010). En effet, plusieurs travaux ont montré que les cellules souches tumorales étaient plus résistantes à la radiothérapie et la chimiothérapie que les autres cellules tumorales (Bao et al, 2006). Cette résistance naturelle aux chimiothérapies est liée à une caractéristique essentielle des cellules souches, leur nature quiescente (Kelly et al, 2010). Cette quiescence, les rend moins accessibles aux drogues anti-mitotiques qui ciblent des cellules en division rapide (Dean et al, 2005). Cette population mineure de CSC est plus résistante aux thérapies non seulement de par sa quiescence mais aussi de par son expression accrue pour des protéines anti-apoptotiques et des transporteurs d'efflux de drogues (Kelly et al, 2010). Ainsi, les CSC, même en très petit nombre, de par leur quiescence (Dean et al, 2005) et de par l'augmentation des mécanismes de rejet de drogues (Kelly et al, 2010), sont aptes à reformer la tumeur initiale avec des cellules rejetant efficacement les agents de chimiothérapie (Michor et al, 2005). De là, les thérapies utilisées

ne ciblent pas les CSC puisqu'après une première phase de réponse thérapeutique, la tumeur peu récidiver même après régression ou disparition en apparence totale de la tumeur (Reya et al, 2001). Enfin, qu'elles soient dénommées cellules souches cancéreuses (CSC) ou cellules initiatrices de tumeurs (CIT) ou encore cellules souches tumorales (CST), elles désignent cette même sous-population cellulaire se trouvant au sein d'une tumeur et pouvant proliférer indéfiniment et reconstituer une tumeur dans toute sa diversité phénotypique (Qin et al, 2010). Toutes ces propriétés des CSC, qu'elles les partagent ou non avec les cellules normales, montrent la difficulté à atteindre sélectivement cette population, primordiale pour le développement tumoral.

#### 1.4.3 CD133 : un marqueur de surface des CSC

Les CSC représentent une très petite proportion des cellules d'une tumeur (moins de 1%) (Neuzil et al, 2007). Donc, non seulement les CSC sont en très petit nombre au sein d'une tumeur mais un second obstacle était l'absence de marqueurs de surface spécifiques de cellules souches neurales qui permettraient de les isoler. L'étude du marqueur CD133 (décrite ci-dessous) n'est pas un cas unique puisqu'une population de CSC mammaire humaine exprimant à sa surface CD44<sup>+</sup> a également été à l'étude : 200 CSC CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> qui ne représentent que 1 à 10% de la tumeur, ont été capables de former une tumeur après injection alors que 20 000 cellules ne possédant pas ce phénotype en sont incapables. Ces manipulations montrent les capacités d'autorenouvellement et de différenciation de la population CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> et donc la présence de CSC que l'on a été capable d'isoler grâce à leurs marqueurs spécifiques (Al Hajj et al, 2003). Différents marqueurs de surface des CSC sont connus aujourd'hui; il est connu aussi que CD133 s'exprime fortement dans plusieurs CSC de tumeurs cérébrales (médulloblastomes, glioblastomes, astrocytomes pylocytiques et autres) (Beier et al, 2008).

Le marqueur CD133 fut le premier marqueur de cellules souches humaines multipotentes à avoir été identifié (en l'an 2000). Une population de cellules CD133(+), riches en marqueur de surface CD133, a été isolée par tri cellulaire et ces dernières étaient capables après réimplantation dans le cerveau d'une souris hôte immunodéprimée de migrer,

proliférer et se différencier en neurones et en cellules gliales (Uchida et al, 2000). Afin de tester le pouvoir tumorigène de cette population cellulaire, les fractions CD133- et CD133+ ont été extraites de différents types tumoraux et réinjectées, par stéréotaxie, dans le cortex ou le striatum de souris immunodéprimées. Seule la population de cellules exprimant le CD133 était capable d'initier et de reconstituer une tumeur cérébrale identique à celle dont elle a été extraite. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une faible proportion de cellules tumorales est responsable de l'initiation et de la croissance tumorale (Galli et al, 2003; Singh et al, 2004). Cependant, même si CD133 semble être un marqueur efficace des CSC, on ne sait pas encore comment CD133 contribue à leurs caractéristiques de résistance thérapeutique, d'auto-renouvellement et de différenciation (Zhou et al, 2010). De plus, on connaît peu le mode de régulation de cet important marqueur de CSC. Dans les cellules de glioblastomes l'expression de CD133 est régulée par le stress cellulaire et l'hypoxie. En termes d'applications cliniques, une régulation à la baisse de l'expression de CD133 entraverait la prolifération et les métastases dans les mélanomes (You et al, 2010).

Le marqueur CD133 est exprimé par les cellules souches les plus immatures connues à date. CD133 est connu sous le nom de Prominine-1, une glycoprotéine de surface impliquée, selon certains, dans l'organisation topologique des protrusions de la membrane plasmique. La Prominine-1 humaine, est constituée de 865 acides aminés avec un poids moléculaire de 120 kDa et la murine de 858 acides aminés avec un poids de 115 kDa. CD133 possède 5 domaines transmembranaires et a été retrouvé à l'origine dans les cellules souches hématopoïétiques et neurales d'origine humaine et murine (Shmelkov et al, 2005). CD133 possède huit sites de N-glycosylation dans son domaine extracellulaire; certains chercheurs étudient le degré de glycosylation de CD133 qu'ils pensent être un marqueur indirect des cellules souches plutôt que l'expression de CD133 elle-même : la dynamique de glycosylation pourrait jouer un rôle critique dans sa fonction biologique dans les CSC et CSN (Zhou et al, 2010). Selon d'autres études, CD133 pourrait établir et maintenir différents types de protubérances membranaires lui confiant le potentiel d'influencer la migration, la polarité cellulaire et les interactions des cellules souches avec les cellules à leurs alentours et/ou avec la matrice extracellulaire (Shmelkov et al, 2005).

## 1.5 Modèles cellulaires expérimentaux

### 1.5.1 HBMEC

Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (HBMEC) ont été utilisées comme premier modèle cellulaire d'origine cérébrale pour la présente étude des récepteurs aux facteurs plaquettaires. Cette lignée cellulaire exprime plusieurs marqueurs endothéliaux tels que le facteur VIII-Rag, l'anhydrase carbonique IV et l'ulix européen agglutinine. Une diminution de la fluorescence des lipoprotéines acétylées à faible densité (LDL) et de la gamma glutamyle transpeptidase (GGT) marquées témoigne du phénotype spécifique des cellules endothéliales cérébrales (Stins et al, 1997). Les HBMEC ont été immortalisées après infection par des rétrovirus recombinants pour le virus simiens 40 antigène grand T (SV-40LT). Les HBMEC maintiennent leurs caractéristiques fonctionnelles et morphologiques pendant 30 passages (Greiffenberg et al, 1998).

### 1.5.2 DAOY parentales et DAOY CD133(+)

La lignée cellulaire de médulloblastome DAOY est un bon modèle pour l'étude du comportement *in vitro* de cellules cancéreuses cérébrales pédiatriques mises en présence de facteurs plaquettaires ou en d'autres conditions mimant l'environnement tumoral. Les DAOY sont des cellules de médulloblastome cérébelleux desmoplastique. C'est une lignée cellulaire humaine hyper-tétraploïde qui a été établie en 1985 par P.F Jacobsen de l'Hôpital Royal de Perth à l'Ouest de l'Australie. Cette lignée cellulaire provient du matériel d'une biopsie effectuée à partir d'une tumeur de la région cérébrale postérieure d'un garçon de 4 ans. La tumeur originale possédait des caractéristiques de différenciation neuronale et gliale qui n'ont pas été retenues par la lignée cellulaire actuelle (selon l'ATCC- The Global Bioresource Center).

L'isolement des DAOY sur la base de l'expression du marqueur CD133, fournit une population sélective enrichie en CD133 et homologue aux CSC de médulloblastome qui semblent exprimer aussi le marqueur CD133 (Neuzil et al, 2007). Un enrichissement simple par tri cellulaire magnétique sur colonne MACS (voir section 2.2.11) à partir de la population de DAOY parentale, fournit une population de DAOY CD133(+) utile pour le ciblage d'une

population maligne de cellules souches mutées de médulloblastomes. Les DAOY CD133(+) sont un modèle ayant permis au cours de cette étude, d'observer quelques aspects du profil d'expression génique et protéique se manifestant lors de l'adaptation phénotypique des CSC de médulloblastomes.

### 1.6 Objectifs de la recherche

Le LPA est impliqué, dans le cadre de ses effets physiopathologiques, tout comme les facteurs de croissance, dans une panoplie d'activités critiques requises pour la formation et l'expansion tumorale telles l'oncogenèse (Li et al, 2010), la prolifération cellulaire et l'invasion cellulaire (Hu et al, 2008). Les activités du LPA, lorsque médiées par un récepteur, dépendent de la présence des récepteurs du LPA distribués dans divers tissus (Li et al, 2010). Toutefois, documenter davantage le rôle et l'implication des récepteurs LPAR<sub>1-5</sub> dans les compartiments endothéliaux vasculaires et tumoraux cérébraux, s'avère nécessaire dans un premier volet de l'étude. Ainsi, il devient intéressant d'identifier premièrement les récepteurs au LPA jouant un rôle déterminant dans l'acquisition des CE de la masse tumorale d'un phénotype distinct de leur pendant normal. En effet, ceci permettrait de cibler thérapeutiquement, via des mécanismes médiés par un ou des LPAR, les cellules endothéliales tumorales dans le traitement contre le cancer. Pour ce faire, les récepteurs au LPA impliqués dans l'adaptation au stress hypoxique ont été en premier lieu déterminés dans les HBMEC qui sont, à notre connaissance, le modèle *in vitro* le plus proche du phénotype et des fonctions propres aux CET, des composantes structurales et fonctionnelles importantes de la barrière hémato-encéphalique. Dans un deuxième temps, ce sont les récepteurs au LPA impliqués dans la résistance tumorale que nous avons étudiés dans le modèle de tumeur cérébrale de CSC CD133(+) de médulloblastome. Ainsi, les récepteurs au LPA impliqués dans le phénotype invasif des CSC pourraient servir de cible thérapeutique contre le cancer dans les cellules cancéreuses. En somme, mon projet de recherche, dans un premier volet, consistait à identifier les récepteurs au LPA-facteur de croissance plaquettaire-qui pourraient être une cible thérapeutique contre le cancer et ceci à la fois dans le compartiment vasculaire endothélial tumoral et dans les cellules cancéreuses. Pour ce faire, des essais de migrations avec ou sans invalidation de certains récepteurs au LPA ont été effectués à l'aide de la lignée

de HBMEC mais aussi une étude comparative du comportement migratoire stimulé au LPA et de l'expression génique des LPAR a été effectuée entre les DAOY CD133(-) et les DAOY CD133(+).

La progression tumorale est directement liée à la capacité d'adaptation des cellules cancéreuses à leur microenvironnement. Le manque d'oxygène ainsi que la déprivation en nutriments sont deux signatures du microenvironnement tumoral auxquelles les CSC semblent avoir une adaptation frappante : il a récemment été suggéré que cette capacité d'adaptation contribuait au phénotype de radio et de chimiorésistance des CSC (Olivotto et Sbarba, 2008). Une meilleure compréhension de la signature moléculaire des CSC en condition de stress, telle la déprivation en sérum clarifierait nos connaissances sur les mécanismes tumoraux à cibler. La sous-population de cellules cancéreuses de médulloblastome radio et chimio-résistante exprime abondamment le marqueur de surface CD133 et cette sous-population CD133(+) est pluripotente, prolifère de manière excessive et s'auto-renouvelle (Beier et al, 2008; Singh et al, 2004). Basé sur le fait que CD133 est un marqueur de surface des CSC et que son expression génique est accrue dans les tissus tumoraux cérébraux, nous avons voulu savoir si, en condition de déprivation de nutriments, d'autres partenaires moléculaires pouvaient contribuer au potentiel invasif des médulloblastomes. Nous avons donc tenté, dans un deuxième volet de l'étude, de trouver une corrélation spécifique de l'expression génique des membres de la famille des LRP à la réponse adaptative au stress, telle la déprivation en sérum, mais aussi de trouver un lien entre les expressions géniques et protéiques de LRP-1 et de CD133 à l'aide d'une lignée de médulloblastomes, les DAOY.

Mon projet de recherche comprend donc deux volets: identifier les récepteurs au LPA qui pourraient être une cible thérapeutique contre le cancer cérébral et ceci à la fois dans le compartiment vasculaire endothélial tumoral et dans les cellules cancéreuses et trouver d'autres partenaires moléculaires, les LRP, qui pourraient contribuer au potentiel invasif des médulloblastomes.

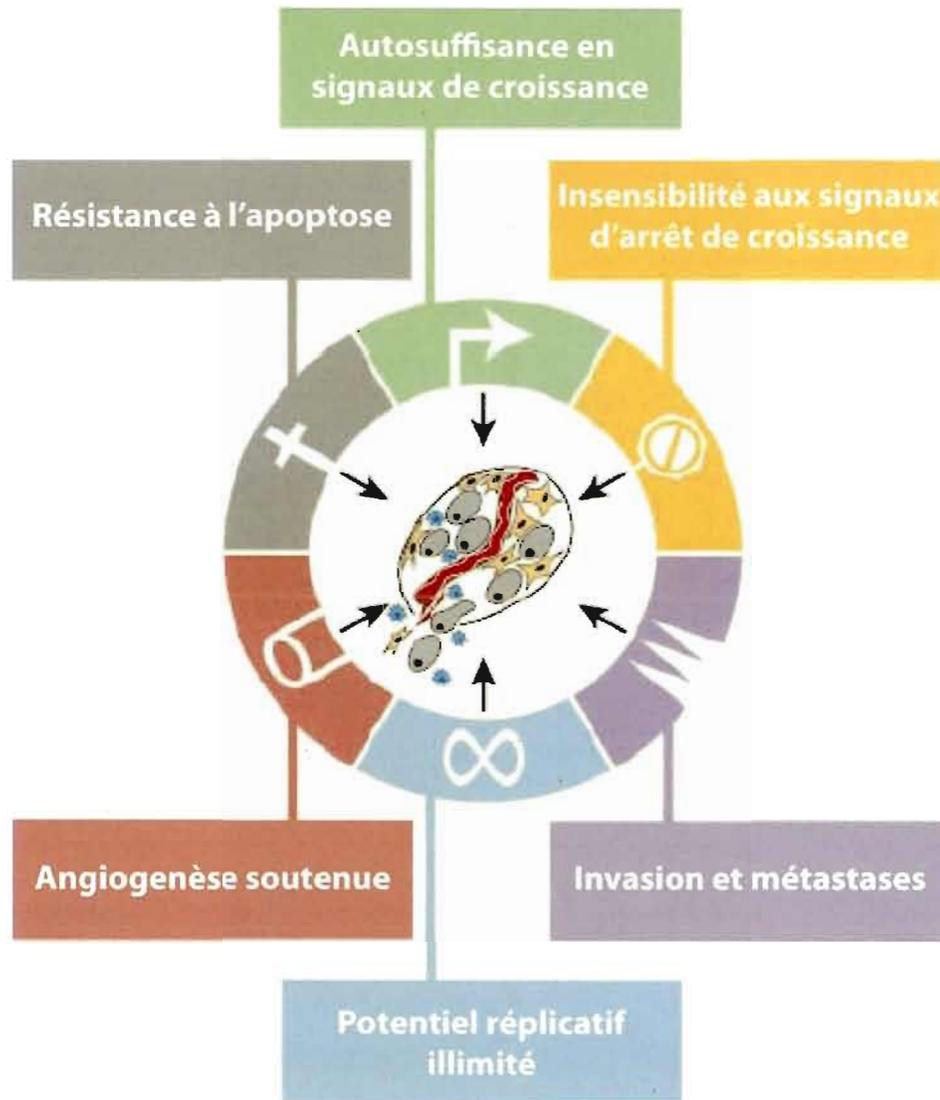


Figure 1.1 : Les six altérations du cancer

Les caractéristiques fonctionnelles acquises par la majorité des cellules cancéreuses sont : la résistance à l'apoptose, l'autosuffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'invasion tissulaire et les métastases, le potentiel répliatif illimité et l'angiogenèse soutenue (Adapté de Hanahan et Weinberg, 2000).

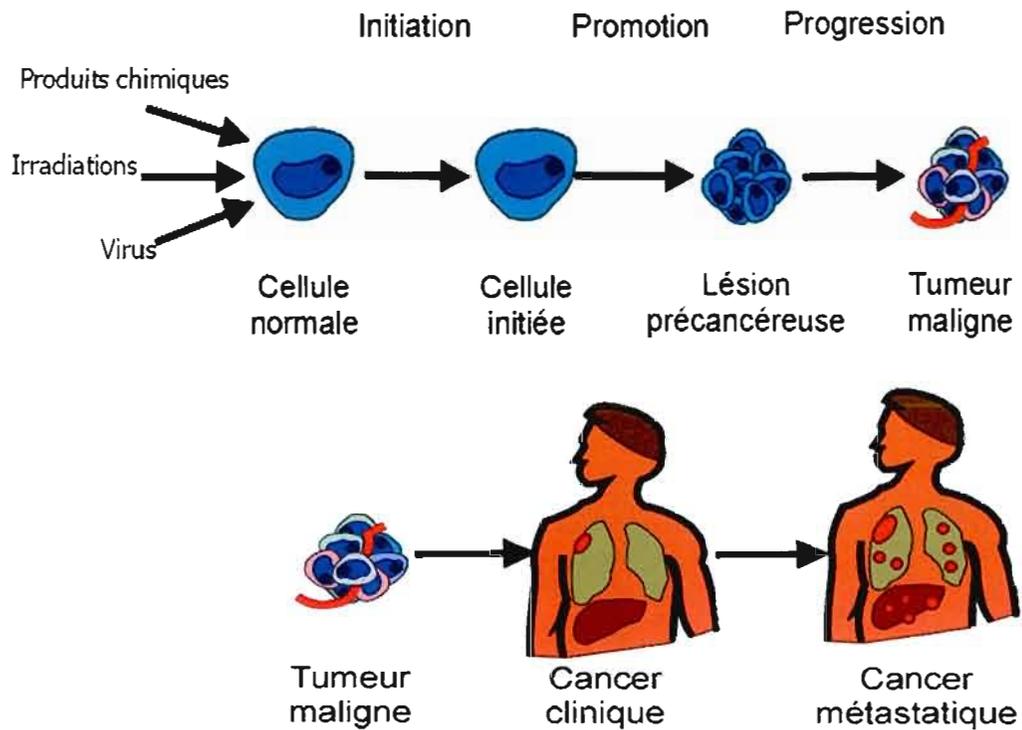
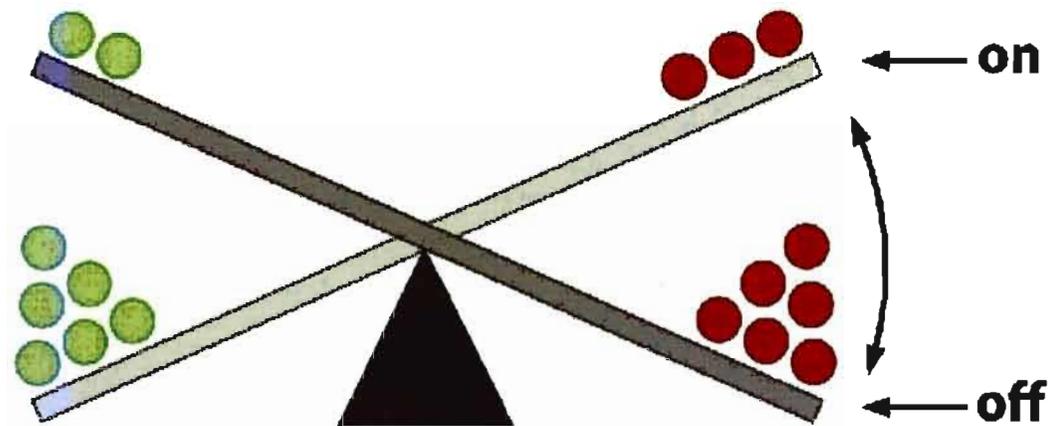


Figure 1.2 : L'évolution du cancer.

Tous les cancers suivent le même processus de développement malgré la variation des facteurs déclenchant. Ce processus se divise en trois grandes étapes : l'initiation, la promotion et la progression, jusqu'à l'apparition de tumeurs détectables cliniquement (Modifiée d'après Béliveau et Gingras, 2005).



 <b>Activateurs</b>	 <b>Inhibiteurs</b>
<b>VEGF -A</b>	<b>Thrombospondine-1,-2</b>
<b>VEGF- B, -C</b>	<b>Angiostatine</b>
<b>FGF1</b>	<b>Endostatine</b>
<b>FGF2</b>	<b>Collagène IV (fragment)</b>
<b>Autres FGFs</b>	<b>etc.</b>
<b>LPA</b>	
<b>S1P</b>	
<b>etc.</b>	

Figure 1.3 : La balance angiogénique.

Exemple de molécules endogènes activatrices et inhibitrices de l'angiogenèse. La balance nette détermine si les processus angiogénique aura lieu. L'endostatine par exemple est parmi les plus puissants inhibiteurs de la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Modifié de Weinberg, 2007).

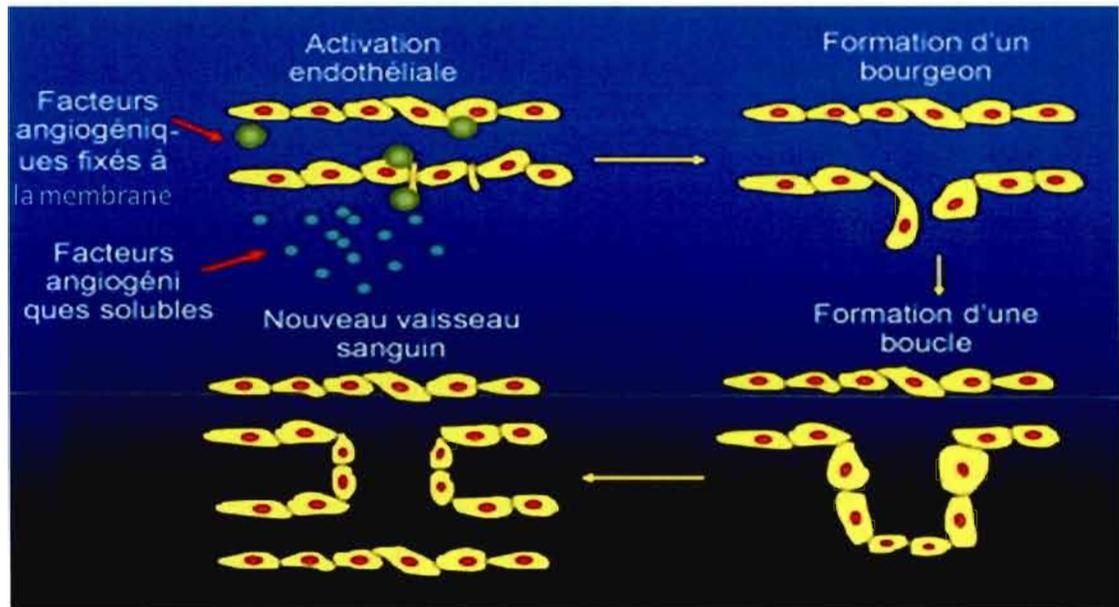


Figure 1.4 : Le processus de l'angiogénèse.

Les facteurs angiogéniques solubles et membranaires ciblent l'activation endothéliale, la formation de la lumière et des nouveaux vaisseaux (Adapté de Szekanecz, 2010).

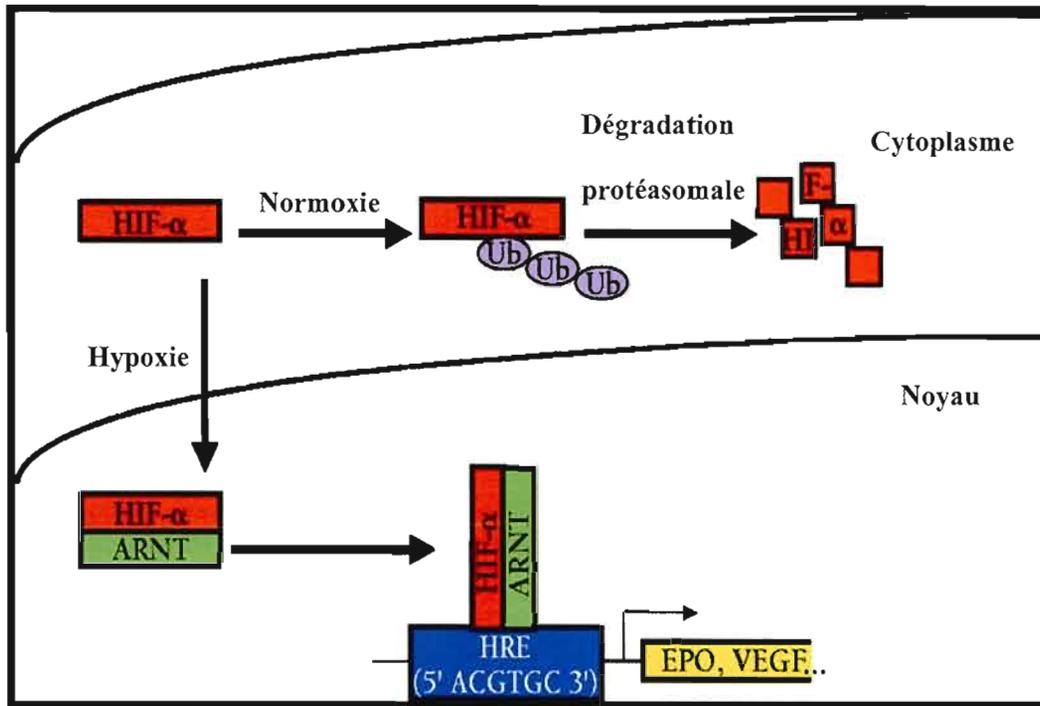


Figure 1.5 : Régulation par HIF-1 $\alpha$  de gènes induits en hypoxie.

En normoxie HIF-1 $\alpha$  est rapidement dégradé par la voie des ubiquitines (Ub) du protéasome. En hypoxie, HIF-1 $\alpha$  est stabilisé et se déplace du cytoplasme au noyau où il se complexe avec ARNT1 et HRE afin d'induire la transcription de gènes codants des facteurs pro-angiogéniques tel l'érythropoïétine et le VEGF (Modifié de Fedele et al, 2002).

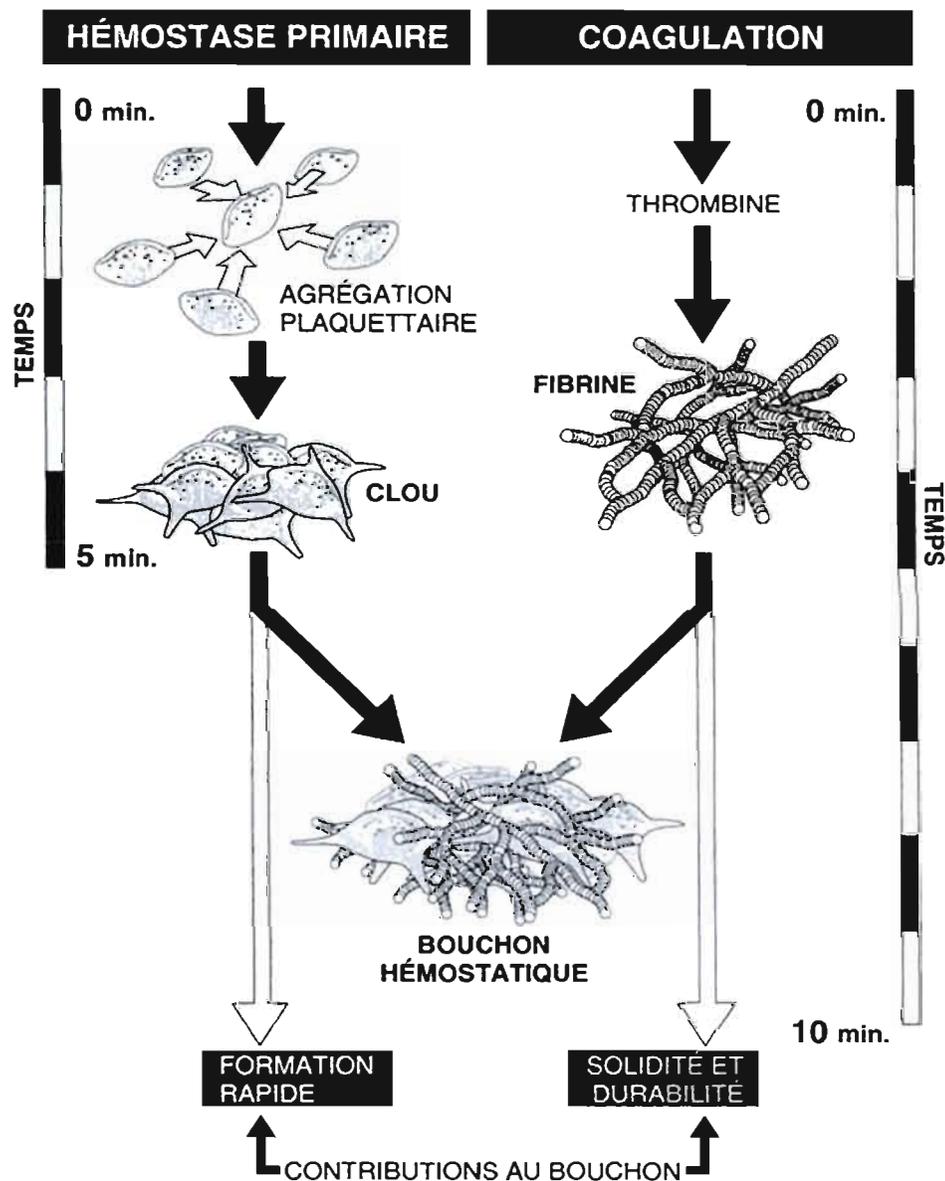


Figure 1.6 : L'hémostase.

La formation du bouchon hémostatique est le résultat d'une contribution de l'hémostase primaire et de l'hémostase secondaire dite aussi coagulation. Le clou plaquettaire hémostatique est le produit final instable de l'hémostase primaire. Une stabilisation du clou entraîne la formation du bouchon hémostatique fibrinoplaquettaire, c'est la coagulation (Adapté de Jobin, 1995).

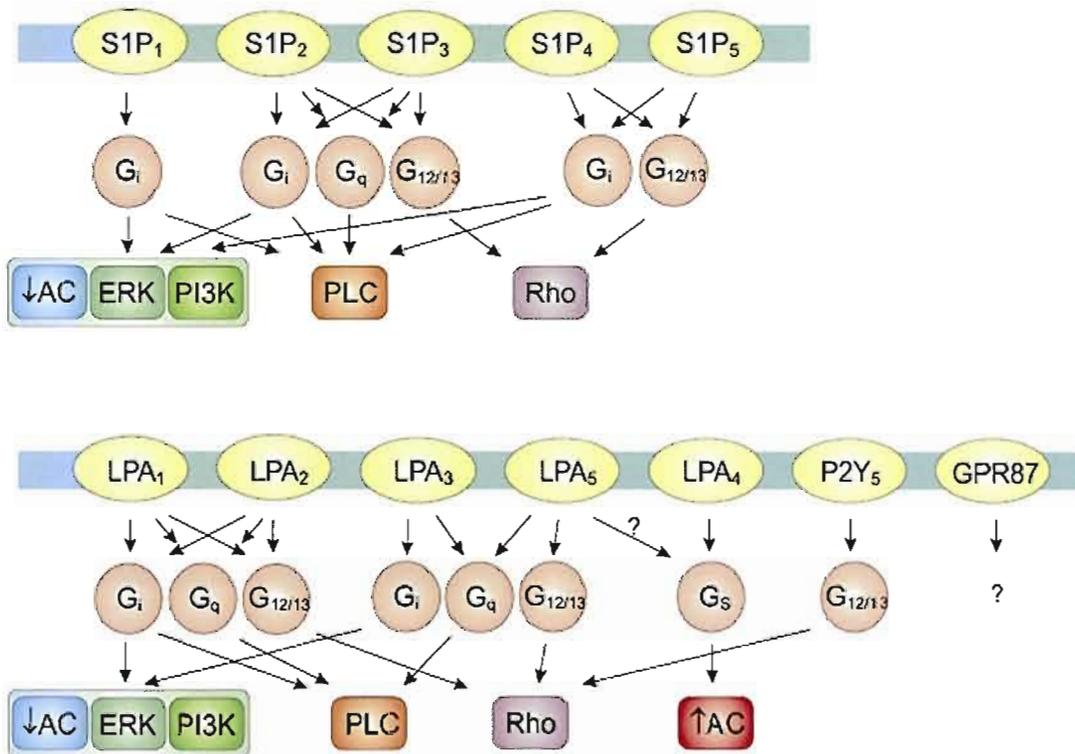


Figure 1.7 : Vue générale des voies de régulation signalétique de la S1P et du LPA.

Les voies de transduction mises en jeu en aval des récepteurs au LPA et à la S1P sont étroitement liées à la famille de protéine G impliquée. Les voies de signalisation générales régulées sont indiquées ci-dessus (Adapté de Pitson et Pébay, 2009).

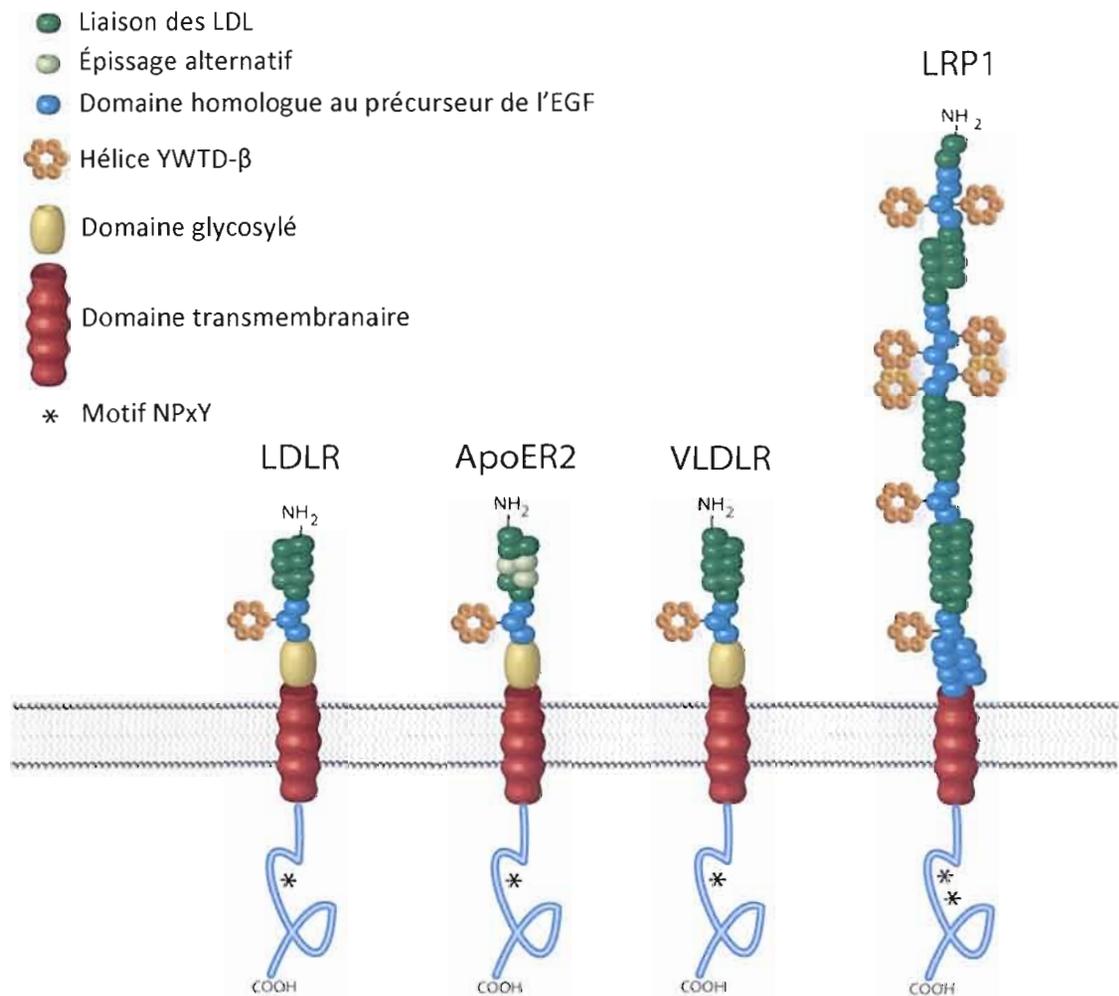


Figure 1.8 : **Membres de la famille des récepteurs au LDL.**

LDLR, ApoER2 ou encore LRP-8, VLDLR et LRP sont les principaux membres de la famille des récepteurs au LDL dans le système nerveux central des mammifères. Chaque membre est constitué d'un domaine transmembranaire, au moins un domaine de liaison au ligand, un domaine homologue au précurseur de l'EGF (epidermal growth factor), une hélice YWTD-β et un motif cytoplasmique NPxY (Adapté de Rebeck et al, 2006).

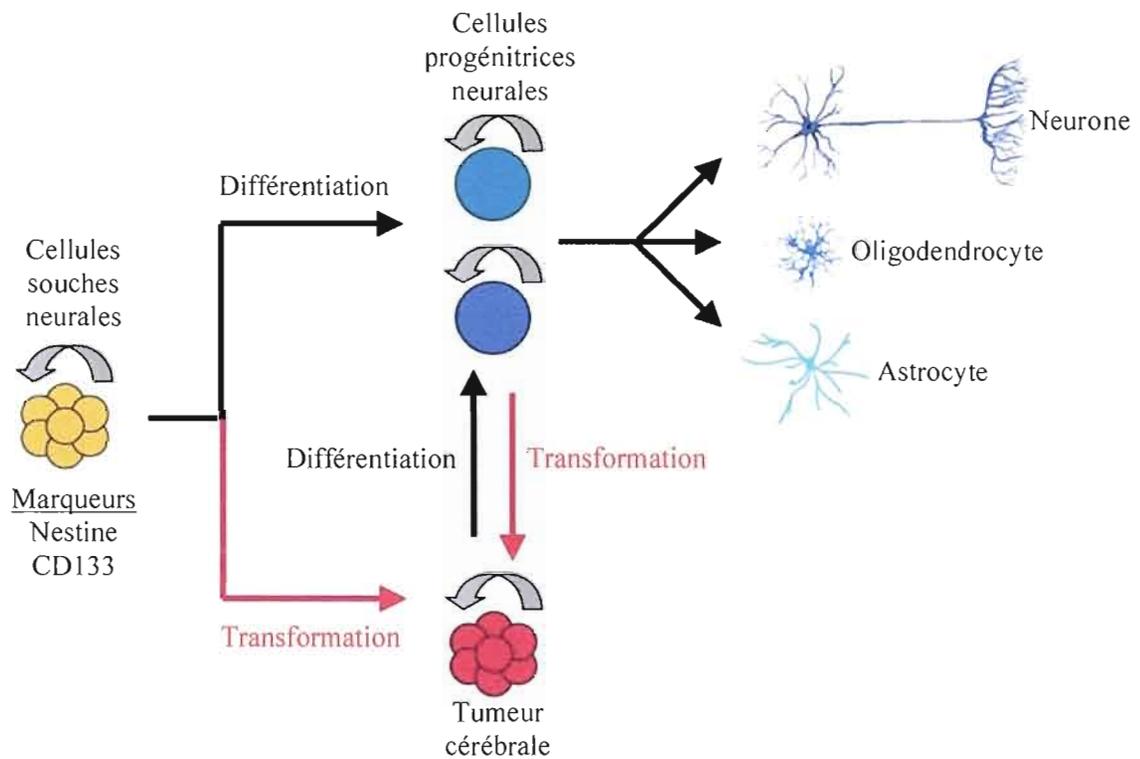


Figure 1.9 : Implication de cellules souches et/ou progénitrices dans l'émergence de tumeurs cérébrales.

De façon physiologique, les cellules souches se divisent et se différencient en cellules progénitrices. En conditions pathologiques, elles peuvent être les cibles de mutations aboutissant à la formation de tumeurs cérébrales. D'autre part, les cellules progénitrices peuvent, à leur tour, soit se différencier, soit subir des altérations géniques qui engendreront une genèse tumorale (Adapté d'Oliver et Wechsler-Reya, 2004).

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Matériel

Les milieux de culture, la streptomycine, la trypsine et le bicarbonate de sodium ont été obtenus de GibcoBRL Life Technologies (Burlington, ON) et les sérums de Hyclone Laboratories (Logan, UT). La migration cellulaire est effectuée sur des inserts -8 µm provenant de Costar (Coming, NY). Les anticorps dirigés contre pERK (#4695), ERK (#9106) sont de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). L'anticorps CD133 est un anticorps polyclonal de lapin contre le peptide synthétique (KDHVYGIHNPVMTSPSQH) correspondant à la partie c-terminale des acides aminés 848-865 (ab16518, Abcam, Cambridge, MA). L'anticorps anti-LRP-1(85kDa) (ab20384) provient d'Abcam, Cambridge, MA. L'anticorps anti-GAPDH (#sc-47724) provient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris couplés à la peroxydase de raifort proviennent de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Le réactif de chimioluminescence (ECL) provient de PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Les produits d'électrophorèse (acrylamide, TEMED, APS) proviennent de Bio-Rad (Mississauga, ON). Les échantillons protéiques sont dosés par micro-BCA (Pierce, Rockfort, IL). L'extraction de l'ARN total est réalisée à l'aide de TRizol (Invitrogen, Burlington, ON). La synthèse d'ADNc à partir de l'ARN total est effectuée à l'aide d'Oligo dT fournis dans l'ensemble iScript cDNA synthesis reverse transcriptase (Applied Biosystems, cal. #4368813, Beverly, MA) tandis que la PCR en temps réel est effectuée à l'aide de SYBGREEN (Bio-Rad, cal. # 170-8882, Mississauga, ON). Tous les autres réactifs qui n'ont pas été spécifiquement nommés proviennent de chez Sigma-Aldrich (Canada).

#### 2.2 Méthodes

##### 2.2.1 Culture cellulaire

Les HBMEC utilisées dans le cadre de cette étude ont été caractérisées et généreusement fournies par le Dr. Kwang Sik Kim de l'école de médecine de l'université de Johns Hopkins (Baltimore, MD). Les HBMEC sont cultivées à 37°C sous une atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air dans le milieu RPMI 1640 (Gibco, Burlington, ON) contenant 10% (v/v) sérum foetal bovin inactivé (SFBi) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 10 % (v/v) NuSérum (BD Bioscience, Mountain View, CA), vitamines MEM 1% (v/v) (Gibco, Burlington, ON), acides aminés non essentiels MEM 1% (v/v) (Gibco, Burlington, ON), sodium pyruvate 1mM (Sigma-Adrich, Canada) et un supplément de croissance de cellules endothéliales à 30 flg/ml (Milipore, Temecula, CA). Les HBMEC sont utilisées du passage 3 au passage 25. La lignée cellulaire de DAOY de médulloblastome humain provient de American Type Culture Collection et a été maintenue dans du milieu MEM contenant 10% (v/v) de sérum de veau (CS), 2 mM glutamine, 100 unités/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine.

### 2.2.2 Migration cellulaire

La migration des HBMEC et des DAOY est effectuée sur des inserts de 6,5 mm de diamètre, lesquels sont également appelés chambre de Boyden. Ils sont munis d'un filtre comportant des pores de 8 µm et sont disposés sur une plaque de 24 puits. Tout d'abord, les chambres sont préalablement revêtues de gélatine (0,15%) (p/v) pour les DAOY ou de collagène (0,2%) (p/v) pour les HBMEC durant une heure à 37 °C. Durant cette période d'incubation, les cellules à confluence sont trypsinisées et resuspendues dans du milieu de culture sans sérum RPMI ou MEM selon la lignée à l'étude afin d'obtenir une concentration contenant le nombre correspondant de cellules (ce nombre est indiqué sous chacune des figures d'essai de migration cellulaire). Par la suite, 600 µl du milieu de culture contenant différentes concentrations de S1P ou de LPA sont déposés dans la partie inférieure des puits. Puis, 100 µl des suspensions cellulaires sont déposés sur la partie supérieure de l'insert et la migration a été initiée à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Pour les migrations se déroulant en hypoxie, elles ont été initiées dans une boîte anaérobique où l'oxygène a été maintenu à 1% par un contrôleur d'oxygène, le modèle Proox 110 (Reming Bioinstruments Co., Redfield, NY), et ceci avec un résidu d'un mélange de gaz contenant 94% N<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>. À la fin de cette période d'incubation, la migration est arrêtée après 24

heures et les cellules sont fixées à l'aide d'une solution 10% de formaline phosphate, puis colorées au crystal violet (0,1%) dans 20% méthanol durant une heure. Finalement, les cellules ayant migré sur la portion inférieure des filtres sont comptabilisées par analyse microscopique à un agrandissement 10 X à l'aide du logiciel Northern Eclipse. Ces valeurs correspondent en fait à la moyenne des cellules présentes dans quatre champs représentatifs pour chaque condition obtenus à un grossissement de 5X.

### 2.2.3 Lyse cellulaire

Les cellules sont cultivées dans des pétris de 60 mm<sup>3</sup> jusqu'à atteindre 85% de confluence, elles sont sevrées 1 heure, puis traitées avec 10 µM LPA pour la cinétique avec les cellules HBMEC, 1 µM pour celle des DAOY et avec différentes concentrations de LPA pour la dose réponse des HBMEC. Pour ce qui est de l'expérience de sevrage (0, 1, 2, 3, 4 et 5 jours en présence ou absence de sérum 20%) avec les DAOY, les cellules on été cultivées jusqu'à atteindre 85% de confluence. Après le traitement, les cellules sont décollées à l'aide d'un policeman puis centrifugées pendant 5 minutes à 5, 000 rpm. Elles sont ensuite lavées à l'aide d'une solution de PBS froid (pH 7.4) et centrifugées à 5,000 rpm durant 5 minutes. Le culot cellulaire obtenu est lysé durant 30 minutes sur glace dans une solution contenant du Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), du NaCl 150 mM, du Triton X-100 1%, du NP-40 0,5%, de l'EDTA 1mM, du Vanadate de sodium 0,2 mM et du PMSF 0,2 mM. Les débris cellulaires sont enlevés par une centrifugation à 10, 000 rpm de 30 minutes à 4°C.

### 2.2.4 Dosage des protéines selon la méthode de microBCA

Le contenu protéique des lysats cellulaires est quantifié par microBCA selon les directives du fabricant (Pierce). Plus précisément, la quantité de protéines a été dosée selon la méthode de MicroBCA en utilisant différentes concentrations d'albumine sérique bovine (BSA) pour tracer la courbe standard. 150 µl de chaque échantillon et des solutions standards ont été ajoutés à 150 µl du réactif de MicroBCA dans une plaque de 96 puits. Par la suite, la plaque a été incubée à 37°C pendant 2 heures. Finalement, le produit de réaction pourpre formé par une liaison de coordination a été mesuré à une longueur d'onde de 562 nm.

### 2.2.5 Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage

Une quantité de 20µg de protéines pour chaque échantillon est ensuite resuspendue dans le tampon d'électrophorèse Laemmli, 1970 (62,5 mM de TrisHCl à pH 6,8, 10% de glycérol, 2% de sodium dodécylsulfate (SDS), 5% de β-mercaptoéthanol et 0,01 % de bleu de bromophénol). Les échantillons sont incubés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être soumis à l'électrophorèse. Les gels d'entassement sont composés de 3.8% de polyacrylamide/bisacrylamide dissout dans une solution tampon 0,125 M de Tris-HCl (pH 6.8), 0,1% SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS tandis que le pourcentage de polyacrylamide/bisacrylamide varie pour les gels de séparation en fonction de la protéine d'intérêt. Le tampon de séparation est composé de 0,375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0,1 % SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. Suite à l'électrophorèse, les protéines ont été transférées (transfert semi-sec) sur des membranes de *PolyVinylidene DiFluoride* (PVDF) de 0,45 µm de mesh à 1 mA/cm<sup>2</sup> durant 90 minutes en présence de tampon de transfert (96 mM de glycine, 10 mM de Tris et 10% de méthanol). Les membranes de PVDF ont été incubées, par la suite, dans une solution Blotto constituée de Tris Balance Solution (TBS) et de 5% de lait écrémé (TBS; 50 mM de Tris et 150 mM de NaCl à pH 7,0) durant 1 heure à température pièce ou toute la nuit à 4°C pour bloquer les sites possibles de réaction croisée non spécifique.

### 2.2.6 Immunodétection des protéines

Les membranes subissent par la suite trois lavages successifs de 15 minutes dans du TBS-Tween 0,3% et sont incubées avec une dilution de l'anticorps primaire dans une solution de TBS-Tween à 0,3%, à 3% d'albumine sérique bovine (BSA) et 0,02% de sodium azide toute la nuit à 4°C. Après trois autres lavages, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire respectif (1/2500) conjugué à la HRP dans du TBS-Tween 0.3% contenant 5% de lait en poudre durant une heure à température pièce sous agitation constante. La membrane de PVDF est par la suite mise en contact avec un milieu d'ECL (*enhanced chemiluminescence*) contenant du luminol, du 4-iodophénol et de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La HRP conjugué à l'IgG

anti-souris ou anti-lapin fabriquera des radicaux libres à partir de l'eau oxygénée. Ceux-ci sont très efficacement captés puis transmis au luminol qui est alors oxydé en un composé sous son état excité, qui émettra alors des photons lors de sa désactivation. Les photons émis sont alors détectés par un film photographique (autoradiographie).

#### 2.2.7 Extraction de l'ARN total

Les cellules HBMEC et DAOY sont cultivées dans des pétris de 60 mm<sup>3</sup> jusqu'à atteindre 85% (pour la PCR quantitative en temps réel) et dans des plaques de 6 puits à 50% de confluence (pour la validation de la transfection des HBMEC par PCR quantitative en temps réel). L'ARN total des cellules est isolé en utilisant 1 ml de TRIzol<sup>®</sup>, conformément aux instructions du fabricant (Invitrogen). Le culot d'ARN obtenu a été solubilisé dans 20 µl d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) et dosé à 260 et 280 nm. La pureté de l'échantillon a été évaluée à partir du ratio 260 nm/280 nm de la densité optique obtenue. Une valeur supérieure ou égale à 1.6 indique que la préparation d'ARN possède un faible taux de contamination protéique. Les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

#### 2.2.8 RT-PCR semi-quantitative

Environ 1 µg d'ARN total est extrait des cellules et amplifié avec le Superscript<sup>™</sup> OneStep-RT-PCR with Platinum<sup>®</sup> Taq, en utilisant des amorces spécifiques construites pour les ADNc humains LPAR-1, LPAR-2, LPAR-3, LPAR-4, LPAR-5, LRP-1, -1b, -2, -5, -8, LDL-R, vLDL-R et CD133. La réaction enzymatique a débuté par la transcription inverse de l'ARN en ADNc. Les gènes GAPDH ou 18S sont utilisés comme étalon interne. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,8 % (p/v). Les gels d'agarose sont coulés dans un tampon Tris-Acétate (TAE) contenant du bromure d'éthidium. Les amplicons sont visualisés sous une lumière d'ultra-violet (UV).

#### 2.2.9 PCR quantitative en temps réel

Environ 1  $\mu\text{g}$  d'ARN est utilisé pour la synthèse d'ADNc par transcription inverse (RT) à l'aide du kit d'ADNc pour transcription inverse à haute capacité (Applied Biosystems, Foster City, CA) dans un volume réactionnel de 25  $\mu\text{l}$ . La réaction de RT est réalisée selon le programme suivant: 25 °C pendant 10 minutes; 37°C pendant 120 minutes et 85°C pendant 5 secondes. Ensuite, l'ADNc est utilisé pour réaliser la PCR quantitative. Au début de la PCR, les brins complémentaires sont dénaturés en chauffant les échantillons à 95°C pendant 3 minutes. L'amplification des ADNc d'intérêts s'est déroulée pendant 40 cycles. Chacun des cycles comprenait un chauffage à 95°C pendant 15 secondes afin de séparer les brins, puis la température s'abaissait à 60°C pendant 1 minute pour permettre l'appariement des amorces sur le brin matrice, finalement la température s'élevait à 72 °C durant 30 secondes afin de permettre l'élongation du brin complémentaire par la Taq Polymérase. L'amplification des ADNc est mesurée par fluorescence en utilisant un Icyler (Bio-Rad, Hercules, CA). Cet appareil détecte la fluorescence générée par le SYB Green (Bio-Rad, Hercules, CA) qui s'intercale dans l'ADN double brin formé lors de la réaction de PCR. La quantité relative de l'ARNm du gène cible par rapport au contrôle interne, l'ARNm 18S ribosomal ou GAPDH, est calculée par la méthode ( $\Delta C_T$ ). Au cours de la réaction enzymatique, le logiciel d'exploitation des données IQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA) affiche un graphique du signal de fluorescence versus le nombre de cycles au cours de la PCR en temps réel. Finalement, les différences entre les valeurs moyennes en duplicata et ceux du contrôle interne ( $\Delta C_T$ ) sont également calculées et exprimées en unité relative par le logiciel.

#### 2.2.10 Transfection

Afin de déterminer si les récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 jouent un rôle dans le processus de migration cellulaire des HBMEC, une transfection des ARN interférents si-LPAR-1 et si-LPAR-3 a été effectuée sur ces dernières. L'efficacité de la transfection a été validée par PCR quantitative en temps réel et l'effet de cette transfection a été évalué en migration cellulaire. Les cellules HBMEC ont été transfectées transitoirement à l'aide de l'agent de transfection lipidique cationique Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen). Les ARN interférents si-LPAR-1 (SI00376229), si-LPAR-3 (SI00097545) et si-ARN à séquence aléatoire (contrôle négatif d'AllStar 1027281) sont à 20 nM (Qiagen). Les directives du fabricant ont été suivies. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et

transfectées lorsqu'elles ont atteint une confluence entre 50 à 90%. Pour la transfection, 10 µl de chacun des siARN a été resuspendu dans 125 µl de milieu négatif par condition. Le tout a été mélangé par inversion et laissé à reposer 5 minutes à température pièce. Pour la préparation de la lipofectamine, 20 µL de cette dernière et 250 µL de milieu négatif sont mélangés par inversion par condition. On a laissé reposer 5 minutes à température pièce. La moitié du mélange de lipofectamine a été transféré dans le tube de siARN et on a laissé réagir 45 minutes à température pièce. Un volume de milieu RPMI sans sérum égal à celui retiré du tube de préparation de la lipofectamine y est ajouté. Le milieu a été aspiré à partir de chaque puits de cellules et 750 µL de milieu positif ont été ajoutés à chaque puits. Enfin, 250 µL du mélange siRNA/lipofectamine, ou lipofectamine seulement a été ajouté goutte à goutte. L'incubation a duré 24 heures, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.11 Enrichissement des cellules CD133(+) par tri cellulaire magnétique sur colonne MACS

Le marquage magnétique a été fait selon le guide du fournisseur MACS (Miltenyi Biotec) CD133 MicroBead Kit human # 130-050-801. À cette étape, les cellules CD133(+) ont été marquées à l'aide d'un anticorps anti-CD133 couplé à une bille magnétique. Ensuite, la séparation magnétique a été faite sur une colonne LS et un séparateur MACS (Miltenyi Biotec) sous une hotte biologique. À cette étape, sous un champ magnétique intense, seules les cellules CD133(+) marquées sont retenues dans la colonne alors que les autres cellules non marquées ne sont pas retenues. Après la séparation de la colonne du champ magnétique, les cellules sont éluées et représentent la fraction cellulaire enrichie en marqueur CD133. À noter que les cellules non retenues par la colonne sont utilisées comme modèle de DAOY CD133(-).

#### 2.2.12 Cytométrie de flux

La pureté de la fraction de cellules CD133(+) a été vérifiée par la technique d'immunofluorescence directe. La technique directe implique l'utilisation d'un seul type d'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine d'intérêt. Cet anticorps est conjugué à une

molécule fluorescente qui une fois excitée réémet une lumière qui sera quantifiée par le cytomètre de flux. La technique directe permet une détection de faible à moyenne intensité avec peu de réactions non spécifiques, tandis que la technique indirecte assure une détection forte mais un risque beaucoup plus élevé de réactions non spécifiques. Pour ce faire, le marquage magnétique a été fait avec 100  $\mu$ l de microbilles AC133 (CD133/1) par  $10^8$  cellules pour 30 minutes à 4 °C utilisant le kit d'isolation directe de Biotec Miltenyi CD133. 50  $\mu$ l de 293C3 (CD133-2)-phycoérythrine (fluorochrome conjugué au IgG2b monoclonal de souris; Miltenyi Biotec) a été ajouté pour un supplément de 10 min à 4 °C. La fluorescence associée à 10, 000 cellules a été mesurée au cytomètre de flux FACSCalibur (BD Biosciences). Les résultats obtenus furent analysés avec le logiciel *CellQuest Pro software* (Becton Dickinson).

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1 Réponse aux facteurs plaquettaires dans les cellules endothéliales cérébrales

##### 3.1.1 Comparaison du comportement migratoire des HBMEC en réponse au S1P et au LPA

Le LPA, qui est un lipide biologiquement actif, présente une activité *in vitro* de type facteur de croissance en stimulant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Peyruchaud et al, 2005). La migration des cellules endothéliales humaines microvasculaires cérébrales (HBMEC) va en augmentant en réponse à des concentrations croissantes de S1P et de LPA: en allant de 0.1, 1 à 10  $\mu\text{M}$  de S1P, la migration basale augmente de 10, 100 à 120 fois; en allant de 0.1, 1 à 10  $\mu\text{M}$  de LPA, celle-ci augmente de 10, 150 à 250 fois. Il y a ainsi, une relation dose-réponse entre la migration des HBMEC et la dose de chemo-attractant S1P ou LPA utilisée. Le LPA 10  $\mu\text{M}$  entraîne 2.08 fois plus la migration des HBMEC que le S1P à cette même dose. Le potentiel migratoire des HBMEC est directement proportionnel à la concentration de chemo-attractant utilisée. En plus, la réponse migratoire la plus accrue est celle en réponse au LPA par rapport au S1P (figure 3.1).

##### 3.1.2 Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases avec le LPA

Il est très probable qu'une réponse migratoire accrue au LPA puisse être expliquée par une activation de la voie des MAP kinases par le LPA. Pour ceci une cinétique de stimulation au LPA 10  $\mu\text{M}$ , qui était la dose de réponse migratoire maximale des HBMEC, a été faite (figure 3.2-A). Après 2 minutes de stimulation au LPA 10  $\mu\text{M}$ , on observe une phosphorylation initiale d'ERK qui atteint 3.5 fois plus que le niveau contrôle (figure 3.2-B). Cependant, la phosphorylation maximale est atteinte après 4 minutes de stimulation au LPA 10  $\mu\text{M}$  et est de 4.5 fois plus que le niveau contrôle non stimulé. Cette cinétique de stimulation justifie encore une fois la sensibilité des HBMEC au LPA.

### 3.1.3 Comparaison du comportement migratoire stimulé au LPA en normoxie et en hypoxie

Afin d'explorer l'effet du LPA en milieu hypoxique sur les cellules endothéliales cérébrales (HBMEC), une migration en normoxie versus une autre en hypoxie ont été lancées durant 24 heures. À la figure 3.3-B, le graphique indique que les HBMEC stimulés à 10  $\mu\text{M}$  de LPA et qui sont en normoxie, ont migré de 220 fois plus que leur contrôle (barre blanche). D'un autre côté, les HBMEC stimulés à 10  $\mu\text{M}$  de LPA et qui sont en hypoxie, ont migré de 600 fois plus que leur contrôle (barre noire). Ceci montre que le LPA stimule de beaucoup la migration des HBMEC que ce soit en normoxie ou en hypoxie. En comparant le comportement migratoire des cellules en normoxie versus en hypoxie, il semblerait que les HBMEC stimulés à 10  $\mu\text{M}$  de LPA aient migré 2.7 fois plus en hypoxie qu'en normoxie. Ceci permet de confirmer que des conditions hypoxiques augmentent la capacité de migration des HBMEC en réponse au LPA.

## 3.2 Étude des récepteurs du facteur plaquettaire LPA dans les cellules endothéliales cérébrales

### 3.2.1 Comparaison du profil d'expression génique des récepteurs au LPA en normoxie et en hypoxie

Afin de compléter l'étude en conditions hypoxiques et voir si certains récepteurs au LPA pourraient être impliqués plus que d'autres dans le phénotype invasif des cellules endothéliales cérébrales, nous avons isolé l'ARN total de HBMEC qui avaient été incubées 24 heures à 37°C sous une atmosphère humide à 5 % de  $\text{CO}_2$  et 95 % d'air (normoxie-contrôle) et celui de HBMEC qui avaient été incubées 24 heures à 1% d'oxygène (hypoxie), pour en voir l'expression génique des récepteurs LPAR-1, LPAR-2, LPAR-3, LPAR-4 et LPAR-5 et du facteur de réponse à l'hypoxie HIF-1 $\alpha$  par PCR quantitative en temps réel. À la figure 3.4-A, on peut voir sur gel d'agarose la présence d'une bande d'amplicon unique d'ADNc qui est le produit d'une RT-PCR semi-quantitative, confirmant la capacité d'amplifier les récepteurs au LPA, LPAR-1, LPAR-2, LPAR-3 et LPAR-5, dans les HBMEC. À la figure 3.4-B, le profil d'expression génique généré par PCR en temps réel nous permet de voir d'abord que le gène HIF-1 $\alpha$  s'exprime 2 fois plus en condition hypoxique ce qui

confirme le déroulement de l'expérience en hypoxie. On y observe aussi que les gènes des récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 sont surexprimés en condition hypoxique par rapport à la condition normoxique. En effet, les récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 s'expriment respectivement 4.5 et 2.5 fois plus en hypoxie qu'en normoxie.

### 3.2.2 Validation des ARN interférents si-LPAR-1 et si-LPAR-3

Comme il a été démontré par PCR quantitative en temps réel (figure 3.4-B) que les récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 sont surexprimés en condition hypoxique, nous avons envisagé de continuer l'étude de ces récepteurs en transfectant la lignée cellulaire HBMEC avec le contrôle négatif et les ARN interférents suivants : si-LPAR-1 et si-LPAR-3 pour en voir ultérieurement l'effet sur la migration des HBMEC. Pour ce faire, il fallait valider par la PCR en temps réel l'efficacité d'inhibition des si-LPAR-1 et si-LPAR-3. Ce type d'analyse est dit quantitatif et normalise l'expression d'un gène d'intérêt par rapport à celle d'un gène rapporteur, PPIA (peptidylprolyl isomerase A), dont l'expression n'est pas modulée par les conditions expérimentales. Cette méthode a permis de valider qu'effectivement, après la transfection des HBMEC par les si-LPAR-1 et si-LPAR3, il y a une diminution de l'expression génique du récepteur LPAR-1 de 70% (figure 3.5) par rapport au contrôle négatif et de 90% pour le récepteur LPAR-3 toujours par rapport au contrôle. L'efficacité des si-LPAR-1 et si-LPAR-3 est confirmée et ceci a permis d'entreprendre l'expérimentation de la migration des HBMEC transfectées par les si-LPAR-1 et si-LPAR-3.

### 3.2.3 Effet de l'invalidation des récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 sur la migration cellulaire

La migration cellulaire contrôle des HBMEC (figure 3.6-A) stimulées au LPA 10  $\mu$ M, a diminué une fois transfectées avec les si-LPAR-1 et si-LPAR-3. Cette observation est vraie tant en normoxie qu'en hypoxie. Ainsi, en normoxie, la migration contrôle des HBMEC a diminué de 90% et de 95% respectivement une fois transfectées avec les si-LPAR-1 et 3. En hypoxie, la migration contrôle a diminué de 67% et de 78% respectivement avec les transfections des si-LPAR-1 et si-LPAR-3. Ceci ne fait que confirmer l'importance des récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 dans la migration cellulaire stimulée au LPA.

### **3.3 Réponse aux facteurs plaquettaires des cellules dérivées de médulloblastome DAOY**

#### **3.3.1 Comparaison du comportement migratoire des DAOY CD133(-) et DAOY CD133(+) en présence de LPA et de S1P**

Nous avons voulu tester aussi la réactivité aux facteurs plaquettaires S1P et LPA de la lignée DAOY de médulloblastome CD133(-) en comparaison avec celle des DAOY CD133(+). Donc, cette étude est aussi une étude comparative de la migration des cellules CD133(-) et CD133(+) qui a été effectuée afin d'évaluer la migration basale de chaque lignée cellulaire ainsi que la capacité de chacun des chemo-attracteur S1P ou LPA à stimuler davantage ce processus. La migration des DAOY CD133(-) est de 2.4, de 4.05 et de 3.64 fois plus élevée à 0.1, 1 et 10  $\mu$ M de LPA respectivement par rapport à la migration basale. Avec cette même lignée, mais cette fois-ci avec le S1P comme chemo-attractant, la migration est de 1.68, 2.6 et 1.67 fois plus élevée que la migration contrôle. Donc, que ce soit pour la migration avec le LPA ou le S1P, la migration des DAOY CD133(-) en fonction des concentrations croissantes de LPA et de S1P semble emprunter l'allure d'une courbe gaussienne (figure 3.7-B). Avec les DAOY CD133(+), la migration à 0.1, 1 et 10  $\mu$ M de LPA est de 4.66, 6.39 et 4.81 fois respectivement plus élevée que la migration basale. Avec cette même lignée, la migration au S1P ne semble pas augmenter de plus de près de 2 fois que la migration basale quelque soit la concentration de S1P utilisée dans le milieu. En conclusion, la migration des deux lignées est la plus stimulée en réponse au LPA 1  $\mu$ M. À cette même concentration de LPA, on observe aussi que la lignée DAOY de médulloblastome CD133(+) migre 1.6 fois plus que la lignée de DAOY CD133(-).

#### **3.3.2 Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases avec le LPA dans les DAOY CD133(-) et les DAOY CD133(+)**

Comme il semble que les cellules DAOY CD133(+) auraient une plus grande sensibilité au LPA que les DAOY CD133(-), il nous fallait confirmer ceci par l'effet du LPA dans les DAOY CD133(+) sur l'activation de la voie d'ERK. Pour ceci, une cinétique de stimulation au LPA 1  $\mu$ M, qui était la dose de réponse migratoire maximale des DAOY

CD133(-) et CD133(+), a été faite (figure 3.8-A). La détection initiale de phosphorylation d'ERK (figure 3.8-A, panneau P-ERK) chez les DAOY CD133(-) est observé après 2 minutes de stimulation au LPA alors que celui des DAOY CD133(+) l'est après 1 minute seulement. Ceci montrerait une réponse précoce au LPA par les DAOY CD133(+) par rapport aux CD133(-).

Le pic optimal de phosphorylation d'ERK est atteint après 4 minutes que ce soit chez les DAOY CD133(-) ou CD133(+), cependant, la réponse est de 34 fois plus élevée que l'essai non stimulé chez les DAOY CD133(+) comparativement à 14 fois seulement pour les DAOY CD133(-) par rapport à l'essai non stimulé. Il est à noter aussi que la phosphorylation optimale observée après 4 minutes a été maintenue jusqu'à 8 minutes chez les DAOY CD133(+) comparativement à 6 minutes seulement pour les DAOY CD133(-).

### 3.3.3 Expression génique des récepteurs au LPA dans les cellules DAOY CD133(+)

On peut voir sur gel d'agarose (figure 3.9-A) la présence d'une bande d'amplicon unique d'ADNc qui est le produit d'une RT-PCR semi-quantitative pour chacun des récepteurs LPAR-1, LPAR-2, LPAR-3 et LPAR-5, confirmant la capacité d'amplifier les récepteurs au LPA dans les DAOY. À la figure 3.9-B, le profil d'expression génique généré par la PCR en temps réel montre que les DAOY CD133(+) surexpriment par rapport aux DAOY CD133(-) tous les récepteurs au LPA plus particulièrement LPAR-2 (3.5 fois plus) et LPAR-4 (6.5 fois plus). Ce résultat pourrait expliquer la migration plus invasive des DAOY CD133(+) observée à la figure 3.8 de même que la phosphorylation précoce ainsi qu'accrue d'ERK lors de l'activation de la voie des MAP kinases par le LPA.

### 3.3.4 Effet de la déprivation de sérum sur le profil d'expression génique des LRP dans les DAOY de médulloblastome

Afin d'explorer l'effet des facteurs de croissance et plaquettaire autre que le S1P ou le LPA, une étude de sevrage fut réalisée commençant par une déprivation de sérum sur la lignée DAOY. Ce début d'étude cherchait à établir aussi une certaine corrélation entre

l'expression du marqueur CD133 caractérisant les DAOY CD133(+) et une autre famille de récepteur que les LPAR, les LRP. Ceux-ci semblent être impliqués dans les phénotypes de résistance et dans le métabolisme de stress des cellules cancéreuses.

Pour ce faire, l'ARN a été extrait à partir de cellules DAOY parentales après 5 jours de sevrage. La présence des amplicons LRP-1, -1b, -2, -5, -8, LDL-R, vLDL-R et CD133 a été confirmée par RT-PCR semi-quantitative montrant la présence d'un amplicon unique par gène (sauf LPAR-4) (figure 3.10-A). La PCR quantitative en temps réel montre une surexpression génique des récepteurs LRP-1b et LRP-1 chez les DAOY en condition de sevrage, donc en absence de sérum (figure 3.10-B). L'absence de sérum a également entraîné une surexpression génique du marqueur de surface CD133 (figure 3.10-B). L'on pourrait stipuler la présence d'une corrélation positive entre les expressions géniques de LRP-1 et de CD133 en mode de stress cellulaire qu'est la privation en facteur de croissance et plaquettaires.

### 3.3.5 Effet de la déprivation de sérum sur l'expression protéique de LRP-1 et de CD133 dans les DAOY

Confirmer la présence d'une corrélation positive autre que celle de l'expression génique entre CD133 et LRP-1, était nécessaire pour pouvoir établir un lien entre LRP-1 et la chimiorésistance des cellules cancéreuses. À ce stade-ci, il fallait investiguer les expressions protéiques de LRP-1 (85 kDa) et de CD133 dans les DAOY parentales en mode de sevrage. Pour ceci, un sevrage a été effectué de 0, 1, 2, 3, 4 et 5 jours (figure 3.11-A). Les cellules ayant été cultivées en présence de sérum 20%, n'expriment en aucune sorte ni la protéine LRP-1 (85 kDa) ni la protéine CD133. Cependant, en mode sevrage, l'expression protéique de LRP-1 (85 kDa) est maximale au jour 4 de sevrage (13.5 fois de plus que le jour 0 de sevrage) (figure 3.11-B, panneau de gauche). L'expression protéique de CD133 est également maximale au jour 4 de sevrage (24 fois plus que le jour 0 de sevrage) (figure 3.11-B, panneau de droite). Les expressions protéiques de LRP-1(85 kDa) et de CD133 corrélaient positivement entre eux chez les DAOY parentales en sevrage mais corroborent surtout avec la surexpression génique de LRP-1 et de CD133 obtenue plus tôt (figure 3.11-B).

### 3.3.6 Surexpression génique des récepteurs LRP dans les DAOY CD133(+)

Suite aux résultats obtenus ci-dessus, il semblerait que le marqueur CD133 joue un rôle dans le comportement adaptatif des DAOY au stress; pour ceci il fallait enrichir les DAOY parentales en CD133. La figure 3.12-A montre le résultat d'un enrichissement sur colonne MACS à partir de DAOY parentale : avant le tri cellulaire, les cellules DAOY CD133(+) représentaient 0.2% de la population totale de DAOY (figure 3.12-A, panneau de gauche), alors qu'après le tri, la population DAOY CD133(+) s'est élevée à 51.8% (figure 3.12-A, panneau de droite). La sous-population isolée indique un enrichissement de près de 259 fois pour les DAOY CD133(+). Suite au tri, les cellules ont été mises en culture et l'ARN total a été isolé à partir des DAOY parentales et CD133(+) afin d'étudier le profil génique du marqueur de surface CD133 et de la famille des LRP chez les DAOY parentales comparativement aux DAOY CD133(+). On observe en 3.12-B une augmentation de l'expression génique de CD133 de près de 4 fois dans les DAOY CD133(+) corroborant l'augmentation du marqueur de surface CD133 (figure 3.12-A, panneau de droite). À la figure 3.12-B, on observe aussi une surexpression génique des LRP-5 et 8 chez les DAOY CD133(+) à la place des LRP-1b et 1 retrouvée plus tôt avec les DAOY parentales sevrées. Ainsi, LRP-5 et 8 caractériserait plus la sous-population CD133(+) enrichie.

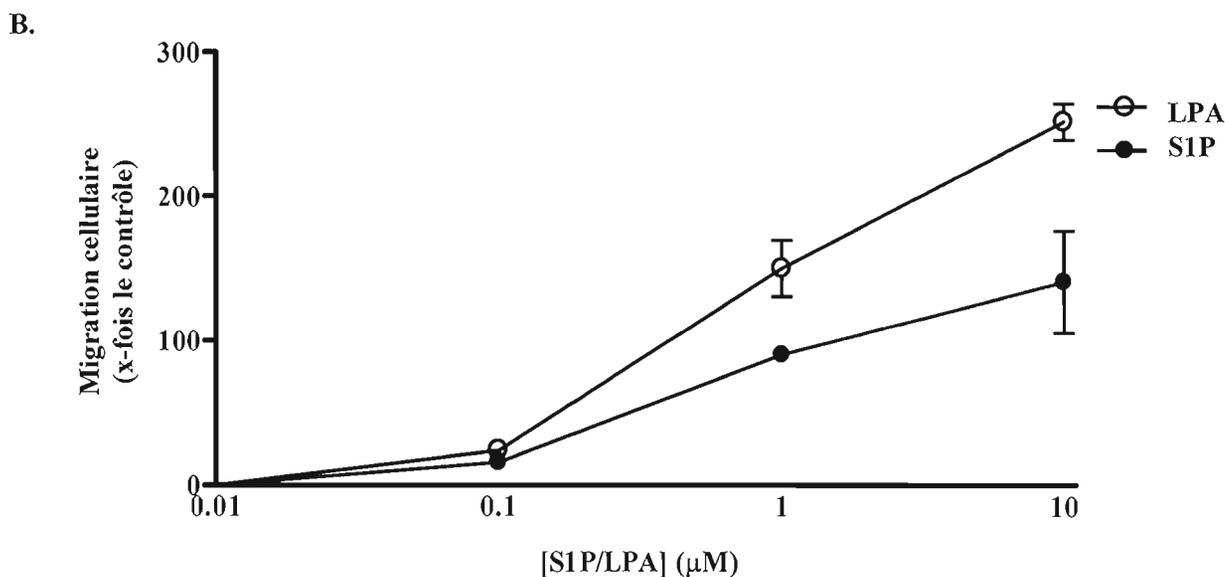
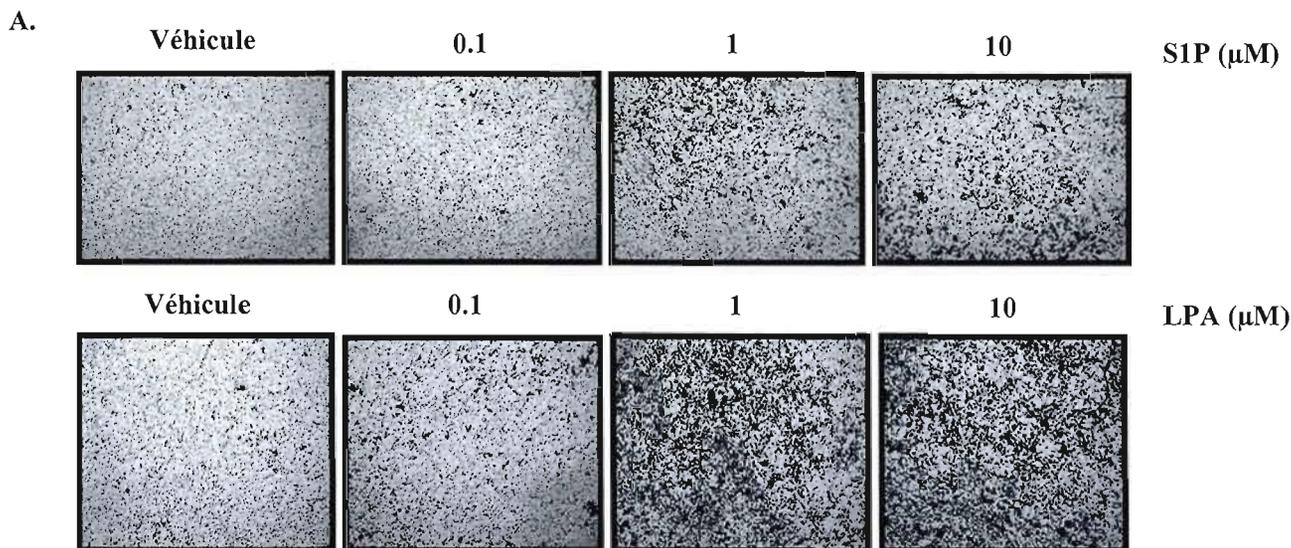


Figure 3.1 : Effets du S1P et du LPA sur la migration des cellules endothéliales cérébrales  
 Des essais de migration ont été réalisés avec des HBMEC que l'on a trypsinisées, resuspendues et déposées à raison de 75,000 cellules par chambre de Boyden. Les puits contenaient du milieu sans sérum : avec 0.01% MeOH pour le véhicule du chemo-attractant S1P ou 0.01% PBS pour véhicule du chemo-attractant LPA. Les cellules qui ont traversé des filtres préalablement couverts de collagène 0.2% ont été fixées après 24 heures de migration à l'aide d'une solution de 10% de formaline phosphate et ont été colorées au cristal violet 0.1%. Elles ont été photographiées à un grossissement 5X et comptabilisées à l'aide du logiciel Northern Eclipse. Le ratio de migration par rapport aux véhicules respectifs de chacun des stimulateurs est illustré en (B). Les valeurs correspondent au nombre de cellules comptées dans quatre champs optiques représentatifs pour chacune des conditions. Cette figure représente une expérience de deux réalisées.

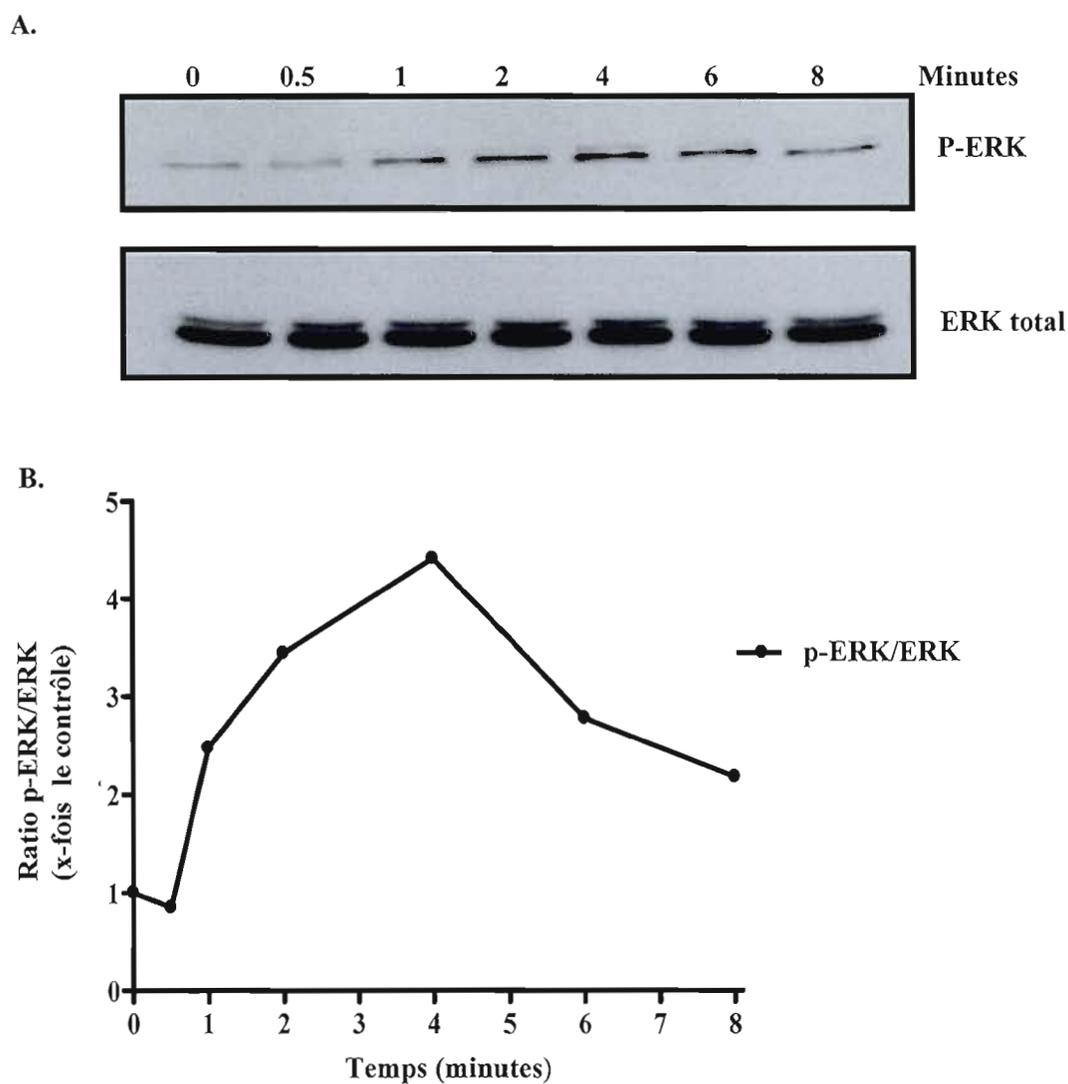


Figure 3.2 : Cinétique de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules endothéliales par le LPA

Les HBMEC sont sevrées pendant 1 heure, puis subissent une stimulation avec 10  $\mu$ M de LPA. Les cellules sont lysées, les protéines sont dosées et déposées à quantité égale (20  $\mu$ g) sur gel SDS-PAGE, 10% acrylamide. L'immuno-buvardage de type western est suivi d'une immuno-détection avec les anticorps anti-ERK (44 KDa, 42 KDa) et anti-phospho-ERK (44 KDa, 42 KDa) dilués 1 : 10, 000 et 1 : 5, 000 (A). L'expression relative du ratio de la forme phosphorylée sur la forme totale de la protéine d'intérêt a été calculée en (B) suite à une analyse densitométrique. Cette figure représente une expérience de deux réalisées.

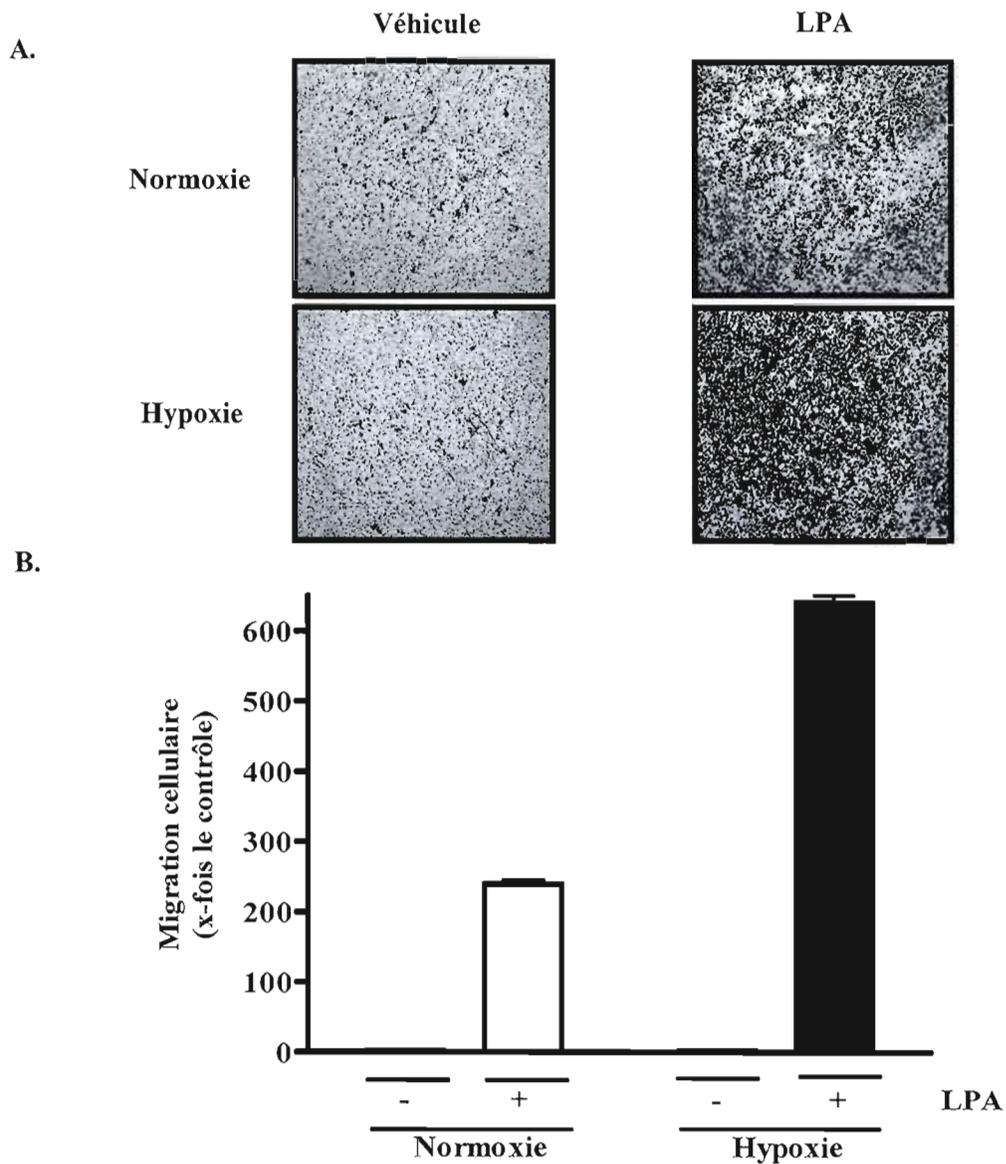


Figure 3.3: Effet de l'hypoxie sur la migration des cellules endothéliales cérébrales stimulées par le LPA

Des essais de migration ont été réalisés avec des HBMEC non traitées que l'on a trypsinisées, resuspendues et déposées à raison de 50 000 cellules par chambre de Boyden. Les puits contenaient du milieu sans sérum : avec 0.01% de PBS pour le véhicule du chimio-attractant LPA et 10  $\mu$ M LPA pour la condition 10  $\mu$ M LPA. Les cellules qui ont traversé des filtres préalablement revêtus de collagène 0.2% ont été fixées après 24 heures de migration (en normoxie ou en hypoxie) à l'aide d'une solution de 10% de formaline phosphate et ont été colorées au cristal violet. Elles ont été photographiées à un grossissement 5X et comptabilisées à l'aide du logiciel Northern Eclipse. (B) Les histogrammes montrent le ratio de migration par rapport aux véhicules respectifs de chacun des stimulateurs. Les valeurs correspondent au nombre de cellules comptées dans quatre champs optiques représentatifs pour chacune des conditions. Cette figure représente une expérience de deux réalisées.

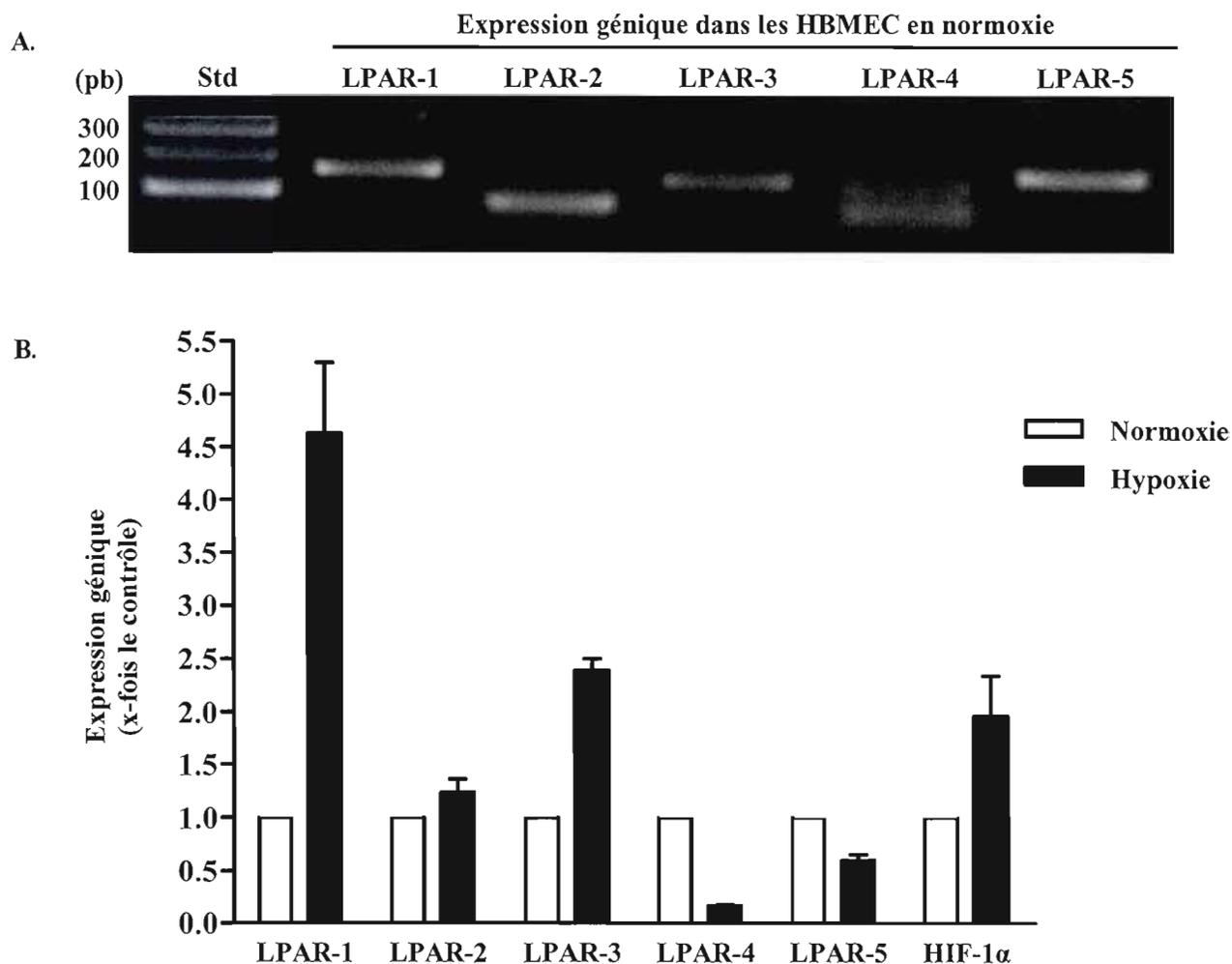


Figure 3.4 : L'hypoxie et son effet sur l'expression génique des récepteurs du LPA dans les cellules endothéliales cérébrales

Les niveaux de transcrits primaires des gènes LPAR-1, LPAR-2, LPAR-3, LPAR-4 et LPAR-5 ont été déterminés par PCR en temps réel. L'ARN total des cellules a été isolé et amplifié tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Le graphique de l'expression génique relative en (B) a été généré par le logiciel d'exploitation des données IQ5 au cours de la PCR en temps réel. Les amplicons obtenus par RT-PCR semi-quantitative ont ensuite été séparés en (A) par une électrophorèse sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium et visualisés sous une lumière UV. Cette figure est représentative de trois expériences distinctes.

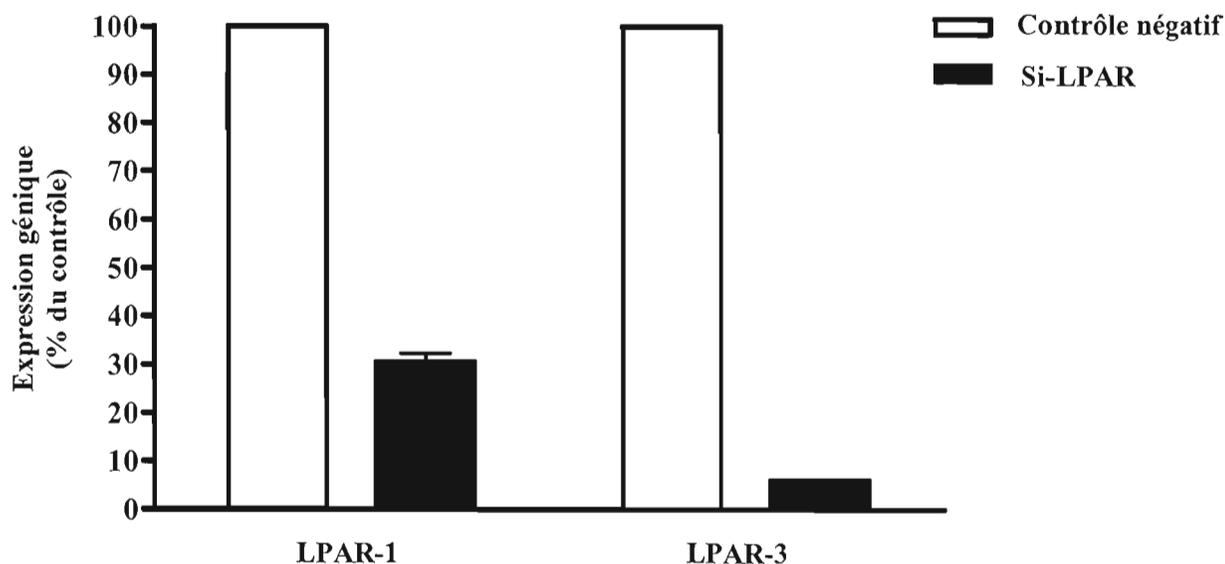


Figure 3.5 : Validation de la transfection des si-LPAR-1 et si-LPAR-3 dans les cellules endothéliales cérébrales par PCR en temps réel

Les cellules HBMEC ont été transfectées avec les ARN interférents, si-aléatoire, si-LPAR-1 ou si-LPAR-3 comme décrit dans la section Matériel et méthodes. Les niveaux d'expression génique de chacun des gènes LPAR-1 et LPAR-3 ont été par la suite observés par PCR en temps réel suite à l'isolation de l'ARN à partir de cellules HBMEC transfectées avec l'ARN interférent correspondant. Cette figure représente une expérience de deux réalisées.

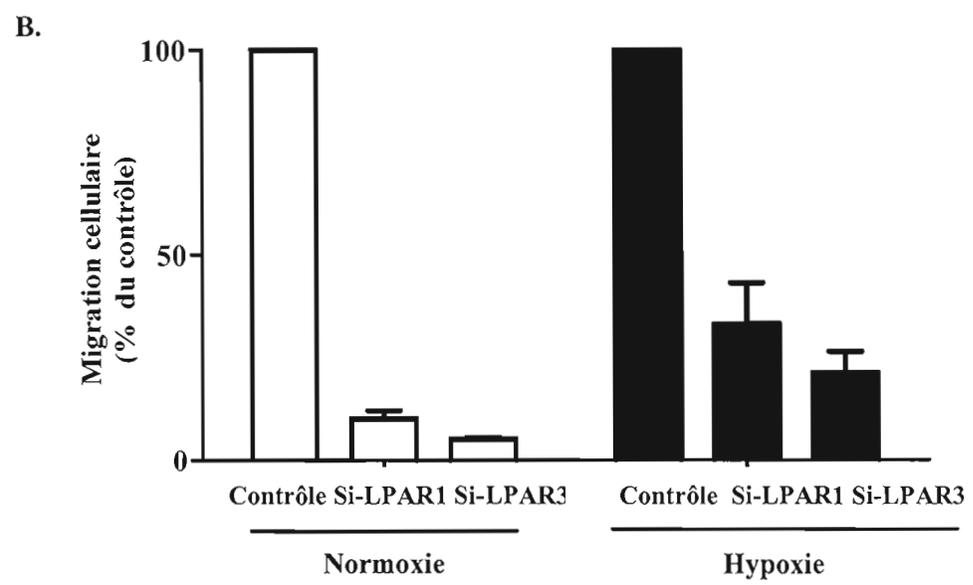
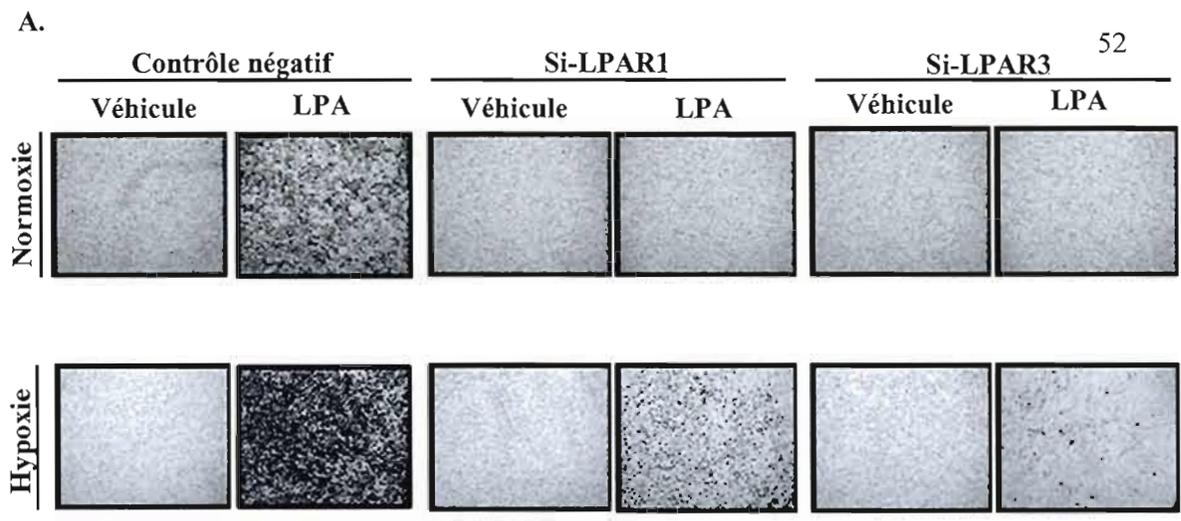
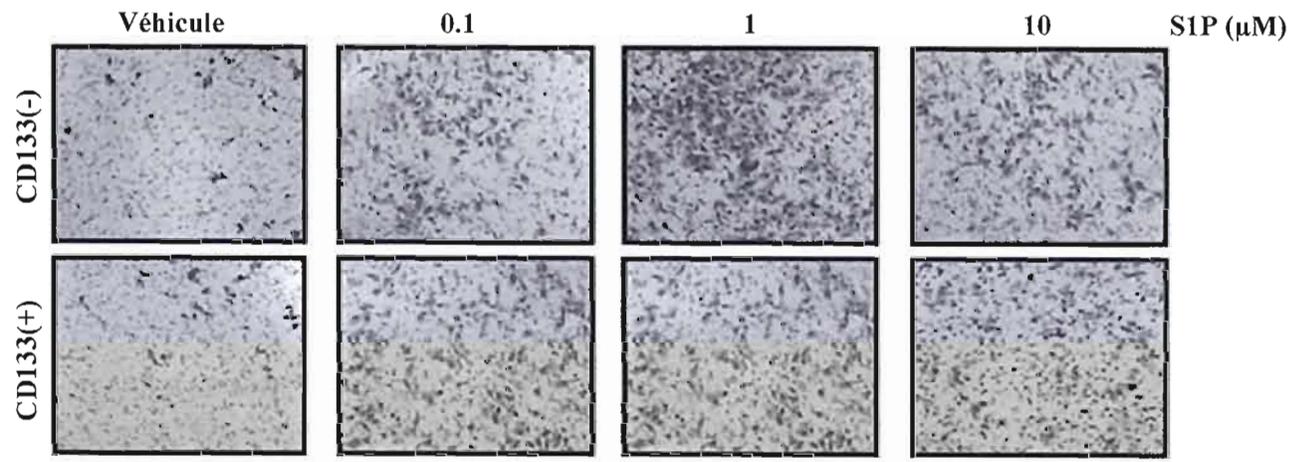
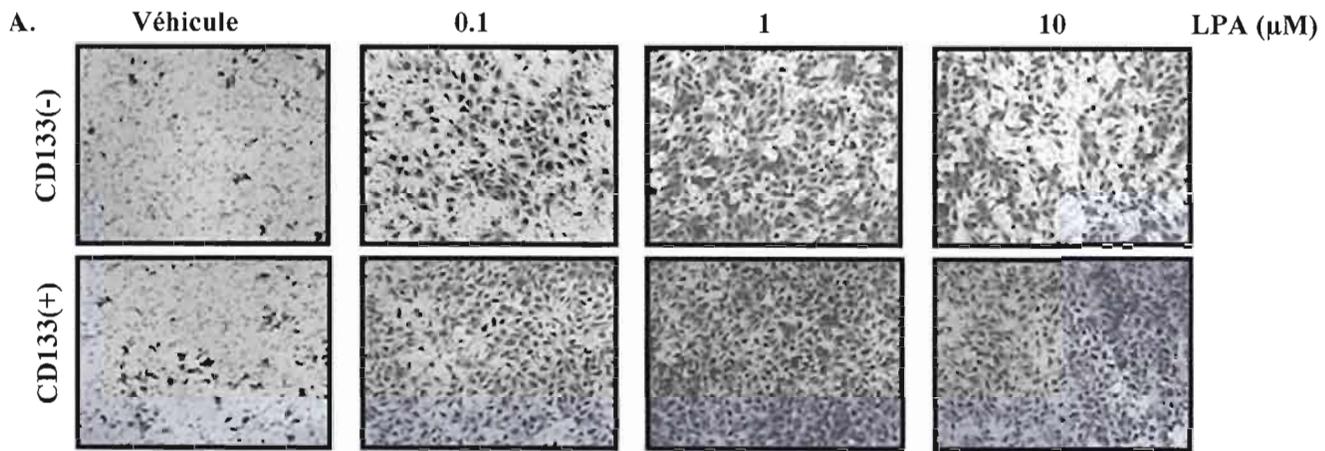


Figure 3.6 : Validation de l'implication des récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 dans la migration des cellules HBMEC stimulées par le LPA en condition hypoxique  
Les HBMEC confluentes à 50% ont été transfectées 24 heures avec les ARN interférents si-aléatoire, si-LPAR-1 ou si-LPAR-3 comme décrit dans la section Matériel et méthodes. Les cellules ont été ensemencées dans des chambres de Boyden enduites de collagène 0.2% à raison de 50 000 cellules par chambre et déposées dans du milieu sans sérum contenant 0.01% PBS pour les conditions véhicules et 10 µM d'acide lysophosphatidique (LPA) pour les conditions contrôle, si-LPAR-1 et si-LPAR-3. Les migrations ont duré 24h en normoxie ou en hypoxie. Cette figure représente une expérience de deux réalisées.



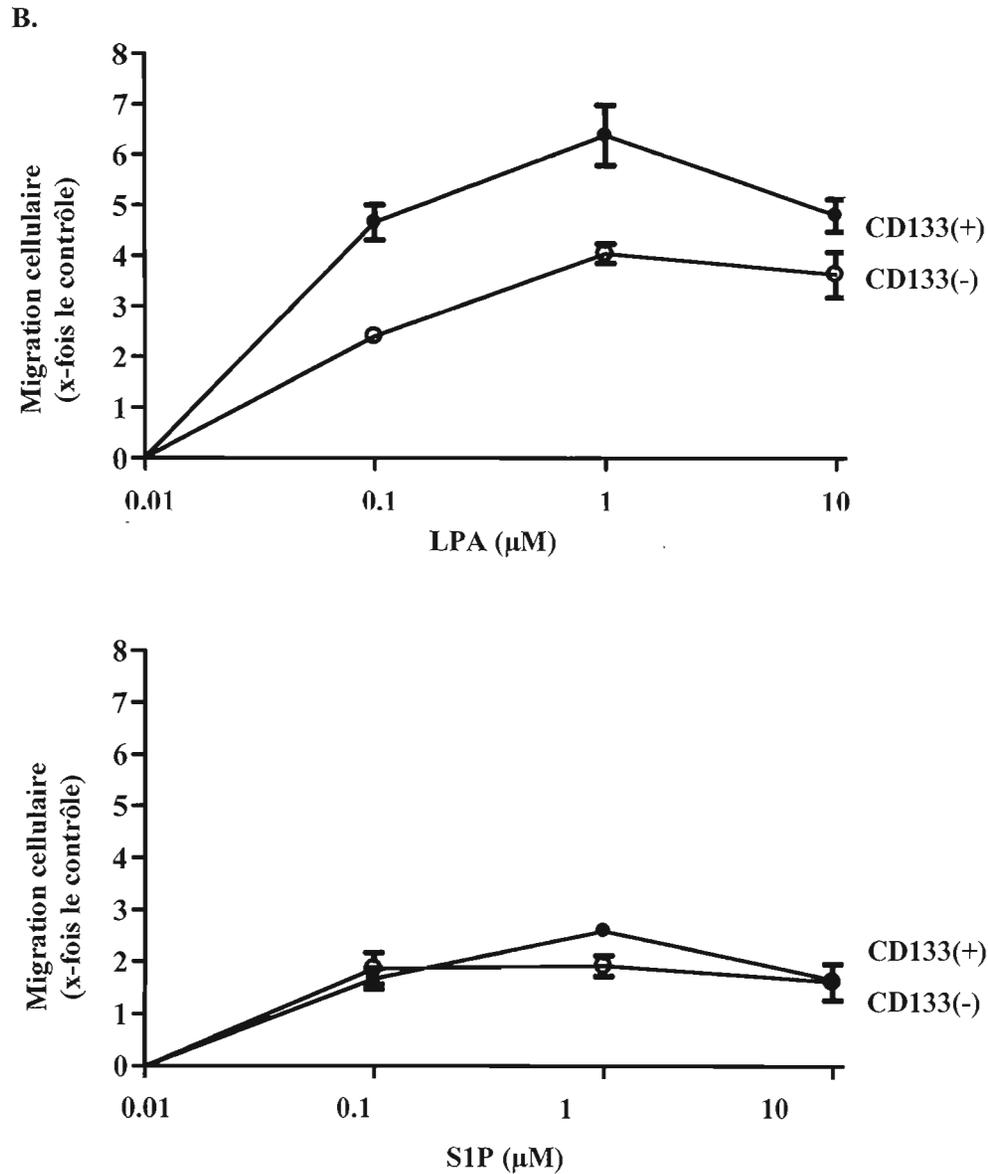


Figure 3.7 : Effets du S1P et du LPA sur la migration des DAOY CD133(-) et CD133(+). Des essais de migration ont été réalisés avec des DAOY non traitées que l'on a trypsinisées, resuspendues et déposées à raison de 25 000 cellules par chambre de Boyden. Les puits contenaient du milieu sans sérum : avec 0.01% MeOH pour le véhicule du chimio-attractant 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$  S1P, 0.01% PBS pour véhicule du chimio-attractant LPA, 0.1, 1 et 10  $\mu\text{M}$  LPA. La migration a été arrêtée après 24 heures. Cette figure représente une expérience de deux réalisées.

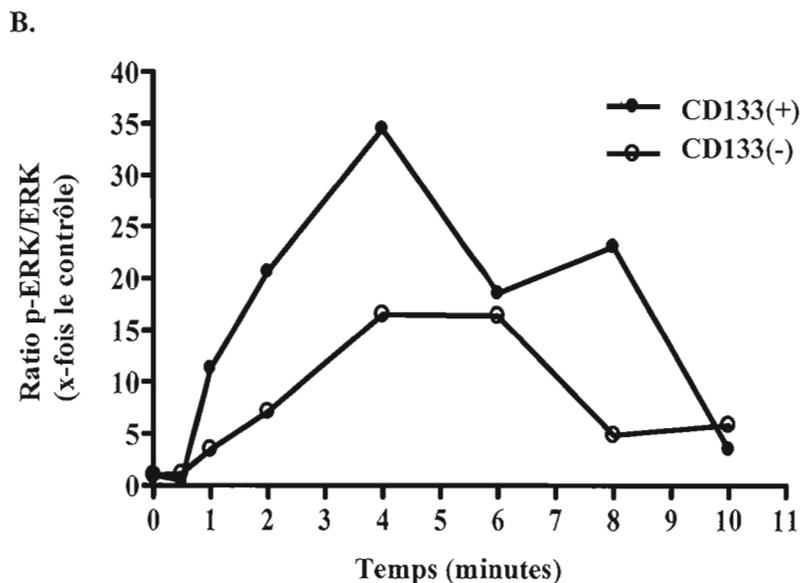
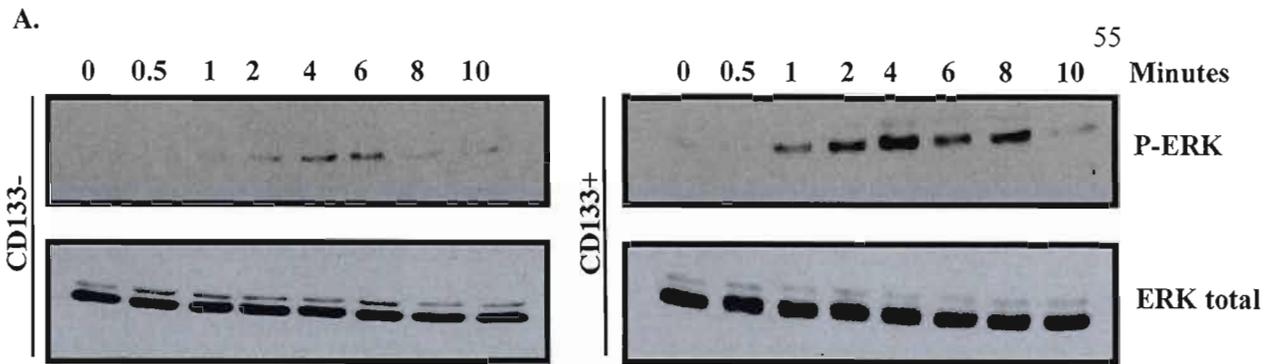


Figure 3.8 : Cinétique différentielle de stimulation de la voie des MAP kinases des cellules de médulloblastome DAOY CD133(-) et DAOY CD133(+)

Les DAOY sont sevrées pendant 1 heure et subissent une cinétique de stimulation avec  $1\mu\text{M}$  de LPA. Les cellules sont lysées, les protéines sont dosées et déposées à quantité égale ( $20\mu\text{g}$ ) sur gel SD-PAGE, 10% acrylamide. L'immuno-buvardage de type western est suivi d'une immuno-détection avec les anticorps anti-ERK (44 KDa, 42 KDa) et anti-phospho-ERK (44 KDa, 42 KDa) dilués 1: 10 000 et 1:5 000. Il est à noter que tous les immunoblots provenant des cellules CD133(-) et CD133(+) ont été exposés simultanément (A). L'expression relative du ratio de la forme phosphorylée sur la forme totale de la protéine d'intérêt a été calculée en (B) suite à une analyse densitométrique. Cette figure représente une expérience de deux réalisées.

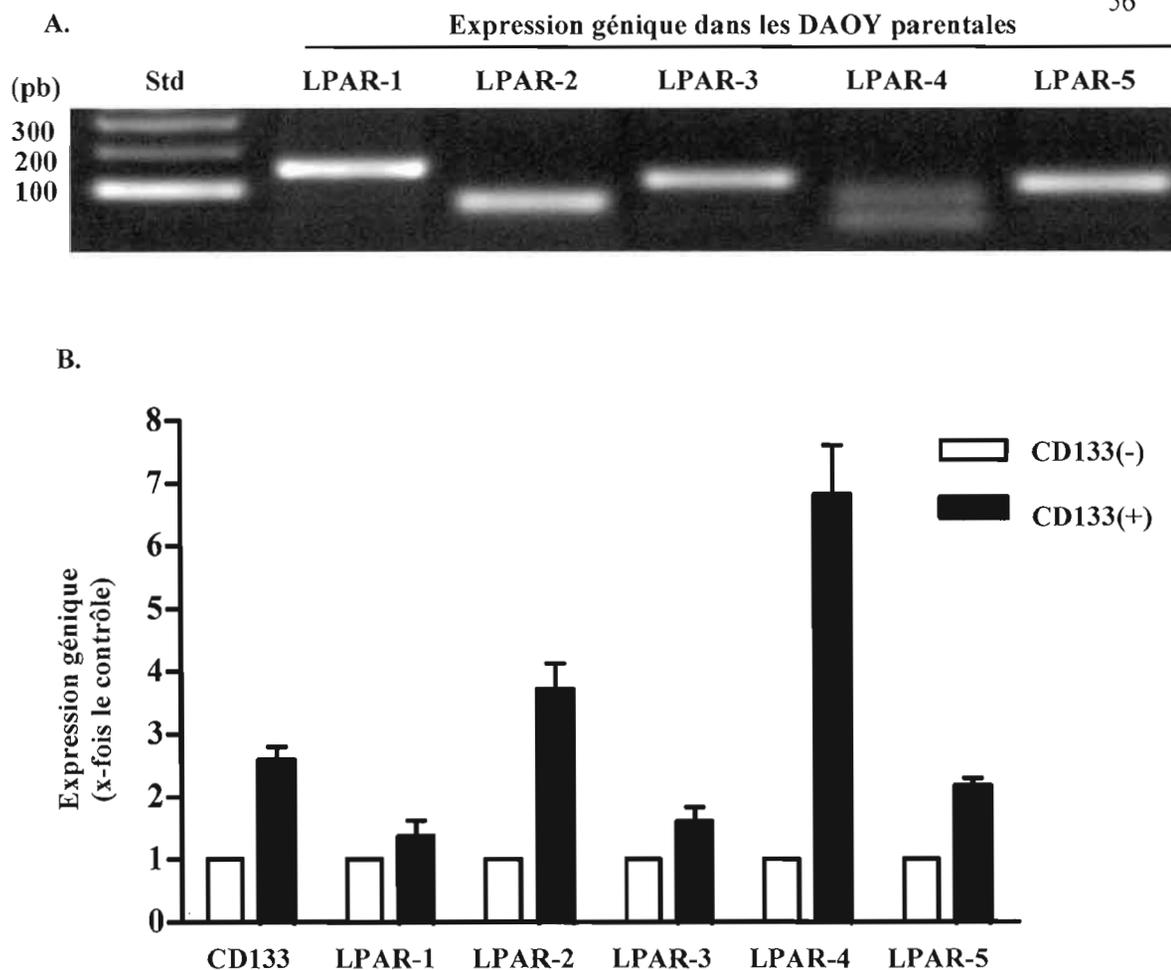


Figure 3.9 : Modulation de l'expression génique des récepteurs du LPA dans les cellules de médulloblastome DAOY CD133(-) et CD133(+)

Les niveaux de transcrits primaires des gènes CD133, LPAR-1, LPAR-2, LPAR-3, LPAR-4 et LPAR-5 ont été déterminés par PCR en temps réel. L'ARN total des cellules a été isolé et amplifié tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Le graphique de l'expression génique relative en a été généré par le logiciel d'exploitation des données IQ5 au cours de la PCR en temps réel. Les amplicons obtenus par RT-PCR semi-quantitative ont ensuite été séparés en (A) par une électrophorèse sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium et visualisés sous une lumière UV. Cette figure est représentative de trois expériences distinctes.

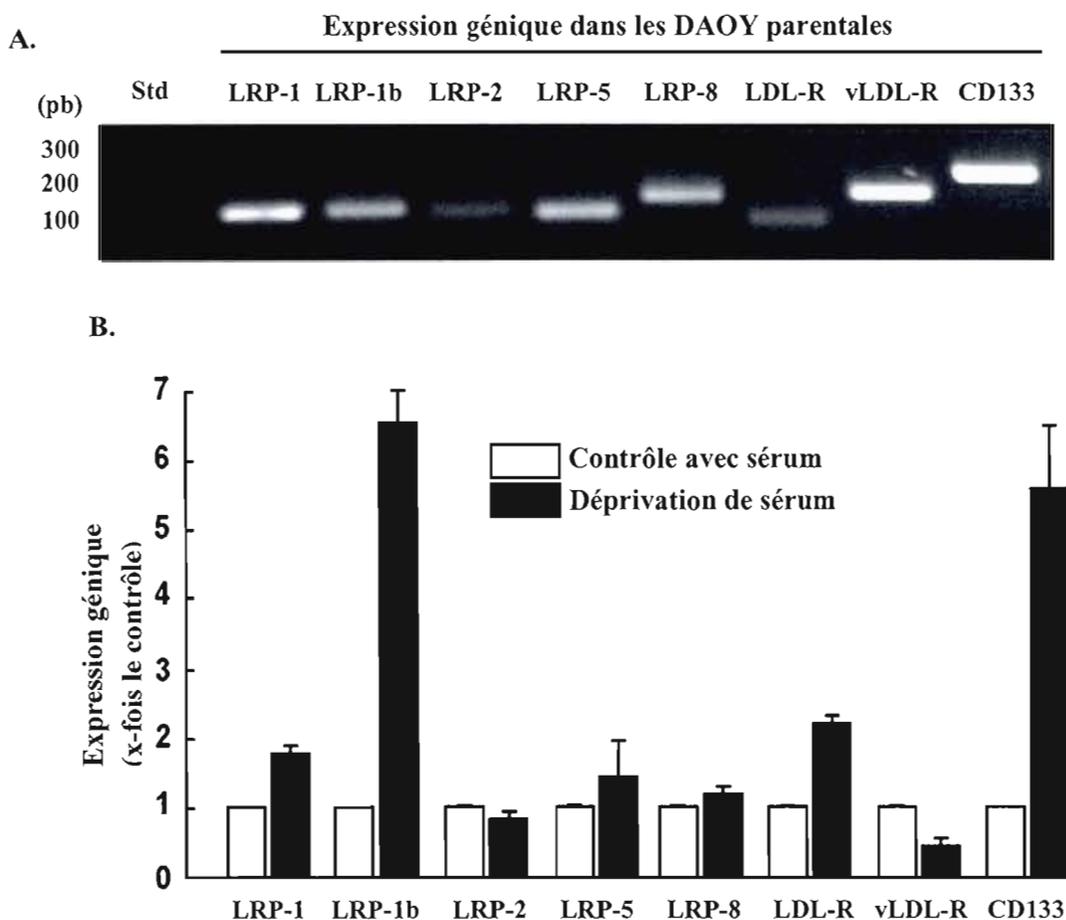


Figure 3.10 : Modulation de l'expression génique des récepteurs lipoprotéiques de basse densité (LRP) dans les cellules DAOY de médulloblastomes sevrées *in vitro*

L'ARN a été extrait à partir de cellules DAOY après 5 jours de sevrage. La présence des amplicons LRP-1, -1b, -2, -5, -8, LDL-R, vLDL-R et CD133 a été confirmée par RT-PCR semi-quantitative; les amplicons ont été séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose 1.8% contenant du bromure d'éthidium et ont été visualisés sous une lumière U.V (A). Les niveaux d'expression génique relative ont été par la suite générés par PCR en temps réel sous des conditions de culture normales (barres blanches) ou en conditions de sevrage (barres noires). Cette figure est représentative de trois expériences distinctes.

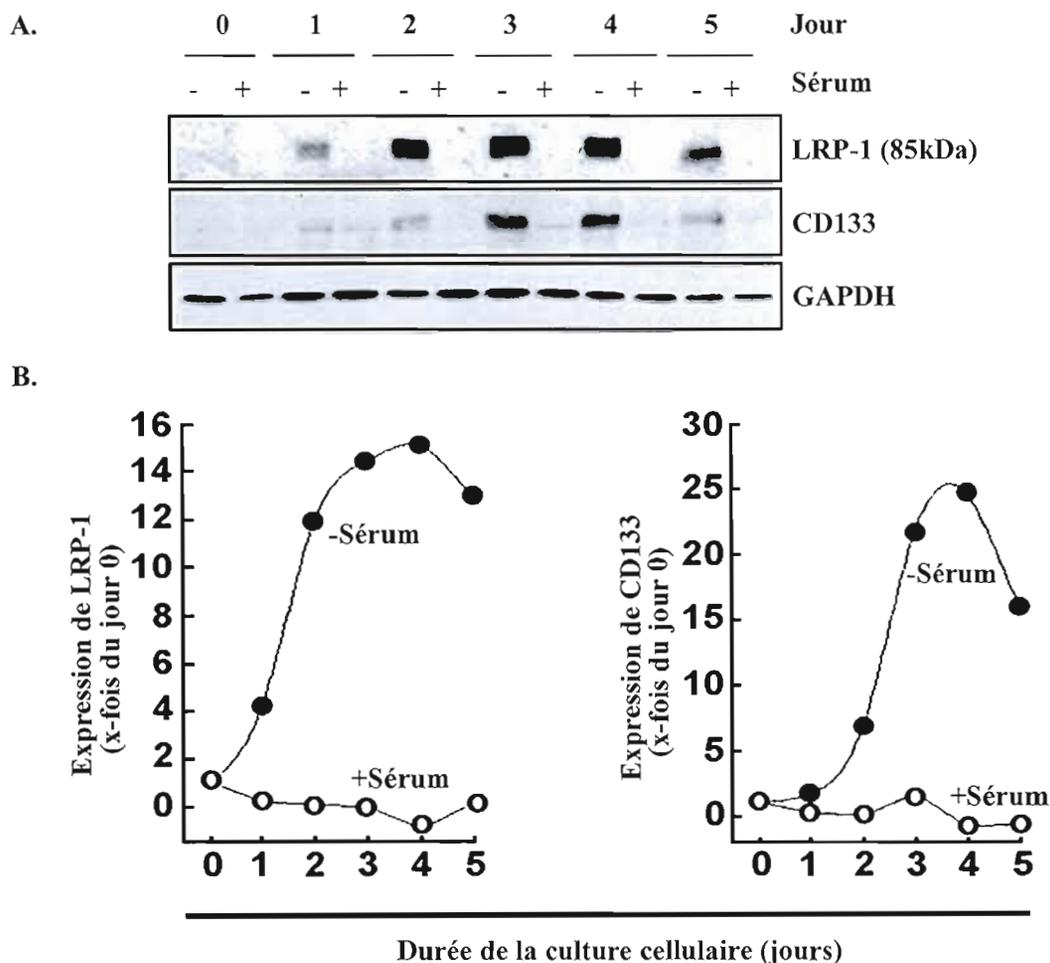


Figure 3.11 : Induction de l'expression protéique de LRP-1 et de CD133 par le sevrage. Des DAOY en couches monocellulaires ont été mises en culture pour 5 jours en absence ou en présence de 20% de sérum. Les cellules sont lysées, les protéines sont dosées et déposées à quantité égale (20  $\mu$ g) sur gel SDS-PAGE. L'immuno-buvarage de type western est suivi d'une immuno-détection avec les anticorps LRP-1 (85kDa), CD133 et GAPDH dilués 1 :1000 (A). La quantification protéique a été calculée suite à une analyse densitométrique (B). Cette figure est représentative de deux expériences distinctes et représente le ratio de LRP-1/GAPDH (à gauche) ou celui de CD133/GAPDH (à droite).

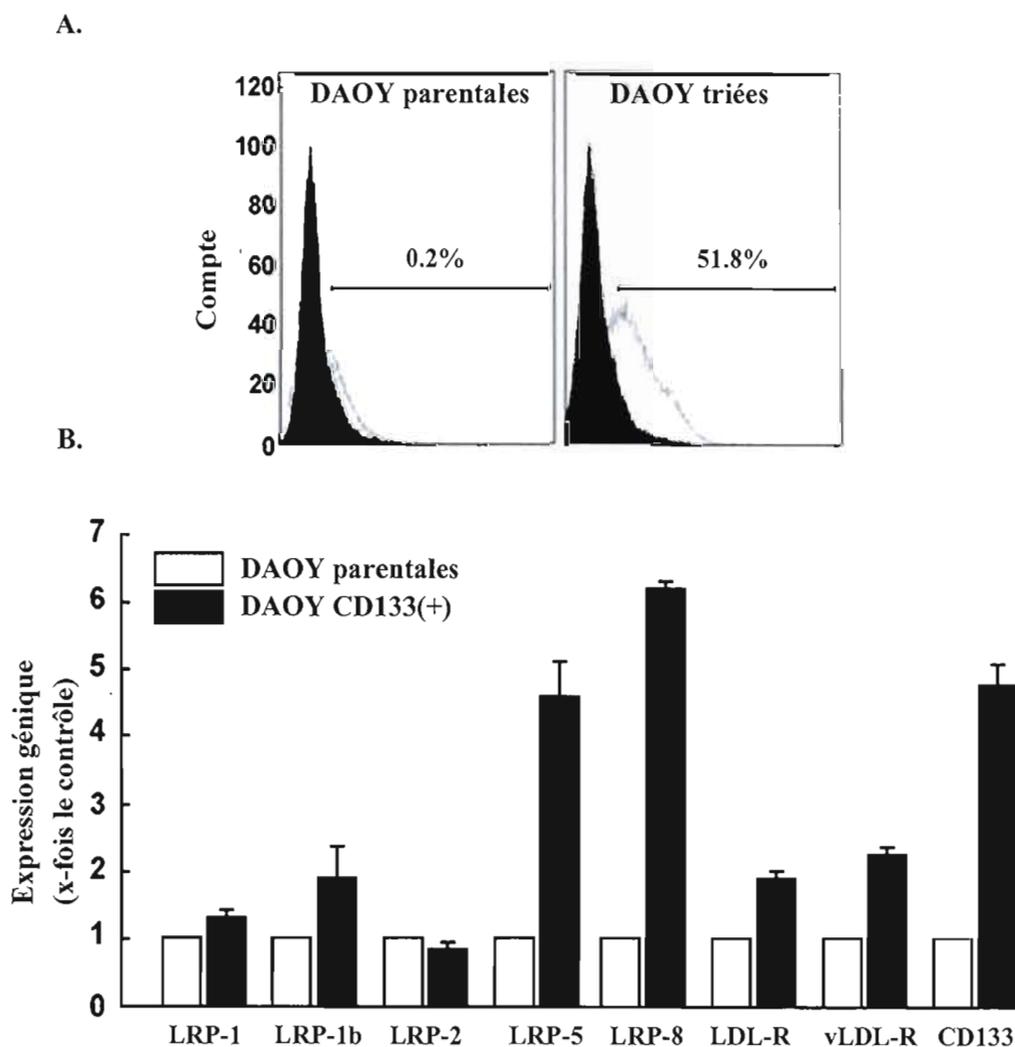


Figure 3.12 : Profil différentiel de l'expression génique des récepteurs LRP entre les cellules DAOY parentales et les DAOY enrichies en CD133

L'isolation des cellules DAOY CD133(+) à partir des DAOY parentales a été effectuée tel que décrit dans la partie Matériel et méthodes selon la technologie MACS (A). Les niveaux d'expression du marqueur de surface CD133 ont été trouvés suite à une analyse par cytométrie de flux sur les DAOY parentales ainsi que sur les DAOY triées. L'ARN total a été isolé à partir des DAOY parentales (barres blanches) et des DAOY CD133(+) (barres noires) pour enfin générer par PCR en temps réel le profil d'expression génique relatif de LRP-1, -1b, -2, -5, -8, LDL-R, vLDL-R, et CD133 (B).

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

#### 4.1 Réponse tumorale : expression différentielle des LPAR

##### 4.1.1 Environnement hypoxique : surexpression génique des LPAR-1 et 3 dans le modèle cellulaire endothélial tumoral vasculaire

Certains types de tumeurs, comme les tumeurs cérébrales, se développent dans un tissu initialement très vascularisé et grandissent via des vaisseaux déjà présents sans le besoin de néo-vascularisation pour leur expansion (Holash et al, 1999). Cependant, l'utilisation de vaisseaux préexistants mène à une réduction importante du nombre de ces derniers, ce qui entraîne les cellules tumorales à augmenter leur expression de VEGF et il en résulte une angiogenèse importante dont les principaux acteurs sont les cellules endothéliales (CE) (Auguste et al, 2005). La prolifération et la migration subséquentes des CE requièrent l'adhésion de celles-ci à la MEC (Carmeliet et Jain, 2000). Le LPA intervient à ce niveau avec de puissants effets sur l'adhésion et la motilité cellulaire en augmentant l'adhésion des CE par la facilitation de l'interaction des protéines de la MEC avec les intégrines (Smyth et al, 1993). Des études montrent que le LPA induit la prolifération des CE dans un essai de cicatrisation (Lee et al, 2000); plus encore, le LPA induit la migration de HUVEC dans un essai de cicatrisation (Lee et al, 2000), induit la réponse chimiotactique dans les cellules BPAE (English et al, 1999) et la migration dans la lignée de CE, EAhy926 (Wu et al, 2005). Plusieurs effets du LPA sur la prolifération et la migration des CE ont donc été étudiés, toutefois, peu d'information étaient disponibles sur les récepteurs impliqués dans ces effets. Le premier volet de l'étude, nous a permis de retrouver dans des cellules endothéliales, les HBMEC, des récepteurs au LPA impliqués dans le mécanisme adaptatif développé par les cellules à l'intérieur de l'endothélium vasculaire tumoral face à l'hypoxie, inductrice de l'angiogenèse.

Il est bien connu aujourd'hui que la migration cellulaire est un processus indispensable à l'angiogenèse (Folkman et Shing, 1992). Les essais de migration de notre étude, étant dans des chambres de Boyden, ont tous été faits en absence de sérum dans les deux compartiments

montrant que l'acquisition d'une capacité migratoire par les cellules endothéliales HBMEC est dépendante de la présence du chemo-attractant, S1P ou LPA. Après 24 heures de migration un manque de la réponse migratoire des HBMEC aux chemo-attractants est observé. Ce résultat s'oppose à la migration active des HBMEC notée rien qu'après 6 heures dans le travail d'Annabi et al, (2008a.). De plus, Annabi et al, (2008a.), montrent un taux de migration basale des HBMEC semblable à celui de la migration stimulée avec  $1\mu\text{M}$  de S1P de cette présente étude. Toutefois, cette présente migration nous permet de conclure que les HBMEC ont une préférence pour le phospholipide, LPA. Panetti (2002), rapporte une faible migration des CE en réponse au LPA mais une forte stimulation induite par la S1P. Par contre, la S1P n'a pas été capable d'initier la migration des cellules endothéliales microvasculaires humaines épiploïques (HOME) qui ont pour principal récepteur au S1P, le  $\text{S1P}_2$ . À savoir que, l'inhibition de la migration cellulaire au S1P dans les HOME est médiée par la voie  $\text{S1P}_2$ -Rho-Rho kinase (Yoshida et al, 2010). Et donc, le ou les récepteurs aux facteurs plaquettaires, S1P ou LPA, exprimés par les CE y jouent pour beaucoup faisant varier la réponse migratoire de ces dernières. Comme les HBMEC répondent préférentiellement à la migration au LPA, l'activation ou pas de la voie des MAP kinases par le LPA a été testée démontrant une phosphorylation d'ERK et prouvant donc l'implication de cette voie dans les effets pro-migratoires du LPA dans les HBMEC. La voie PI3K/Akt étant également une voie de transduction mise en jeu par l'activation des récepteurs au LPA, aurait pu être testée dans les HBMEC démontrant ou pas son implication dans un effet anti-apoptotique du LPA (An et al, 1998). Des études complémentaires doivent être menées afin de tester ces deux voies de signalisation dans les HBMEC stimulées au S1P.

L'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie est une étape critique pour la progression tumorale. Kim et al (2006), ont démontré que le facteur hypoxique HIF- $1\alpha$  contribue au développement pathologique du cancer ovarien en sensibilisant et en améliorant l'effet du LPA sur la migration et l'invasion cellulaires. En plus, il est établi qu'en présence de LPA, l'induction du VEGF responsable de l'augmentation de la prolifération et de l'angiogenèse tumorale se fait via HIF- $1\alpha$  (Lee et al, 2006b.). Notre étude fournit l'évidence qu'en hypoxie les récepteurs LPAR-1 et LPAR-3, dont les expressions géniques sont

fortement augmentées en condition hypoxique, sont potentiellement responsables de la hausse migratoire en réponse au LPA. Ainsi, en invalidant par des si-ARN l'expression des récepteurs LPAR-1 et LPAR-3, l'effet pro-migratoire du LPA sur les CE en hypoxie, disparaît presque en totalité affirmant un rôle majeur possiblement attribuable à ces deux récepteurs dans des mécanismes adaptatifs à l'hypoxie. On aurait pu par ailleurs confirmer la spécificité des si-LPAR-1 et si-LPAR-3 envers le LPA en testant ces derniers avec des agents témoins: voir par exemple si la réponse migratoire induite par une stimulation au S1P ou au VEGF est affectée par les si-LPAR-1 et si-LPAR-3. Aussi, étant donné que l'inhibition par si-LPAR-3 se montrait plus efficace que celle du si-LPAR-1, ce qui se manifestait par un effet plus important sur la migration cellulaire, on aurait pu parfaire nos résultats en antagonisant spécifiquement les récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 avec l'inhibiteur pyrophosphate dioctyl-glycérol (DGGP8:0) (Zhou et al, 2009). La suite serait d'administrer un agoniste hautement sélectif à l'un ou l'autre des récepteurs au LPA: si la migration cellulaire remonte à la hausse avec un agoniste de LPAR-3 par exemple, ceci montrerait que LPAR-3 porte le rôle majeur dans la voie LPAR-1-LPAR-3 soupçonnée d'être une forme de mécanisme adaptatif au stress des CE. La présence d'un mécanisme comme tel, indique que l'action du LPA pourrait être modulée par le développement d'analogues spécifiques au récepteur LPAR-1 et/ou LPAR-3. Enfin, il est tentant de suggérer suite aux résultats du profil génique des récepteurs au LPA dans les HBMEC, qu'une surexpression génique du récepteur LPAR-1 accompagnée d'une quasi-absence de l'expression du récepteur LPAR-4, puisse être une signature phénotypique de l'adaptation des CET à l'hypoxie. Dans ce cas, ce serait une raison de plus d'investiguer plus loin sur la fonctionnalité de LPAR-1 dans les CET.

#### 4.1.2 Surexpression génique des LPAR-2 et 4 dans le modèle cellulaire cérébral de résistance tumoral

La sous-population de cellules CD133(+) est fortement détectée dans les médulloblastomes récurrents, elle partage certaines propriétés avec les cellules souches, elle est hautement tumorale (Singh et al, 2004; Beier et al, 2008) et elle échappe aux traitements conventionnels de chimiothérapie (Emmenegger et Wechsler-Reya, 2008). L'expression du marqueur CD133 dans les médulloblastomes pourrait donc être un indicateur pronostique de

la récurrence tumorale et de la progression tumorale maligne. Cette étude est une preuve supplémentaire qui relève la pertinence à étudier la population CD133(+) de médulloblastome, population prometteuse dans ses avenues cliniques pour ce type de tumeur cérébrale. Le modèle de CSC a été récemment décrit comme étant restreint à une niche de cellules souches dont la taille et le degré d'organisation semble contribuer fortement à l'évolution clinique de la tumeur (Hope et al, 2004). Il est admis que les CSC au sein d'une tumeur cérébrale, se trouvent à proximité de vaisseaux sanguins impliqués dans l'irrigation des niches vasculaires (Gilbertson et Rich. 2007; Calabrese et al, 2007). Cependant, il est encore mal connu si ces niches vasculaires sont préférentiellement irriguées par des facteurs de croissance ou encore par des facteurs plaquettaires. Les lysophospholipides régulent une grande diversité d'activités des CSC incluant la prolifération, la survie, la différenciation et la migration de cellules souches adultes et embryonnaires et progénitrices (Pébay et al, 2007). Considérant que les lysophospholipides sont susceptibles de jouer un rôle important dans la mobilisation des cellules souches, leurs impacts sur le phénotype invasif et infiltrant des CSC du cerveau demeurent mal documentés. Notre étude fournit l'évidence que les cellules CD133(+) sont beaucoup plus réponsives au lysophospholipide LPA qu'à la S1P mais aussi qu'elles migrent 1.6 fois plus que leurs homologues CD133(-) en réponse au LPA. Ceci est la preuve que *in vitro*, les CD133(+) ont une réponse préférentielle au LPA mais aussi que les CD133(+) de médulloblastomes prolifèrent de manière plus agressive que les CD133(-). L'inactivation siARN de CD133 dans les cellules CD133(+) du cancer du côlon n'affectait pas leur migration, leur prolifération ou leur invasion (Horst et al, 2009). La combinaison de ces résultats avec les nôtres suggère qu'il serait important de distinguer deux variables indépendantes qui sont le rôle fonctionnel de CD133, qui n'est pas nécessairement connu encore à date, et la signature phénotypique de CD133 en tant que marqueur de surface. Le profil d'expression génique des récepteurs au LPA montre en effet une hausse de l'expression génique de tous les récepteurs au LPA (LPAR<sub>1-5</sub>) dans les CD133(+) dérivés de médulloblastome, surtout LPAR-2 et LPAR-4. Une expression génique aberrante des récepteurs LPAR-2 et 3 a été retrouvée dans les cancers de la thyroïde, du sein et colorectal (Yu et al, 2008). Il serait opportun de vérifier avec d'autres expérimentations que cette hausse d'expression des récepteurs LPAR-2 et 4 dans les CD133(+) est effectivement une signature phénotypique attribuable aux CSC. Si LPAR-2 et LPAR-4 sont exprimés à la hausse dans

d'autres lignées de médulloblastomes, inhiber ces deux récepteurs avec des antagonistes pourrait être l'avenue d'une thérapie pour ce type de cancer cérébral.

La voie des MAPK est l'une des voies principales de transmission signalétique (Favre, 2006). La cascade des MAPK est rapidement activée par divers stimuli tels que le stress et la mort cellulaires. Il a été démontré que l'activation de la voie Erk/MAPK induisait la synthèse de la cycline D1, une protéine qui promeut la division cellulaire mais aussi que cette activation contribuait à la progression du cancer (Wang et al, 2010b.). L'investigation de l'importance de la voie de signalisation des MAP kinases dans la tumorigénicité de CD133 dans cette étude a montré que les niveaux d'activation de Erk1/2 sont significativement plus élevés dans les cellules CD133(+) que dans les CD133(-). En plus de se montrer plus sensibles au LPA, les cellules CD133(+) ont manifesté la phosphorylation d'Erk plus tôt. Ces résultats laissent suggérer qu'une des signatures phénotypiques des CSC est l'activation distinctive de cette voie mécanistique. La voie PI3K/Akt pourrait également être impliquée, et de là les niveaux d'expression protéiques d'Akt auraient été intéressants à regarder. Ce résultat est en accord avec les résultats de Wang et al, (2010b.) qui ont prouvé que la régulation à la baisse d'Akt et d'Erk par la technologie de transfection siARN atténuait la capacité des cellules CD133(+) de cancer du côlon à former des colonies. En complétant nos études sur les voies MAPK et PI3K/Akt dans les DAOY CD133(+), on pourrait être en mesure de développer de nouveaux agents thérapeutiques pour les médulloblastomes.

## **4.2 Réponse tumorale : expression différentielle des LRP**

### **4.2.1 Réponse adaptative au sevrage: surexpression protéique de CD133 et de LRP-1 dans les médulloblastomes**

Dans le deuxième volet de notre étude, nous avons identifié les membres de la famille des LRP comme faisant partie du phénotype adaptatif associé aux cellules CD133(+) de médulloblastome. LRP est surexprimé dans les astrocytomes malins particulièrement dans les glioblastomes (Yamamoto et al, 1998) et est impliqué dans le métabolisme de divers ligands, dont MMP-9. Celle-ci, connue pour son rôle de dégradation de la matrice extracellulaire, se lie à LRP-1 pour y être catabolisée alors que la MT1-MMP a pour cible protéolytique, LRP

dans les cellules cancéreuses (Strongin, 2010). En effet, nous démontrons dans des travaux antérieurs, que dans les neurosphères CD133(+) dérivés de DAOY, MMP-9 et MT1-MMP sont impliquées dans l'invasion tumorale, les métastases tumorales et la résistance thérapeutique (Annabi et al, (2008b.)). Il a été montré que la MMP-9 ainsi que d'autres facteurs de croissance pro-angiogéniques sont des molécules déclenchantes du switch angiogénique (Berger et al, 2000; Jouanneau, 2008). La déprivation en facteurs de croissance créée par l'absence en sérum du milieu de culture *in vitro* dans cette présente étude, pourrait jouer un rôle additionnel quant au déclenchement du switch angiogénique poussant les CSC à contrer l'effet du stress par divers mécanismes. Dans cette présente étude, le sevrage des DAOY entraîne une augmentation des taux protéiques de LRP-1, tout comme l'hypoxie a induit une hausse importante de LRP-1 *in vivo* dans des xénogreffes (Montel et al, 2007). Song et al, (2009) prouvent que dans des glioblastomes humains, LRP-1 induit la migration et l'invasion cellulaire par l'induction des MMP-2 et MMP-9 (Song et al, 2009). Il semblerait donc que la fonction de LRP-1 dans l'évolution d'un cancer soit reliée à l'axe qui impliquerait MT1-MMP/MMP-9/LRP. Des études plus approfondies sont nécessaires dans le futur afin de décrypter le plus de mécanismes possibles régulés par LRP. Ceci améliorerait notre compréhension sur la contribution de LRP dans cette maladie qu'est le cancer et de là, nous aider à développer des stratégies anti-cancéreuses. Il n'est pas clair encore si la surexpression protéique de CD133 corrélant avec celle de LRP-1 en condition de stress, obtenue durant cette étude, implique un mécanisme exclusif aux médulloblastomes. À ce jour, il est encore moins clair si CD133 joue un rôle causal, contributif ou encore corrélatif dans la formation ou l'adaptation métabolique de la population des CSC.

#### 4.2.2 Surexpression génique des LRP-1, LRP-1b et LRP- 5 dans les DAOY sevrés et dans les DAOY CD133(+)

L'isolation et l'identification des cellules souches de tumeurs cérébrales sont identifiées via l'expression typique du marqueur CD133, cependant il n'est pas clair encore si CD133 devrait être considéré comme un facteur pronostique indépendant ou pas. Cette étude montre, qu'une régulation génique à la hausse de CD133, LRP-1, LRP-1b et LRP-5 aussi bien dans les cellules sevrées que dans la sous-population CD133(+) pourrait être une signature phénotypique des CSC. La fonction exacte de toutes ces LRP ainsi que le manque

d'expression génique de LRP-8 en réponse à la déprivation de sérum restent à être investigués dans les CSC. Néanmoins, il est tentant de considérer l'expression aberrante de LRP-8 dans les cellules CD133(+) comme un marqueur typique des CSC. Vu l'observation de ce mécanisme adaptatif à la hausse de l'expression des LRP au cours de cette étude et vu que l'expression de LRP est très souvent attribuée à l'invasion tumorale, il serait à considérer qu'un ciblage thérapeutique de LRP pourrait arrêter le phénotype invasif des CSC. Des études histologiques de l'expression de LRP dans de nombreuses tumeurs pourraient fournir une aide diagnostique qui permettra d'envisager de nouveaux traitements anticancéreux basés sur le ciblage de LRP. D'ailleurs, dans mon laboratoire d'accueil, plusieurs tests *in vivo* ont été faits pour l'élaboration d'une forme finale de la plateforme peptidique thérapeutique conjuguée au paclitaxel, l'ANG1005 : dérivée d'une séquence de ligands qui se lie à LRP-1, elle a été démontrée pour être d'une haute efficacité pour le traitement des tumeurs cérébrales vu sa facilité à pénétrer à travers la barrière hémato-encéphalique (Regina et al, 2008). Il serait intéressant de voir si cette plateforme peptidique modulerait *in vivo* le phénotype d'expression des LRP dans les CSC CD133(+) tel que rapporté dans cette présente étude.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION

Nos travaux ont permis de montrer que dans un contexte expérimental *in vitro* de tumeur cérébrale, les récepteurs à l'acide lysophosphatidique (LPA) semblent être d'une importance capitale. En effet, les récepteurs LPAR-1 et LPAR-3 auraient un rôle dans l'agressivité de la migration et de l'invasion tumorales au sein des CET. Encore plus, les récepteurs LPAR-2 et LPAR-4 semblent avoir un rôle dans la résistance tumorale attribuée aux CSC. De plus, il n'est pas exclu que d'autres récepteur au LPA (LPA) soient impliqués dans la résistance des CSC puisqu'ils se trouvent être tous surexprimés dans le modèle CD133(+) de médulloblastome expliquant l'activation accrue de la voie des MAP kinases en réponse au LPA chez les CD133(+) par rapport aux CD133(-). D'un autre côté, nous avons montré que l'adaptation phénotypique des CSC au stress, telle une déprivation en nutriment, implique les récepteurs LRP-1, LRP-1b et LRP-5. À ceci s'ajoute une signature phénotypique des cellules CD133(+), qui est la surexpression de LRP-8, récepteur qui mériterait d'être investigué ultérieurement dans un modèle de résistance tumoral tel les CSC.

En somme, les récepteurs au LPA (LPA) semblent constituer une cible de choix pour le traitement des cancers cérébraux, que ce soit au niveau du compartiment tumoral ou vasculaire. De plus, nous pensons que l'adaptation des CSC aux conditions de stress, ici la déprivation en nutriments, passe par des mécanismes de régulation au niveau de certaines LRP. Des investigations futures approfondiront nos connaissances sur les voies impliquées en amont et en aval des récepteurs LPAR et LRP dans le contexte de cancers cérébraux.

## BIBLIOGRAPHIE

- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison et M. F. Clarke. 2003. «Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no 7, p. 3983-3988.
- An, S., T. Bleu, O. G. Hallmark et E. J. Goetzl. 1998. «Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no 14, p. 7906-7910.
- Annabi B, Doumit J, Plouffe K, Laflamme C, Lord-Dufour S, et Béliveau R. 2010. «Members of the low-density lipoprotein receptor-related proteins provide a differential molecular signature between parental and CD133+ DAOY medulloblastoma cells». *Molecular Carcinogenesis*. vol.49, no 7, p 710-717
- Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, M. Laroche, M. P. Lachambre, R. Moundjian et R. Béliveau. 2008a. «The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis». *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 52, no 6, p. 692-700.
- Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, C. Laflamme, M. P. Lachambre, Y. Rolland, H. Sartelet et R. Béliveau. 2008b. «Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype». *Molecular Cancer Research*, vol. 6, no 6, p. 907-916.
- Aoki, J., A. Taira, Y. Takanezawa, Y. Kishi, K. Hama, T. Kishimoto, K. Mizuno, K. Saku, R. Taguchi et H. Arai. 2002. «Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no 50, p. 48737-48744.
- Armulik, A., A. Abramsson et C. Betsholtz. 2005. «Endothelial/pericyte interactions». *Circulation Research*, vol. 97, no 6, p. 512-523.
- Auguste, P., S. Lemiere, F. Larrieu-Lahargue et A. Bikfalvi. 2005. «Molecular mechanisms of tumor vascularization». *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 54, no 1, p. 53-61.
- Bandoh, K., J. Aoki, H. Hosono, S. Kobayashi, T. Kobayashi, K. Murakami-Murofushi, M. Tsujimoto, H. Arai et K. Inoue. 1999. «Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no 39, p. 27776-27785.
- Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner et J. N. Rich. 2006. «Glioma stem cells promote radioresistance by

- preferential activation of the DNA damage response». *Nature*, vol. 444, no 7120, p. 756-760.
- Becker, B. F., B. Heindl, C. Kupatt et S. Zahler. 2000. «Endothelial function and hemostasis». *Clinical Research in Cardiology*, vol. 89, no 3, p. 160-167.
- Beier, D., J. Wischhusen, W. Dietmaier, P. Hau, M. Proescholdt, A. Brawanski, U. Bogdahn et C. P. Beier. 2008. «CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors». *Brain Pathology*, vol. 18, no 3, p. 370-377.
- Béliveau, R. et Gingras, D. 2005. «Les aliments contre le cancer. La prévention du cancer par l'alimentation.» Éditions Trécarré, p.213.
- Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb et D. Hanahan. 2000. «Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis». *Nature Cell Biology*, vol. 2, no 10, p. 737-744.
- Bergers, G., et L. E. Benjamin. 2003. «Tumorigenesis and the angiogenic switch». *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no 6, p. 401-410.
- Bian, D., S. Su, C. Mahanivong, R. K. Cheng, Q. Han, Z. K. Pan, P. Sun et S. Huang. 2004. «Lysophosphatidic acid stimulates ovarian cancer cell migration via a Ras-MEK kinase 1 pathway». *Cancer Research*, vol. 64, no 12, p. 4209-4217.
- Boccaccio, C., et P. M. Comoglio. 2005. «A functional role for hemostasis in early cancer development». *Cancer Research*, vol. 65, no 19, p. 8579-8582.
- Brahimi-Horn, C., et J. Pouyssegur. 2006. «The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion». *Bulletin du cancer.*, vol. 93, no 8, p. E73-80.
- Brindley, D. N. 2004. «Lipid phosphate phosphatases and related proteins: Signaling functions in development, cell division, and cancer». *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 92, no 5, p. 900-912.
- Calabrese, C., H. Poppleton, M. Kocak, T. L. Hogg, C. Fuller, B. Hamner, E. Y. Oh, M. W. Gaber, D. Finklestein, M. Allen, A. Frank, I. T. Bayazitov, S. S. Zakharenko, A. Gajjar, A. Davidoff et R. J. Gilbertson. 2007. «A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells». *Cancer Cell*, vol. 11, no 1, p. 69-82.
- Carmeliet, P. 2003. «Angiogenesis in health and disease». *Nature Medicine*, vol. 9, no 6, p. 653-660.
- Carmeliet, P., et R. K. Jain. 2000. «Angiogenesis in cancer and other diseases». *Nature*, vol. 407, no 6801, p. 249-257.

- Chae, S. S., J. H. Paik, H. Furneaux et T. Hla. 2004. «Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no 8, p. 1082-1089.
- Chen, K. H., C. C. Hsu, W. S. Song, C. S. Huang, C. C. Tsai, C. D. Kuo, H. S. Hsu, T. H. Tsai, C. Y. Tsai, L. C. Woung, S. H. Chiou, K. H. Lu et Y. W. Chen. 2010. «Celecoxib enhances radiosensitivity in medulloblastoma-derived CD133-positive cells». *Child's Nervous System*, p. 1-8.
- Chung, N. S., et K. M. Wasan. 2004. «Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake». *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 56, no 9, p. 1315-1334.
- Contos, J. J. A., I. Ishii et J. Chun. 2000. «Lysophosphatidic acid receptors». *Molecular Pharmacology*, vol. 58, no 6, p. 1188-1196.
- David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Gres S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, Saulnier-Blache JS, Clezardin P, Peyruchaud O.2010. «Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts». *PLoS One*. 5:e9741
- Davis, G. E., et D. R. Senger. 2005. «Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization». *Circulation Research*, vol. 97, no 11, p. 1093-1107.
- Dean, M., T. Fojo et S. Bates. 2005. «Tumour stem cells and drug resistance». *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no 4, p. 275-284.
- Dedieu, S., B. Langlois, J. Devy, B. Sid, P. Henriët, H. Sartelet, G. Bellon, H. Emonard et L. Martiny. 2008. «LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities». *Molecular and Cellular Biology*, vol. 28, no 9, p. 2980-2995.
- Do, T. V., J. C. Symowicz, D. M. Berman, L. A. Liotta, E. F. Petricoin Iii, M. S. Stack et D. A. Fishman. 2007. «Lysophosphatidic acid down-regulates stress fibers and up-regulates pro-matrix metalloproteinase-2 activation in ovarian cancer cells». *Molecular Cancer Research*, vol. 5, no 2, p. 121-131.
- 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.

- Emmenegger, B. A., et R. J. Wechsler-Reya. 2008. «Stem cells and the origin and propagation of brain tumors». *Journal of Child Neurology*, vol. 23, no 10, p. 1172-1178.
- English, D., A. T. Kovala, Z. Welch, K. A. Harvey, R. A. Siddiqui, D. N. Brindley et J. G. N. Garcia. 1999. «Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis». *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*, vol. 8, no 6, p. 627-634.
- English, D., D. N. Brindley, S. Spiegel et J. G. N. Garcia. 2002. «Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1582, no 1-3, p. 228-239.
- Fang, X., M. Schummer, M. Mao, S. Yu, F. H. Tabassam, R. Swaby, Y. Hasegawa, J. L. Tanyi, R. LaPushin, A. Eder, R. Jaffe, J. Erickson et G. B. Mills. 2002. «Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1582, no 1-3, p. 257-264.
- Favre, G. 2006. «The mitogen activated protein kinases (MAPK) pathway, a target for anticancer drugs». *La voie des mitogen activated protein kinases (MAPK), cible de stratégies antitumorales*, vol. 93, no SPEC. ISS. APR., p. 25-30.
- Fedele, A. O., M. L. Whitelaw et D. J. Peet. 2002. «Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors». *Molecular interventions*, vol. 2, no 4, p. 229-243.
- Feron, J. G., M. Roumieux, M. Pocard et J. Plouet. 2007. «Normal and tumoral angiogenesis». *Angiogenèse normale et tumorale*, vol. 144, no HS3, p. 4S3-4S6.
- Fishman, D. A., Y. Liu, S. M. Ellerbroek et M. S. Stack. 2001. «Lysophosphatidic acid promotes matrix metalloproteinase (MMP) activation and MMP-dependent invasion in ovarian cancer cells». *Cancer Research*, vol. 61, no 7, p. 3194-3199.
- Folkman, J. 1995. «Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease». *Nature Medicine*, vol. 1, no 1, p. 27-31.
- Folkman, J., et Y. Shing. 1992. «Angiogenesis». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no 16, p. 10931-10934.
- Folkman, J. 2003. «Fundamental concepts of the angiogenic process». *Current Molecular Medicine*, vol. 3, no 7, p. 643-651.
- Frankel, A., et G. B. Mills. 1996. «Peptide and lipid growth factors decrease cis-diamminedichloroplatinum- induced cell death in human ovarian cancer cells». *Clinical Cancer Research*, vol. 2, no 8, p. 1307-1313.

- Furie, B., et B. C. Furie. 2008. «Mechanisms of thrombus formation». *New England Journal of Medicine*, vol. 359, no 9, p. 938-949.
- Futreal, P. A., L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman et M. R. Stratton. 2004. «A census of human cancer genes». *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no 3, p. 177-183.
- Galli, R., A. Gritti, L. Bonfanti et A. L. Vescovi. 2003. «Neural stem cells: An overview». *Circulation Research*, vol. 92, no 6, p. 598-608.
- Genda, Takuya, Michiie Sakamoto, Takafumi Ichida, Hitoshi Asakura, Masamichi Kojiro, Shuh Narumiya et Setsuo Hirohashi. 1999. «Cell motility mediated by rho and rho-associated protein kinase plays a critical role in intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma». *Hepatology*, vol. 30, no 4, p. 1027-1036.
- Gerrard, J. M., S. E. Kindom et D. A. Peterson. 1979. «Lysophosphatidic acids. Influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux». *American Journal of Pathology*, vol. 96, no 2, p. 423-438.
- Gilbertson, R. J., et J. N. Rich. 2007. «Making a tumour's bed: Glioblastoma stem cells and the vascular niche». *Nature Reviews Cancer*, vol. 7, no 10, p. 733-736.
- Goetzl, E. J., H. Dolezalova, Y. Kong et L. Zeng. 1999. «Dual mechanisms for lysophospholipid induction of proliferation of human breast carcinoma cells». *Cancer Research*, vol. 59, no 18, p. 4732-4737.
- Greiffenberg, L., W. Goebel, K. S. Kim, I. Weiglein, A. Bubert, F. Engelbrecht, M. Stins et M. Kuhn. 1998. «Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells». *Infection and Immunity*, vol. 66, no 11, p. 5260-5267.
- Guyton, C.A., Hall, J.E. 2003. Précis de physiologie médicale. Piccin, Deuxième édition française, Padoue, Italie.
- Hanahan, D., et J. Folkman. 1996. «Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis». *Cell*, vol. 86, no 3, p. 353-364.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*, vol. 100, no 1, p. 57-70.
- Harvey, Kevin, Zachary Welch, A. Thomas Kovala, Joe G. N. Garcia et Denis English. 2002. «Comparative Analysis of in Vitro Angiogenic Activities of Endothelial Cells of Heterogeneous Origin». *Microvascular Research*, vol. 63, no 3, p. 316-326.

- 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.
- Hecht, J. H., J. A. Weiner, S. R. Post et J. Chun. 1996. «Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex». *Journal of Cell Biology*, vol. 135, no 4, p. 1071-1083.
- Hey, P. J., R. C. J. Twells, M. S. Phillips, Y. Nakagawa, S. D. Brown, Y. Kawaguchi, R. Cox, G. Xie, V. Dugan, H. Hammond, M. L. Metzker, J. A. Todd et J. F. Hess. 1998. «Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family». *Gene*, vol. 216, no 1, p. 103-111.
- Holash, J., S. J. Wiegand et G. D. Yancopoulos. 1999. «New model of tumor angiogenesis: Dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF». *Oncogene*, vol. 18, no 38, p. 5356-5362.
- Hope, K. J., L. Jin et J. E. Dick. 2004. «Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity». *Nature Immunology*, vol. 5, no 7, p. 738-743.
- Hope, J. M., F. q Wang, J. S. Whyte, E. V. Ariztia, W. Abdalla, K. Long et D. A. Fishman. 2009. «LPA receptor 2 mediates LPA-induced endometrial cancer invasion». *Gynecologic Oncology*, vol. 112, no 1, p. 215-223.
- Horst, D., S. K. Scheel, S. Liebmann, J. Neumann, S. Maatz, T. Kirchner et A. Jung. 2009. «The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer». *Journal of Pathology*, vol. 219, no 4, p. 427-434.
- Hu, Y. L., M. K. Tee, E. J. Goetzl, N. Auersperg, G. B. Mills, N. Ferrara et R. B. Jaffe. 2001. «Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells». *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 93, no 10, p. 762-768.
- Hu, X., F. J. Mendoza, J. Sun, V. Banerji, J. B. Johnston et S. B. Gibson. 2008. «Lysophosphatidic acid (LPA) induces the expression of VEGF leading to protection against apoptosis in B-cell derived malignancies». *Cellular Signalling*, vol. 20, no 6, p. 1198-1208.
- Imamura, F., T. Horai, M. Mukai, K. Shinkai, M. Sawada et H. Akedo. 1993. «Induction of in vitro tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 193, no 2, p. 497-503.

- Jobin, Francois. 1995. «L'hémostase.» Éditions Maloine, p.4-10.
- Jouanneau, E. 2008. «Angiogenesis and gliomas: Current issues and development of surrogate markers». *Neurosurgery*, vol. 62, no 1, p. 31-50.
- Kelly, Sarah E., Altomare Di Benedetto, Adelaide Greco, Candace M. Howard, Vincent E. Sollars, Donald A. Primerano, Jagan V. Valluri et Pier Paolo Claudio. 2010. «Rapid Selection and Proliferation of CD133(+) Cells from Cancer Cell Lines: Chemotherapeutic Implications». *PLoS ONE*, vol. 5, no 4, p. e10035.
- Kim, K. S., S. Sengupta, M. Berk, Y. G. Kwak, P. F. Escobar, J. Belinson, S. C. Mok et Y. Xu. 2006. «Hypoxia enhances lysophosphatidic acid responsiveness in ovarian cancer cells and lysophosphatidic acid induces ovarian tumor metastasis in vivo». *Cancer Research*, vol. 66, no 16, p. 7983-7990.
- Kim, Mi Ha, Jung Sun Park, Hee Jung Chang, Min Kyung Baek, Hyeong Rok Kim, Boo Ahn Shin, Bong Whan Ahn et Young Do Jung. 2008. «Lysophosphatidic acid promotes cell invasion by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator receptor in human gastric cancer cells». *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 104, no 3, p. 1102-1112.
- Klaunig, J. E., et L. M. Kamendulis (2004). 44: 239-267 p
- Kluk, M. J., et T Hla. 2002. «Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1 P/EDG-family of G-protein-coupled receptors». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1582, no 1-3, p. 72-80.
- Lai, W. Q., A. W. Irwan, H. H. Goh, A. J. Melendez, I. B. McInnes et B. P. Leung. 2009. «Distinct roles of sphingosine kinase 1 and 2 in murine collagen-induced arthritis». *Journal of Immunology*, vol. 183, no 3, p. 2097-2103.
- Langlois, B., H. Emonard, L. Martiny et S. Dedieu. 2009. «Multiple involvements of LRP-1 receptor in tumor progression». *Implications multiples du récepteur LRP-1 dans la progression tumorale*, vol. 57, no 7-8, p. 548-554.
- Lapierre, Danielle M., Natsuko Tanabe, Alexey Pereverzev, Martha Spencer, Ryan P. P. Shugg, S. Jeffrey Dixon et Stephen M. Sims. 2010. «Lysophosphatidic acid signals through multiple receptors in osteoclasts to elevate cytosolic calcium concentration, evoke retraction and promote cell survival». *Journal of Biological Chemistry*.
- Lee, H., Goetzl, E. J., et An, S. 2000. «Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing.» *Am.J. Physiol. Cell*, vol 278, p.612-618.
- Lee, A. Y. 2002. «Cancer and thromboembolic disease: Pathogenic mechanisms». *Cancer Treatment Reviews*, vol. 28, no 3, p. 137-140.

- Lee, C. W., R. Rivera, S. Gardell, A. E. Dubin et J. Chun. 2006a. «GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no 33, p. 23589-23597.
- Lee, J., S. Y. Park, E. K. Lee, C. G. Park, H. C. Chung, S. Y. Rha, Y. K. Kim, G. U. Bae, B. K. Kim, J. W. Han et H. Y. Lee. 2006b. «Activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is necessary for lysophosphatidic acid-induced vascular endothelial growth factor expression». *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no 21, p. 6351-6358.
- Li, Y., N. Wood, P. Grimsley, D. Yellowlees et P. K. Donnelly. 1998. «In vitro invasiveness of human breast cancer cells is promoted by low density lipoprotein receptor-related protein». *Invasion and Metastasis*, vol. 18, no 5-6, p. 240-251.
- Li, Y. et Ye, D. 2010. «Cancer Therapy By Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1.» *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 Jun 25. [Epub ahead of print].
- Li, Zongwei, Hua Wei, Xuebin Liu, Shengshou Hu, Xiangfeng Cong et Xi Chen. 2010. «LPA rescues ER stress-associated apoptosis in hypoxia and serum deprivation-stimulated mesenchymal stem cells». *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 9999, no 999A, p. n/a.
- Liu, Junye, Jing Zhang, Xiaowu Wang, Yan Li, Yongbin Chen, Kangchu Li, Jian Zhang, Libo Yao et Guozhen Guo. 2010. «HIF-1 and NDRG2 contribute to hypoxia-induced radioresistance of cervical cancer Hela cells». *Experimental Cell Research*, vol. 316, no 12, p. 1985-1993.
- Lu, Y et R. I. Mahato. 2009. «Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics» Springer New York, p.559-579.
- Lucke, S., et B. Levkau. 2010. «Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate». *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 26, no 1, p. 87-96.
- Mauco, G., H. Chap, M. F. Simon et L. Douste-Blazy. 1978. «Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C- and thrombin-treated platelets. Possible involvement of a platelet lipase». *Biochimie*, vol. 60, no 6-7, p. 653-661.
- Merchant, T. E., J. N. Kasimos, P. W. De Graaf, B. D. Minsky, L. W. Gierke et T. Glonek. 1991. «Phospholipid profiles of human colon cancer using 31P magnetic resonance spectroscopy». *International Journal of Colorectal Disease*, vol. 6, no 2, p. 121-126.
- Merchant, T. E., B. D. Minsky, G. Y. Lauwers, P. M. Diamantis, T. Haida et T. Glonek. 1999. «Esophageal cancer phospholipids correlated with histopathologic findings: A 31P NMR study». *NMR in Biomedicine*, vol. 12, no 4, p. 184-188.

- Michor, F., T. P. Hughes, Y. Iwasa, S. Branford, N. P. Shah, C. L. Sawyers et M. A. Nowak. 2005. «Dynamics of chronic myeloid leukaemia». *Nature*, vol. 435, no 7046, p. 1267-1270.
- Montel, V., A. Gaultier, R. D. Lester, W. M. Campana et S. L. Gonias. 2007. «The low-density lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development». *Cancer Research*, vol. 67, no 20, p. 9817-9824.
- Murph, M. M., G. H. Nguyen, H. Radhakrishna et G. B. Mills. 2008. «Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: Expression in cancer and mechanisms of regulation». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1781, no 9, p. 547-557.
- Nagy, J. A., L. Benjamin, H. Zeng, A. M. Dvorak et H. F. Dvorak. 2008. «Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis». *Angiogenesis*, vol. 11, no 2, p. 109-119.
- Nakanaga, K., Hama, K and Aoki, J. 2010. «Autotaxin—an LPA producing enzyme with diverse functions» *J. Biochem.* 148: p.13-24
- Nash, G. F., D. C. Walsh et A. K. Kakkar. 2001. «The role of the coagulation system in tumour angiogenesis». *Lancet Oncology*, vol. 2, no 10, p. 608-613.
- Noguchi, K., S. Ishii et T. Shimizu. 2003. «Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no 28, p. 25600-25606.
- Obo, Y., T. Yamada, M. Furukawa, M. Hotta, K. Honoki, N. Fukushima et T. Tsujiuchi. 2009. «Frequent mutations of lysophosphatidic acid receptor-1 gene in rat liver tumors». *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 660, no 1-2, p. 47-50.
- Oliver, T. G., et R. J. Wechsler-Reya. 2004. «Getting at the root and stem of brain tumors». *Neuron*, vol. 42, no 6, p. 885-888.
- Olivotto, M., et P. D. Sbarba. 2008. «Environmental restrictions within tumor ecosystems select for a convergent, hypoxia-resistant phenotype of cancer stem cells». *Cell Cycle*, vol. 7, no 2, p. 176-187.
- Panetti, T. S. 2002. «Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1582, no 1-3, p. 190-196.
- Park, S. Y., K. J. Jeong, J. Lee, D. S. Yoon, W. S. Choi, Y. K. Kim, J. W. Han, Y. M. Kim, B. K. Kim et H. Y. Lee. 2007. «Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression: Their inhibition by resveratrol». *Cancer Letters*, vol. 258, no 1, p. 63-69.

- Patiar, S., et A. L. Harris. 2006. «Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  as a cancer therapy target». *Endocrine-Related Cancer*, vol. 13, no SUPPL. 1, p. S61-S75.
- Pébay, A., C. S. Bonder et S. M. Pitson. 2007. «Stem cell regulation by lysophospholipids». *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, vol. 84, no 3-4, p. 83-97.
- Peyruchaud, O. 2009. «Novel implications for lysophospholipids, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, as drug targets in cancer». *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 9, no 4, p. 381-391.
- Peyruchaud, O., A. Boucharaba, J. S. Saulnier-Blache et P. Clézardin. 2005. «Lysophosphatidic acid: A new link between blood platelets and bone metastasis». *Acide lysophosphatidique: Un nouveau lien entre plaquettes sanguines et métastases osseuses*, vol. 21, no 4, p. 353-355.
- Pinedo, H. M., H. M. W. Verheul, R. J. D'Amato et J. Folkman. 1998. «Involvement of platelets in tumour angiogenesis?». *Lancet*, vol. 352, no 9142, p. 1775-1777.
- Pinson, K. I., J. Brennan, S. Monkley, B. J. Avery et W. C. Skarnes. 2000. «An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice». *Nature*, vol. 407, no 6803, p. 535-538.
- Pirie-Shepherd, S. R. 2003. «Regulation of angiogenesis by the hemostatic system». *Frontiers in Bioscience*, vol. 8, p. d286-d293.
- Pitson, S. M., et A. Pébay. 2009. «Regulation of stem cell pluripotency and neural differentiation by lysophospholipids». *NeuroSignals*, vol. 17, no 4, p. 242-254.
- Ptaszynska, M. M., M. L. Pendrak, R. W. Bandle, M. L. Stracke et D. D. Roberts. 2008. «Positive feedback between vascular endothelial growth factor-A and autotaxin in ovarian cancer cells». *Molecular Cancer Research*, vol. 6, no 3, p. 352-363.
- Pustilnik, T. B., V. Estrella, J. R. Wiener, M. Mao, A. Eder, M. A. V. Watt, R. C. Bast Jr et G. B. Mills. 1999. «Lysophosphatidic acid induces urokinase secretion by ovarian cancer cells». *Clinical Cancer Research*, vol. 5, no 11, p. 3704-3710.
- Qin, K., X. Jiang, Y. Zou, J. Wang, L. Qin et Y. Zeng. 2010. «Study on The Proliferation and Drug-resistance of Human Brain Tumor Stem-like Cells». *Cellular and Molecular Neurobiology*, p. 1-6.
- Rebeck, G. W., M. J. LaDu, S. Estus, G. Bu et E. J. Weeber. 2006. «The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS». *Molecular Neurodegeneration*, vol. 1, no 1.
- Régina, A., M. Demeule, C. Ché, I. Lavallée, J. Poirier, R. Gabathuler, R. Béliveau et J. P. Castaigne. 2008. «Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel

- and the new brain delivery vector Angiopep-2». *British Journal of Pharmacology*, vol. 155, no 2, p. 185-197.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke et I. L. Weissman. 2001. «Stem cells, cancer, and cancer stem cells». *Nature*, vol. 414, no 6859, p. 105-111.
- Sawada, K., K. I. Morishige, M. Tahara, Y. Ikebuchi, R. Kawagishi, K. Tasaka et Y. Murata. 2002. «Lysophosphatidic acid induces focal adhesion assembly through RHO/RHO-associated kinase pathway in human ovarian cancer cells». *Gynecologic Oncology*, vol. 87, no 3, p. 252-259.
- Scoazec, J. Y. 2000. «Tumor angiogenesis: Histological features». *L'angiogenèse tumorale: Aspects histologiques*, vol. 184, no 3, p. 547-555.
- Shmelkov, S. V., R. St.Clair, D. Lyden et S. Rafii. 2005. «AC133/CD133/Prominin-1». *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 37, no 4, p. 715-719.
- Simon, J. M. 2007. «Hypoxia and angiogenesis». *Hypoxie et angiogenèse*, vol. 94, no SPECIAL, p. S160-S165.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, T. Hide et P. B. Dirks. 2004. «Cancer stem cells in nervous system tumors». *Oncogene*, vol. 23, no 43 REV. ISS. 6, p. 7267-7273.
- Smyth, S. S., C. C. Joneckis et L. V. Parise. 1993. «Regulation of vascular integrins». *Blood*, vol. 81, no 11, p. 2827-2843.
- Song, H., Y. Li, J. Lee, A. L. Schwartz et G. Bu. 2009. «Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9». *Cancer Research*, vol. 69, no 3, p. 879-886.
- Stins, M. F., F. Gilles et K. S. Kim. 1997. «Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells». *Journal of Neuroimmunology*, vol. 76, no 1-2, p. 81-90.
- Strongin, Alex Y. 2010. «Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1803, no 1, p. 133-141.
- Stupack, D. G., et D. A. Cheresh (2004). 64: 207-238 p
- Szekanecz, Zoltán, Timea Besenyei, György Paragh et Alisa E. Koch. 2010. «Actualités sur l'angiogenèse synoviale». *Revue du Rhumatisme*, vol. 77, no 1, p. 14-20.
- Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J.P. Saint-Jeannet et X. He. 2000. «LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction». *Nature*, vol. 407, no 6803, p. 530-535.

- Tubiana, Maurice. 2008. «Généralités sur la cancérogenèse». *Comptes Rendus Biologies*, vol. 331, no 2, p. 114-125.
- Uchida, N., D. W. Buck, D. He, M. J. Reitsma, M. Masek, T. V. Phan, A. S. Tsukamoto, F. H. Gage et I. L. Weissman. 2000. «Direct isolation of human central nervous system stem cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no 26, p. 14720-14725.
- Valet, P., C. Pagès, O. Jeanneton, D. Daviaud, P. Barbe, M. Record, J. S. Saulnier-Blache et M. Lafontan. 1998. «Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth». *The Journal of clinical investigation*, vol. 101, no 7, p. 1431-1438.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic et M. Mazur. 2006. «Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer». *Chemico-Biological Interactions*, vol. 160, no 1, p. 1-40.
- Van Uden, E., D. E. Kang, E. H. Koo et E. Masliah. 2000. «LDL receptor-related protein (LRP) in Alzheimer's disease: Towards a unified theory of pathogenesis». *Microscopy Research and Technique*, vol. 50, no 4, p. 268-272.
- Van Wesenbeeck, L., E. Cleiren, J. Gram, R. K. Beals, O. Bénichou, D. Scopelliti, L. Key, T. Renton, C. Bartels, Y. Gong, M. L. Warman, M. C. De Vernejoul, J. Bollerslev et W. Van Hul. 2003. «Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density». *American Journal of Human Genetics*, vol. 72, no 3, p. 763-771.
- Wang, G. L., Z. Q. Wen, W. P. Xu, Z. Y. Wang, X. L. Du et F. Wang. 2008. «Inhibition of lysophosphatidic acid receptor-2 expression by RNA interference decreases lysophosphatidic acid-induced urokinase plasminogen activator activation, cell invasion, and migration in ovarian cancer SKOV-3 cells». *Croatian Medical Journal*, vol. 49, no 2, p. 175-181.
- Wang, F. q., E. V. Ariztia, L. R. Boyd, F. R. Horton, Y. Smicun, J. A. Hetherington, P. J. Smith et D. A. Fishman. 2010a. «Lysophosphatidic acid (LPA) effects on endometrial carcinoma in vitro proliferation, invasion, and matrix metalloproteinase activity». *Gynecologic Oncology*, vol. 117, no 1, p. 88-95.
- Wang Y, Zhu Y, Qiu F, Zhang T, Chen Z, Zheng S, et Huang, J. 2010. «Activation of Akt and MAPK pathways enhances the tumorigenicity of CD133+ primary colon cancer cells.» *Carcinogenesis*. 2010b. Jun 8. [Epub ahead of print].
- Wehrli, M., S. T. Dougan, K. Caldwell, L. O'Keefe, S. Schwartz, D. Valzel-Ohayon, E. Schejter, A. Tomlinson et S. DiNardo. 2000. «Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling». *Nature*, vol. 407, no 6803, p. 527-530.

- Weinberg, Robert A. 2007. «The biology of cancer.» Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Wicha, M. S., S. Liu et G. Dontu. 2006. «Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift». *Cancer Research*, vol. 66, no 4, p. 1883-1890.
- Wojtukiewicz, M. Z., E. Sierko, P. Klement et J. Rak. 2001. «The hemostatic system and angiogenesis in malignancy». *Neoplasia*, vol. 3, no 5, p. 371-384.
- Wu, Wen Ting, Chiung-Nien Chen, Chi Iou Lin, Jiun Hong Chen et Hsinyu Lee. 2005. «Lysophospholipids Enhance Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Human Endothelial Cells». *Endocrinology*, vol. 146, no 8, p. 3387-3400.
- Yamamoto, M., K. Ikeda, K. Ohshima, H. Tsugu, H. Kimura et M. Tomonaga. 1998. «Expression and cellular localization of low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in human glioblastoma in vivo». *Brain tumor pathology*, vol. 15, no 1, p. 23-30.
- Yao, Y., X. Tang, S. Li, Y. Mao et L. Zhou. 2009. «Brain tumor stem cells: view from cell proliferation». *Surgical Neurology*, vol. 71, no 3, p. 274-279.
- Yoshida, T., M. Komaki, H. Hattori, J. Negishi, A. Kishida, I. Morita et M. Abe. 2010. «Therapeutic angiogenesis by implantation of a capillary structure constituted of human adipose tissue microvascular endothelial cells». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, no 7, p. 1300-1306.
- You, H., W. Ding et C. B. Rountree. 2010. «Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor- $\beta$ ». *Hepatology*, vol. 51, no 5, p. 1635-1644.
- Yu, S., M. M. Murph, Y. Lu, S. Liu, H. S. Hall, J. Liu, C. Stephens, X. Fang et G. B. Mills. 2008. «Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells». *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 100, no 22, p. 1630-1642.
- Zhou, Z., J. Niu et Z. Zhang. 2009. «The role of lysophosphatidic acid receptors in phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells». *Molecular Biology Reports*, p. 1-12.
- Zhu, T., F. Gobeil Jr, A. Vazquez-Tello, M. Leduc, L. Rihakova, M. Bossolasco, G. Bkaily, K. Peri, D. R. Varma, R. Orvoine et S. Chemtob. 2006. «Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: A paradigm based on PGE2, PAF, and LPA1 receptors». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 84, no 3-4, p. 377-391.
- Zhou F, Cui C, Ge Y, Chen H, Li Q, Yang Z, Wu G, Sun S, Chen K, Gu J, Jiang J. et Wei Y.

2010. « $\alpha$ 2,3-Sialylation Regulates the Stability of Stem Cell Marker CD133.»  
*J Biochem.* 2010 Jun 15. [Epub ahead of print].