

Faculté des bioingénieurs

Le rôle de Syndecan-1 dans le cancer pulmonaire induit par des fibres : une approche en images qualitatives

Auteur : Nathalie De Smet

Promoteur : François Huaux

Co-promoteur : Christine Dupont

Lecteurs : René Rezsohazy et Pierre van der Bruggen

Année académique 2022-2023

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Bioingénieur : master en chimie et bioindustries – option santé humaine

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement mon promoteur M. Huaux pour m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même en terme de recherche et de professionnalisme. Grâce à lui, j'ai beaucoup appris sur la recherche scientifique, tant concernant l'enthousiasme d'obtenir des « bons » résultats que comment faire face aux aléas des expériences scientifiques. Je le remercie également pour tous ces bons conseils.

Je tiens également à remercier Caroline Bouzin, Aurélie Daumerie et Pierre Michel de la plateforme imagerie ZIP d'avoir eu la patience pour me former dans toutes les techniques d'immunohistochimie que je n'avais jamais réalisées et qui m'ont permises de répondre aux questions de recherche de mon mémoire. J'ai beaucoup aimé les découvrir.

Ensuite, je remercie toute l'équipe du LTAP, (Saloua, Amandine, Laeticia, Léa, Nadtha, Francine, Ricardo et Yousof) pour leur accueil chaleureux, leurs bons conseils et pour avoir pris le temps de répondre à mes questions. Je n'oublierai pas les pauses de midi et les PTG qui embellissaient mes journées ou mes soirées. De plus, j'ai une attention particulière pour Saloua qui m'a aidée à réaliser mes expériences ELISA et j'ai aussi une pensée pour les autres mémorants du labo en sciences biomédicales que j'ai apprécié apprendre à connaître.

Finalement, je remercie grandement ma famille et mes amis qui m'ont soutenue et aidée pendant mes 5 années d'études à l'UCLouvain. Je porte particulièrement mes parents dans mon cœur qui m'ont permis de réaliser de si belles études.

Je dédie ce mémoire à mes deux sœurs et frère, Dorothee, Victoria et Jean-Thomas pour qui j'essaie d'être le meilleur exemple à suivre au quotidien et pour qui j'espère encore l'être pendant longtemps !

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
1. ABRÉVIATIONS	4
2. AVANT-PROPOS	6
3. ABSTRACT	8
4. INTRODUCTION	9
4.1 LE CANCER PULMONAIRE	9
4.2 LES NANOTUBES DE CARBONE (CNT)	14
4.3 MÉCANISMES DE TOXICITÉ DES CNT INDUISANT LE CANCER PULMONAIRE	16
4.3.1 <i>Effets directs</i>	16
4.3.2 <i>Inflammation</i>	17
4.3.3 <i>Immunosuppression</i>	19
4.4 SIMILARITÉS AVEC LE MÉSOTHÉLIOME	21
4.5 SYNDÉCAN-1 COMME MÉDIATEUR IMMUNOSUPPRESSEUR	22
4.5.1 <i>Syndécan-1 et les macrophages</i>	23
4.5.2 <i>Syndécan-1 et le cancer</i>	23
4.5.3 <i>Syndécan-1 et l'adénocarcinome pulmonaire</i>	24
5. OBJECTIFS ET STRATÉGIES	25
5.1 OBJECTIFS	25
5.2 STRATÉGIES EXPÉRIMENTALES.....	25
6. MATÉRIELS ET MÉTHODES	26
6.1 MODÈLE DE CANCER PULMONAIRE CHEZ LA SOURIS.....	26
6.2 EXPÉRIENCE 1 : QUANTIFICATION DE SYNDÉCAN-1 SOLUBLE.....	27
6.2.1 <i>Échantillons</i>	27
6.2.2 <i>Principe de l'ELISA</i>	28
6.2.3 <i>Protocole</i>	28
6.2.4 <i>Tests statistiques</i>	29
6.3 EXPÉRIENCE 2 : (CO)LOCALISATION DE SYNDÉCAN-1 ET DES MACROPHAGES DANS LES POUMONS	30
6.3.1 <i>Échantillons</i>	30

6.3.2	<i>Coupe des blocs de paraffine.....</i>	31
6.3.3	<i>Principe de l'immunohistochimie (indirecte) en DAB</i>	32
6.3.4	<i>Protocole de l'immunohistochimie (indirecte) en DAB.....</i>	32
6.3.5	<i>Essais détaillés de l'expérience par immunohistochimie (indirecte) en DAB</i>	34
6.3.6	<i>Principe de l'immunofluorescence (indirecte) en multiplex</i>	40
6.3.7	<i>Protocole de l'immunofluorescence (indirecte) en multiplex.....</i>	40
6.3.8	<i>Essais détaillés de l'immunofluorescence (indirecte) en multiplex</i>	41
7.	RÉSULTATS.....	44
7.1	IMPACT DES CNT SUR LA CONCENTRATION PLASMIQUE ET PULMONAIRE DE SYNDÉCAN-1 SOLUBLE ..	44
7.2	LA CORRÉLATION ENTRE LA CONCENTRATION DE SYNDÉCAN-1 SOLUBLE ET LES DIFFÉRENTS STADES DE L'ADÉNOCARCINOME.....	45
7.3	COLOCALISATION DES MACROPHAGES ET SYNDÉCAN-1 DANS LES POUMONS.....	47
7.3.1	<i>Localisation des macrophages pulmonaires et de Syndécan-1 par immunohistochimie en DAB</i>	47
7.3.2	<i>Colocalisation des macrophages pulmonaires et de Syndécan-1 par immunofluorescence</i>	51
8.	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	54
9.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	55
9.1	PERSPECTIVES	57
10.	BIBLIOGRAPHIE	59

1. Abréviations

Nanotubes de carbone	CNT
Organisation Mondiale de la Santé	OMS
Atypical adenomatous hyperplasia	AAH
Adenocarcinoma in situ	AIS
Minimally invasive adenocarcinoma	MIA
Fully invasive adenocarcinoma	FIA
Computed Tomography Screening	CT
Ground Glass Nodule	GGN
Single Walled Carbon NanoTube	SWCNT
Multi-Walled Carbon NanoTube	MWCNT
International Agency for Research on Cancer	IARC
Espèces oxydatives réactionnelles	ROS
Macrophage Disappearance Reaction	MDR
Pattern Recognition Receptor	PRR
Toll-like receptors	TLR
Scavenger-like receptors	SR
Pathogen-Associated Molecular Patterns	PAMPs
Damaged-Associated Molecular Patterns	DAMPs
Lymphocytes T	LT
lymphocytes T régulateurs	LT-reg

Tumor Associated Macrophages	TAM
Small Peritoneal Macrophages	SPM
Large Peritoneal Macrophages	LPM
Syndécan-1	SDC-1 ou CD138
Myeloid Derived Suppressor Cells	MDSC
Indoleamine-2,3-dioxygenase	IDO
Glycosaminoglycans	GAG
Héparanes sulfates	HS
Facteur de croissance	GF
Topoisomérase I	Topo 1
Histones acétyltransférases	HAT
Liquide broncho-alvéolaire	BAL
Hématoxyline et Éosine	H&E
3-méthylcholantrène	3MC
Carbon black	CB
Enzyme-Linked-Immuno-Assay	ELISA
Horseradish Peroxidase	HRP
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	TMB
Immunohistochimie	IHC
3,3'-Diaminobenzidine	DAB
Heat-Induced Epitope Retrieval	HIER

2. Avant-propos

L'adénocarcinome pulmonaire est une tumeur maligne qui trouve son origine dans les alvéoles pulmonaires. Les causes principales menant au développement de ce cancer sont la fumée de cigarettes et l'exposition à des fibres toxiques telles que l'amiante et les nanotubes de carbone (CNT). Par certaines propriétés physico-chimiques, les CNT montrent des similarités avec les fibres d'asbeste. Ainsi, il a été découvert que certains types de CNT sont toxiques, comme les MWCNT-7 classifiés depuis 2015 par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) de cancérogènes potentiels chez l'homme. Une association entre le développement de l'adénocarcinome pulmonaire et les CNT a été établie dans des modèles murins, mais les mécanismes spécifiques ne sont encore que peu connus.

Outre l'adénocarcinome pulmonaire, les CNT induisent également le mésothéliome pleural malin dont le modèle expérimental est semblable. Récemment, un nouveau type de macrophages a été découvert par notre laboratoire (LTAP, UCLouvain) durant le stade précoce du développement du mésothéliome : les *Small Peritoneal Macrophages* (SPM) *immunosuppresseurs*, qui favorisent le développement d'un microenvironnement immunosuppresseur précoce et qui surexpriment notamment spécifiquement le protéoglycan Syndécan-1.

L'objectif de ce projet de recherche est de déterminer si des macrophages pulmonaires lors du développement de l'adénocarcinome pulmonaire expriment également Syndécan-1. Par ailleurs, la relation entre d'un côté la quantité de Syndécan-1 et de l'autre les différents stades de l'adénocarcinome pulmonaire ou l'instillation de CNT est analysée.

Afin de répondre à ces objectifs, un protocole de colocalisation des macrophages pulmonaires et de Syndécan-1 a été mis au point par immunohistochimie (IHC) et des analyses de quantification de Syndécan-1 soluble ont été réalisées par ELISA ; Tous les deux à l'aide d'un modèle d'adénocarcinome pulmonaire murin induit par des CNT développé l'année passée dans notre laboratoire (LTAP, UCLouvain).

Selon nos résultats, les macrophages pulmonaires n'expriment pas le Syndécan-1, excepté dans une zone intra-tumorale particulière du dernier stade de l'adénocarcinome pulmonaire.

Enfin, nos résultats indiquent que les CNT influencent la quantité de Syndécan-1 dans le plasma et que le stade pré-cancéreux de l'adénocarcinome pulmonaire est corrélé positivement à la présence du protéoglycan dans le plasma également.

3. Abstract

Lung adenocarcinoma is a malignant tumor which originates in the alveoli of the lungs. The main causes leading to the development of this cancer are cigarette smoke and exposure to toxic fibers such as asbestos and carbon nanotubes (CNT). CNTs have certain physico-chemical properties similar to asbestos fibers. Some types of CNT have been found to be toxic, such as MWCNT-7, which has been classified as a potential human carcinogen by the IARC since 2015. An association between the development of lung adenocarcinoma and CNT has been established in mouse models, but the specific mechanisms are still poorly understood.

In addition to lung adenocarcinoma, CNT also induce malignant pleural mesothelioma, for which the experimental model is similar. Recently, a new type of macrophages was discovered by our laboratory during the early stage of mesothelioma development: immunosuppressive Small Peritoneal Macrophages (SPM), which promote the development of an early immunosuppressive microenvironment and specifically overexpress the proteoglycan Syndecan-1.

The aim of this research project is to determine whether lung macrophages during the development of lung adenocarcinoma also express Syndecan-1. Furthermore, the relationship between, on one side, the quantity of Syndecan-1 and, on the other, the different stages of lung adenocarcinoma or the instillation of CNT will be analyzed.

To meet these objectives, a protocol for localizing lung macrophages and Syndecan-1 was developed by immunohistochemistry (IHC) and analyses for quantifying soluble Syndecan-1 were carried out by ELISA, both using a CNT-induced murine lung adenocarcinoma model developed last year in our laboratory (LTAP, UCLouvain).

According to our results, lung macrophages do not express Syndecan-1, except in a particular intra-tumoral zone in the last stage of lung adenocarcinoma. Lastly, our results indicate that CNT influence the amount of Syndecan-1 in plasma and that the pre-cancerous stage of lung adenocarcinoma correlates positively with the presence of the proteoglycan in plasma too.

4. Introduction

4.1 Le cancer pulmonaire

Chaque année, le cancer pulmonaire compte plus ou moins deux millions de nouveaux cas et un peu moins de deux millions de morts dans le monde. Son taux de mortalité est le plus haut parmi les autres cancers. (Thai et al., 2021) En effet, la probabilité de survie au cancer pulmonaire reste faible car son développement est souvent asymptomatique dans les stades précoces. (Succony et al., 2021)

Il existe deux types de cancers pulmonaires principaux : les cancers pulmonaires à petites cellules et les cancers pulmonaires non à petites cellules qui sont les plus fréquents (85% des cas). (Spella & Stathopoulos, 2021). Ces derniers cancers comptent trois sous-types différents : le carcinome à grandes cellules, le carcinome épidermoïde et l'adénocarcinome. Ce dernier est devenu depuis 1998 le type de cancer pulmonaire le plus commun et son incidence augmente chaque année. (Hutchinson et al., 2019).

L'adénocarcinome pulmonaire est une tumeur maligne associée à certaines mutations génétiques, qui se caractérise par la prolifération de pneumocytes de type II transformés. (Borczuk, 2022) Les pneumocytes de type II sont des cellules alvéolaires épithéliales produisant un surfactant ayant pour objectif de réduire la tension de surface alvéolaire lors de la respiration et ainsi d'éviter l'affaissement des alvéoles. (Seguin et al., 2022) Les tumeurs d'adénocarcinome présentent une grande hétérogénéité entre elles car les mutations génétiques diffèrent d'un patient à l'autre. (Spella & Stathopoulos, 2021)

Les adénocarcinomes peuvent présenter plusieurs caractéristiques morphologiques au niveau des cellules tumorales invasives : lépidique, acinaire, papillaire, micro-papillaire et solide. Ces caractéristiques constituent les sous-types des adénocarcinomes. Souvent, un mélange de ces sous-types est observé. (Succony et al., 2021)

L'évolution de l'adénocarcinome pulmonaire comporte quatre stades différents selon la classification des tumeurs pulmonaires de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2015 : l'*atypical adenomatous hyperplasia* (AAH), l'*adenocarcinoma in situ* (AIS), le *minimally invasive adenocarcinoma* (MIA) et finalement le *fully invasive adenocarcinoma* (FIA). (Succony et al., 2021) Les deux premiers stades (précoces) ne présentent seulement que des lésions pré-invasives.

Le premier stade de l'adénocarcinome, l'*atypical adenomatous hyperplasia*, est caractérisé par l'apparition de GGN de faible densité (moins de 5 mm) et par une croissance purement lépidique. La prolifération d'un petit foyer de pneumocytes épithéliaux de type II le long des parois alvéolaires et des bronches sans invasion est observable (Hutchinson et al., 2019). Le deuxième stade, l'*adenocarcinoma in situ*, connaît également une croissance purement lépidique non invasive d'une lésion de pneumocytes de type II, mais d'une plus grande taille (moins de 30mm) et densité. (Succony et al., 2021).

Le Computed Tomography Screening (CT) est utilisé pour détecter ces stades précoces. Grâce au CT il est possible d'observer des modifications au niveau du parenchyme pulmonaire. L'anomalie précoce la plus fréquemment identifiée est appelée « Ground Glass Nodule » (GGN). Sur les scans CT les GGN sont observables sous la forme d'opacités arrondies du parenchyme pulmonaire. (Hutchinson et al., 2019) Avec le temps, ces zones « ground glass » peuvent augmenter en taille, devenir solides et finalement évoluer en une tumeur invasive. Cependant, la probabilité de la transformation de ces GGN en cancer dit invasif est faible (environ 10%). La plupart des GGN disparaissent ou ne se développent jamais. (Succony et al., 2021)

Une petite invasion stromale (de moins de 5mm) apparaît à partir du *minimally invasive adenocarcinoma*, le troisième stade de l'adénocarcinome. Le foyer invasif est alors vu comme un composant solide sur scan CT. Cependant la croissance tumorale du troisième stade reste principalement lépidique.

Finalement, le dernier stade de l'adénocarcinome, le *fully invasive adenocarcinoma*, est atteint en présence d'un foyer invasif de plus de 5 mm et d'un sous-type cellulaire qui n'est plus lépidique ou bien en présence d'un stroma myofibroblastique associé à une infiltration de cellules tumorales, ou en cas d'invasion de la plèvre, des vaisseaux sanguins ou des vaisseaux lymphatiques, ou encore en cas de nécrose tumorale. (Succony et al., 2021)

Plusieurs méthodes de traitement existent contre le développement de ce cancer pulmonaire. L'objectif de ces traitements est de bloquer les voies permettant aux tumeurs d'inhiber la réponse immunitaire. Par exemple, des médicaments pour empêcher l'inactivation des lymphocytes T par les protéines *immune checkpoints* PDL1/PD1 ont été approuvés. Toutefois, la grande diversité des voies qui contribuent au développement et à la survie des tumeurs rend la création d'un traitement efficace difficile. (*Déverrouiller le système immunitaire contre les cellules cancéreuses* | Institut Curie, n.d. ; Hutchinson et al., 2019)

Par ailleurs, la probabilité de progression du stade pré-invasif du cancer vers le stade d'adénocarcinome invasif est faible. Certains cancers pré-invasifs vont régresser ou rester stables. Cette probabilité dépend entre autres de la localisation cellulaire d'origine des mutations et elle croît avec l'âge, le sexe masculin, un historique de cancer pulmonaire et lorsque les lésions sont grandes. La prévention est donc également proposée par les pathologistes. Une période de surveillance est alors mise en place afin de détecter et de surveiller la présence de traces de lésions pulmonaires pré-invasives. (Succony et al., 2021)

Les causes menant au développement d'un adénocarcinome pulmonaire sont diverses. La cause principale reste la fumée de tabac/cigarettes qui contient de multiples espèces cancérigènes. Une exposition à d'autres agents polluants comme des métaux lourds et des fibres toxiques, telles que l'amiante et les nanotubes de carbone (CNT), peuvent également entraîner des lésions pulmonaires et par la suite l'adénocarcinome invasif. (Myers & Wallen, 2022 ; Seguin et al., 2022)

Aujourd'hui, toutes les formes d'amiante sont considérées comme étant cancérigène par l'International Agency for Research on Cancer (IARC). À cause de sa haute toxicité, l'utilisation d'amiante est interdite en Belgique depuis 1998 et en Europe depuis 2005. (*Asbestos — European Environment Agency*, n.d. ; 'Législation amiante en Belgique', n.d.)

Les risques d'exposition les plus grands sont associés à une activité professionnelle liée à des matériaux contenant de l'amiante comme ceux utilisés pour l'isolation des bâtiments. (Husgafvel-Pursiainen et al., 1999) L'association entre l'exposition aux fibres d'asbeste et l'adénocarcinome pulmonaire invasif est connue depuis les années 1970.

Les mécanismes cancérigènes pulmonaires induits par ces fibres d'asbeste incluent entre autres des mutations génotoxiques et de l'inflammation chronique. (Husgafvel-Pursiainen et al., 1999 ; Thomas et al., 2004) Lors du diagnostic, la plupart des patients exposés à l'amiante sont déjà atteints du dernier (ou de l'avant dernier) stade de l'adénocarcinome, le FIA à cause de son développement souvent asymptomatique. Toutefois, il est possible de détecter également d'autres stades du cancer. (Cheng et al., 2020) Par exemple, Thomas et al., (2004) a reporté le cas d'un patient souffrant du premier stade de l'adénocarcinome, l'AAH, ainsi que du dernier stade, le FIA et du mésothéliome pleural malin. Il faut noter qu'une co-cancérogénicité pulmonaire est généralement très rare. (Thomas et al., 2004)

Par certaines propriétés physico-chimiques comme leur grande bio-persistance, leur structure fibreuse et leur rapport hauteur/largeur élevé, les CNT montrent des similarités avec les fibres d'asbeste. (Sheikhpour et al., 2020) De plus, leur petite taille et leur faible densité les rendent hautement respirables. (Sargent et al., 2014) C'est pourquoi, de nombreuses études ont été réalisées depuis leur découverte afin d'investiguer les éventuels risques de toxicité des CNT suite à leur inhalation et cela afin d'essayer d'éviter le développement d'une pandémie comme avec l'amiante. (Kane et al., 2018), (Stayner et al., 2013)

Il a été découvert que les CNT et l'amiante induisent des types de pathologies similaires telles que la fibrose et le cancer. (Donaldson et al., 2013) Ainsi, une association entre les CNT et l'adénocarcinome pulmonaire a également été établi dans des modèles murins. (Sargent et al., 2014) Sargent et ses collègues, (2014) ont observé que l'inhalation de CNT, combinée au pré-traitement d'un co-cancérigène, induit la promotion de différents stades de l'adénocarcinome murin, notamment la *Regenerative alveolar epithelial hyperplasia*, le *bronchiolo-alveolar adenoma*, le *bronchiolo-alveolar adenocarcinoma*, correspondant à des stades d'adénocarcinome pulmonaire invasifs et pré-invasifs chez l'humain. (Sargent et al., 2014)

Un modèle d'adénocarcinome pulmonaire induit par des CNT a également été développé chez la souris dans le laboratoire LTAP à l'UCLouvain. L'instillation par aspiration oro-pharyngée de CNT en combinaison avec un co-cancérogène (3MC) a induit la promotion de différents stades de l'adénocarcinome pulmonaire, mais aucune métastase n'ont été observées. (Quoidbach, 2022)

Cependant, contrairement à l'amiante, plusieurs études ont révélé que seulement certains types de CNT sont toxiques. Ainsi, d'après plusieurs études, les CNT longs induisent des réponses inflammatoires plus prononcées que ceux de longueur courte. (Vietti et al., 2016) Les CNT fins semblent plus toxiques que les plus épais. (Lanone et al., 2013) Ou encore, d'autres chercheurs ont comparé le potentiel cancérogène de fibres de CNT courbes et rigides et ont démontré que seulement ces derniers causent une inflammation significative. (Duke & Bonner, 2018)

Depuis 2015, l'IARC a classifié les MWCNT-7, un type de CNT, de cancérogènes potentiels chez l'homme (Groupe 2B). Les MWCNT-7 sont notamment constitués de longues fibres. (Møller et al., 2021) Les autres CNT restants, sont eux considérés comme non classifiables concernant leur cancérogénicité chez l'homme (Groupe 3). (Grosse et al., 2014)

4.2 Les nanotubes de carbone (CNT)

Les nanotubes de carbone (CNT) sont des nanomatériaux constitués de feuillets de graphène enroulés sur eux-mêmes sous la forme de tubes cylindriques. Les feuillets de graphène sont composés d'atomes de carbone arrangés selon une matrice hexagonale. (Dong & Ma, 2019)

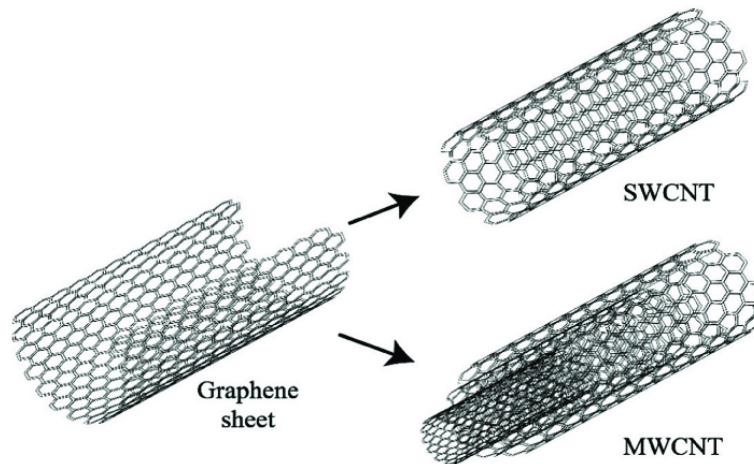


FIGURE 1 - REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES SWCNT ET DES MWCNT, COMPOSÉS RESPECTIVEMENT D'UN OU DE PLUSIEURS FEUILLETS DE GRAPHÈNE. (SHEIKHPOUR ET AL., 2020)

En fonction du nombre de couches de graphène qu'ils possèdent, deux formes de CNT sont différenciées. D'une part, les *Single Walled Carbon NanoTube* (SWCNT) n'en présentent qu'une seule et d'autre part, les *Multi-Walled Carbon Nanotube* (MWCNT) en présentent plusieurs. (Negri et al., 2020) Leurs diamètres peuvent varier de 1 à 3nm et de 10 à 200nm respectivement. Tandis que leur longueur varie de quelques centaines de nanomètres à quelques dizaines de micromètres. (Trovato et al., 2018)

Les nanotubes de carbone ont été mis sur le marché à la fin du 20^{ème} siècle et constituent un exemple du succès des nanotechnologies. Ils sont synthétisés à l'aide de trois techniques de fabrication différentes, notamment la décharge électrique, l'ablation laser et le dépôt de carbone par réaction catalytique en phase vapeur. (Kane et al., 2018) Ces dernières années, grâce à leurs propriétés physico-chimiques très intéressantes, la production de matériaux contenant des CNT a fortement augmenté. Ils présentent par exemple une bonne conductivité électrique et thermique, une aérosolisation aisée, de bonnes propriétés optiques ainsi qu'une résistance mécanique remarquable. (Dong & Ma, 2019 ; Vietti et al., 2016) Ainsi, les CNT connaissent de nombreuses applications dans des domaines tels que la médecine, l'électronique et la construction.

En médecine, ils sont entre autres utilisés comme vecteurs de médicaments et de biomolécules car ils sont hydrophobes et donc capables de traverser des membranes biologiques. (Trovato et al., 2018)

Les principales situations d'exposition à ces fibres se trouvent dans le cadre professionnel, mais sont également possible durant le cycle de vie des produits finaux. (Kane et al., 2018)

4.3 Mécanismes de toxicité des CNT induisant le cancer pulmonaire

Toute exposition à des fibres cancérogènes tels que certains CNT peut entraîner l'apparition d'un cancer. Le type de ce cancer variera en fonction du lieu de dépôt des fibres. Par exemple, si les CNT atteignent la cavité pleurale, le risque de développement d'un cancer de la plèvre, également appelé mésothéliome, augmente. Si les CNT se déposent dans la région alvéolaire des poumons, ils peuvent induire l'adénocarcinome pulmonaire.

Le développement de l'adénocarcinome pulmonaire induit par des CNT inclut des mécanismes de mutations génotoxiques, d'inflammation et d'immunosuppression. Cependant, les mécanismes spécifiques ne sont encore que peu connus. (Dong & Ma, 2018)

4.3.1 Effets directs

Les CNT possèdent des propriétés génotoxiques qui entraînent une instabilité génomique et qui favorisent la progression des tumeurs. (Møller et al., 2014) En effet, l'instabilité génétique induira la transformation de cellules épithéliales en cellules tumorales (malignes). (Dong & Ma, 2015 ; Dong & Ma, 2019)

L'inhalation de CNT induit une augmentation de la production d'espèces oxydatives réactionnelles (ROS) suite à des dégâts cellulaires dans plusieurs types de cellules tels que les mitochondries, les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires ou suite à la présence d'impuretés métalliques sur les CNT. (Dong & Ma, 2015) Cette augmentation de ROS est souvent associée à une déplétion d'anti-oxydants. La présence d'une trop grande quantité de ROS par rapport à la quantité d'espèces antioxydantes a pour conséquence l'établissement d'un stress oxydatif. Ce stress oxydatif, en plus de stimuler la production de ROS, peut causer de multiples dommages cellulaires cytotoxiques comme la fragmentation de l'ADN, la dégradation de protéines et de membranes lipidiques, ainsi que le dysfonctionnement des mitochondries et du réticulum endoplasmique et enfin l'activation de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. (Babele et al., 2021 ; Møller et al., 2014)

En plus de causer directement des dommages cellulaires, les ROS peuvent activer des voies de signalisation pour stimuler la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance promouvant l'inflammation.

Finalement, certains facteurs de transcription tels que NF- κ B sont stimulés par ces cytokines, mais également par les ROS eux-mêmes permettant la survie et la croissance des cellules tumorales. (Dong & Ma, 2015 ; Dong & Ma, 2019)

4.3.2 Inflammation

Étant des corps étrangers, l'inhalation des CNT et plus précisément leurs dégâts cellulaires activeront également le recrutement et l'infiltration de plusieurs cellules immunitaires (lymphocytes T et B, neutrophiles, macrophages, etc.) ; Résultant en l'initiation d'une réponse inflammatoire. Le type de cellule immunitaire principal impliqué dans ces mécanismes de développement de l'inflammation sont les macrophages. Ils constituent notre première ligne de défense et font partie de l'immunité innée. Leur fonction principale est la capture et l'élimination des corps étrangers entrant dans notre organisme. (Dong & Ma, 2019)

Les tissus pulmonaires sont bordés de macrophages alvéolaires, qui sont des exemples de macrophages tissulaires résidents. Ces macrophages résidents se différencient à partir de monocytes précurseurs embryonnaires et ont la capacité de s'auto-renouveler de manière indépendante, sans la contribution de monocytes (adultes) circulants. (Aegerter et al., 2022) L'inhalation pulmonaire/pharyngale de fibres telles que les CNT est suivie d'une rapide infiltration et activation de ces macrophages alvéolaires résidents dont le phénotype se différencie alors en phénotype M1 pro-inflammatoire. (Kuempel et al., 2017)

Ces macrophages alvéolaires résidents reconnaissent notamment les CNT grâce à des récepteurs membranaires de détection appelés les *Pattern Recognition Receptors (PRR)*, dont les plus courants sont les *Toll-like receptors (TLR)* et les *scavenger-like receptors (SR)*. Ces PRR identifient les *Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)* ou *Damaged-Associated Molecular Patterns (DAMP)* présents sur les fibres. (Svadlakova et al., 2022)

Une fois les CNT reconnus par les PPAR, les macrophages alvéolaires M1 pro-inflammatoires réaliseront une phagocytose afin de les éliminer. Cependant, à cause de certaines de leur propriétés physico-chimiques, il est parfois impossible pour les macrophages de les endocyter entièrement. La phagocytose est dite frustrée. Cette phagocytose frustrée amplifiera l'inflammation en induisant la libération de médiateurs inflammatoires et, in fine, l'activation d'un inflammasome NLRP3. (Duke & Bonner, 2018)

Un inflammasome est un complexe protéique intracellulaire comprenant de la Caspase-1 qui d'une part entrainera la libération d'espèces réactives réactionnelles et d'autre part déclenchera la maturation de précurseurs d'IL-1 β et d'IL-18, des cytokines pro-inflammatoires, vers leur forme active. Finalement, la phagocytose frustrée mènera généralement à la mort cellulaire des macrophages ou pyroptose. (Svadlakova et al., 2022)

Outre la phagocytose, l'activation des macrophages alvéolaires pro-inflammatoires par les PRR induit également la sécrétion et l'activation d'une série de facteurs de transcription, de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires telles que NF κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6 et CCL2 qui initieront l'inflammation et la feront persister, ainsi que des facteurs de croissance (G-CSF) et des protéines de signalisation (VEGF). Ces cytokines permettront de recruter d'autres cytokines et cellules immunitaires comme les neutrophiles, les monocytes infiltrés et les cellules dendritiques pour stimuler les réponses pro-inflammatoires. (Aegerter et al., 2022)

Les monocytes infiltrés formeront un autre type de macrophages pulmonaires, les macrophages non-résidents provenant de la moelle osseuse via la circulation sanguine. Ces macrophages non-résidents vont remplacer les macrophages alvéolaires et/ou les compléter. (Aegerter et al., 2022)

Ces réponses inflammatoires stimulent la survie et la croissance des cellules tumorales et contribuent ainsi au développement de la tumeur. Selon plusieurs études, l'inflammation renforce notamment la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et l'invasion des cellules tumorales. (Dong & Ma, 2019)

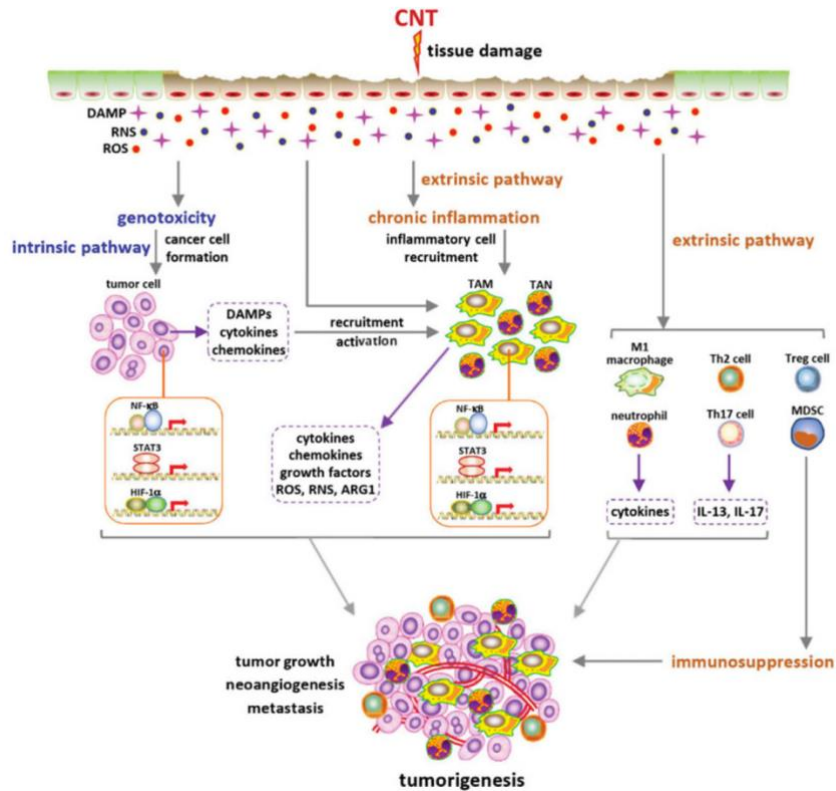


FIGURE 2 - INTERACTION ENTRE LES VOIES INFLAMMATOIRES ET TUMORIGÈNES LORS DU DÉVELOPPEMENT DE TUMEURS INDUITES PAR LES CNT. LES CNT ET LES LÉSIONS ASSOCIÉES DANS LES POUMONS CRÉENT DES DOMMAGES GÉNOTOXIQUES À L'ADN DE MANIÈRE INDIRECTE PAR LE BIAIS DE MOLÉCULES, TELS QUE LES ROS. CES ROS ENTRAÎNENT DES MUTATIONS TUMORIGÈNES DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES RÉSULTANT EN LA FORMATION DE CELLULES TUMORALES. LES LÉSIONS TISSULAIRES (VOIES EXTRINSÈQUES) LES CELLULES TUMORALES (VOIES INTRINSÈQUES) LIBÈRENT TOUTE UNE SÉRIE DE DAMP ET DE CHIMIOKINES QUI RECRUTENT ET ACTIVENT LES TAM. LES MACROPHAGES ET NEUTROPHILES ASSOCIÉS AU CANCER SÉCRÈTENT CERTAINES MOLÉCULES, TELLES QUE IL-6, IL-1, TNF, NO, ROS ET ARG1, QUI ACTIVENT PAR EXEMPLE NF-κB ET STAT3 DANS LES CELLULES TUMORALES ET STIMULENT LA SURVIE ET LA CROISSANCE DES CELLULES TUMORALES. LES MACROPHAGES M1 ET LES NEUTROPHILES STIMULÉS PAR LES CNT CONTRIBUENT ÉGALEMENT À LA TUMORIGÈNE VIA DES CYTOKINES INFLAMMATOIRES. L'ACCUMULATION DE TREG ET DE MDSC INHIBITRICES RENFORCE L'IMMUNOSUPPRESSION, QUI INHIBE LA SURVEILLANCE IMMUNITAIRE DES CELLULES TUMORALES, AUGMENTANT AINSI LA SURVIE DES CELLULES TUMORALES. ENSEMBLE, CES ÉVÉNEMENTS FAVORISENT LA PROLIFÉRATION DES CELLULES TUMORALES, LA CROISSANCE DE LA TUMEUR ET LA FORMATION DE MÉTASTASES. (DONG & MA, 2019)

4.3.3 Immunosuppression

En plus de l'inflammation, les CNT vont également déclencher des réponses anti-inflammatoires/immunosuppressives contribuant au développement du cancer. Ces réponses sont caractérisées par trois types cellulaires principaux : les Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC), les lymphocytes T régulateurs (LT_{reg}) et les macrophages. (Dong & Ma, 2019)

Concernant les macrophages, quand les CNT persistent dans les poumons, l'inflammation devient chronique et est caractérisée par le développement de granulomes.

Un changement de polarisation est alors observé du phénotype M1 pro-inflammatoire vers le phénotype M2 anti-inflammatoire pour les macrophages alvéolaires infiltrés et recrutés par les cellules tumorales. Ces macrophages sont aussi appelés les Tumor Associated Macrophages anti-inflammatoires/immunosuppresseurs (TAM). (Dong & Ma, 2018 ; Kuempel et al., 2017)

Les TAM sont activés par les interleukines IL-4 et IL-13 et ils emploient diverses mécanismes afin de réguler l'inflammation. Ils inhibent aussi l'action des lymphocytes T contre les cellules tumorales et activent les lymphocytes T régulateurs. (Ma et al., 2022) Ainsi, les macrophages anti-inflammatoires/immunosuppresseurs permettent le développement d'un environnement immunosuppresseur propice à la prolifération tumorale.

Les TAM libèrent différentes cytokines comme par exemple l'Arginase 1 ou l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) qui privent les lymphocytes T d'arginine et de tryptophane nécessaires à leur métabolisme ; Ainsi que du TGF- β 1 et de l'IL-10 inhibant respectivement leur activation et leur prolifération ; Ou encore la PGE2, stimulant les lymphocytes T régulateurs. Les TAM possèdent aussi plusieurs marqueurs *inhibitory checkpoints* comme par exemple PDL-1, inactivant leurs fonctions. Finalement, ces macrophages jouent un rôle important dans la mise en place d'un environnement immunosuppresseur tardif. Ils stimulent l'invasion, la prolifération, la migration et l'angiogenèse tumorale. (Orsi et al., 2021) Ils promeuvent par exemple une transition épithélio-mésenchymateuse via la sécrétion de TGF- β et TNF- α . (Madeddu et al., 2022)

4.4 Similarités avec le mésothéliome

Le mésothéliome induit par des fibres comme modèle expérimental est semblable à celui de l'adénocarcinome pulmonaire. Par exemple, le dépôt de fibres dans les poumons ou dans la plèvre induisent du stress oxydatif, de l'inflammation et de l'immunosuppression, mécanismes importants dans le développement du mésothéliome ou de l'adénocarcinome pulmonaire. (Donaldson et al., 2013)

Récemment, un nouveau type de macrophages a été découvert par notre laboratoire durant le stade précoce du développement du mésothéliome: les *Small Peritoneal Macrophages* (SPM) *immunosuppresseurs*. Les SPM immunosuppresseurs sont dérivés des monocytes. Ils sont recrutés suite à la disparition des *Large Peritoneal/Pleural Macrophages* (LPM) résidents de la plèvre lors d'une inflammation due à une exposition aux CNT mésothéliomagéniques (*Macrophage Disappearance Reaction* ou MDR). Comme leur nom l'indique, ces macrophages possèdent une activité immunosuppressive et contribuent ainsi au développement du mésothéliome. En effet, ces macrophages SPM immunosuppresseurs favorisent le développement d'un microenvironnement immunosuppresseur précoce qui bloque l'action antitumorale des lymphocytes T. (Orsi, 2021)

Afin de mieux comprendre cette activité immunosuppressive des macrophages SPM immunosuppresseurs, un RNA-seq avait été réalisée sur ces SPM immunosuppresseurs et une expression forte de Syndécan-1 avait été observée. (Orsi, 2021)

4.5 Syndécan-1 comme médiateur immunosuppresseur

Le Syndécan-1 (SDC-1 ou CD138) est une protéine faisant partie de la famille des protéoglycans. Elle est principalement exprimée à la surface des cellules épithéliales et des plasmocytes. La protéine possède un domaine d'action intracellulaire, transmembranaire et extracellulaire. SDC-1 exerce donc de nombreuses fonctions et peut s'associer avec de multiples ligands (facteurs solubles, facteurs cellulaires et composants de la matrice cellulaire). (Guo et al., 2022 ; Palaiologou et al., 2014)

Des glycosaminoglycans (GAG), tels que des chaînes d'héparanes sulfates (HS) sont liés à son domaine extracellulaire lui permettant d'interagir comme corécepteur avec différents facteurs de croissance (GF) et de migration. (Palaiologou et al., 2014) Les GAG donnent aussi la possibilité à la protéine de séquestrer des molécules. Le domaine intracellulaire de SDC-1 est constitué de 3 parties différentes : proximale, variable et distale et joue un rôle au niveau du cytosquelette et de la signalisation intracellulaire (en interagissant avec des kinases). (Guo et al., 2022)

SDC-1 peut également subir un clivage protéolytique par des métalloprotéinases membranaires (MT1-MMP, MT3-MMP) ou matricielles (MMP-7, MMP-2, MMP-9) menant à la libération d'une forme soluble de la protéine. Cette forme soluble est associée ou non à des GAG suite à l'action de l'héparanase. Elle agit de façon autocrine ou paracrine, par exemple en transportant et présentant des facteurs de croissance à d'autres cellules ou en se liant en même temps à deux intégrines (ou une intégrine et un récepteur de GF) conduisant à leur activation. (Palaiologou et al., 2014 ; Teixeira & Götte, 2020)

Finalement, la protéine peut être internalisée dans le noyau cellulaire où elle interagira avec certaines protéines nucléaires. Ses actions nucléaires principales sont l'inhibition de l'activité de la topoisomérase I (Topo 1) et des histones acétyltransférases (HAT) contrôlant par conséquent l'expression de certains gènes et ainsi la prolifération et la différenciation cellulaire. (Teixeira & Götte, 2020)

4.5.1 Syndécan-1 et les macrophages

Le protéoglycan SDC-1 est exprimé par plusieurs types cellulaires dont des macrophages anti-inflammatoires/immunosuppresseurs. (Angsana et al., 2015 ; Han et al., 2017)

La protéine possède des fonctions anti-inflammatoires en se liant et en séquestrant des cytokines pro-inflammatoires grâce aux chaînes HS liées à son domaine extracellulaire. (Angsana et al., 2015 ; Teixeira & Götte, 2020 ; Xiao et al., 2012) Par ailleurs, SDC-1 joue un rôle dans le recrutement de leucocytes. Il atténue fortement la migration et l'adhésion de leucocytes (comme les monocytes, macrophages ou neutrophiles) aux cellules endothéliales activées en interagissant avec des cytokines telles que CCL2 et CCL3 et en inhibant l'interaction entre des intégrines et ICAM-1 ou VCAM-1. (Teng et al., 2012) En effet, les macrophages anti-inflammatoires de souris déficientes en Syndécan-1 sont caractérisés par une migration diminuée et une adhésion renforcée. (Angsana et al., 2015)

Par conséquent, en étant impliqué dans l'inflammation SDC-1 pourrait intervenir dans certaines pathologies comme le cancer.

4.5.2 Syndécan-1 et le cancer

Dans les cancers, l'expression de SDC-1 est généralement altérée, c'est-à-dire que la protéine est sur ou sous-exprimée, et cette altération est corrélée à un pronostic défavorable. (Kind et al., 2019 ; Teng et al., 2012) La protéine jouerait un rôle important dans la progression des tumeurs. Elle stimulerait l'invasion, la prolifération et l'angiogenèse et inhiberait l'apoptose des cellules tumorales au sein du microenvironnement de la tumeur par la régulation de médiateurs comme des oncogènes ou des facteurs de croissance. (Couchman, 2021 ; Teng et al., 2012)

Des études récentes ont découvert que le Syndécan-1 régule par exemple la biogenèse des exosomes. Ces exosomes jouent un rôle important dans la mise en place du microenvironnement tumoral pulmonaire et dans la tumorigenèse. Parimon et al., 2018 ont démontré que la déficience en SDC-1 dans les cellules cancéreuses de l'adénocarcinome modifie les microARN dans les exosomes sécrétés et leur confère un profil plus tumorigène.

Les microARN contrôlent entre autres l'angiogenèse, la métastase et la réponse immunitaire de la tumeur. (Parimon et al., 2018)

4.5.3 Syndécan-1 et l'adénocarcinome pulmonaire

Dans leurs recherches, Kind, (2019) et ses collègues ont observé que le Syndécan-1 est présent dans les tissus pulmonaires sains, ainsi que malades. De manière surprenante, dans les tissus atteints par l'adénocarcinome pulmonaire, l'expression de Syndécan-1 diminue. (Kind et al., 2019) Cette baisse de l'expression de Syndécan-1 par les cellules tumorales pulmonaires est associée aux stades les plus avancés de l'adénocarcinome et à un faible pronostic vital. (Parimon et al., 2018 ; Teng et al., 2012)

Contrairement aux tissus, dans le sérum, de grandes quantités de Syndécan-1 soluble sont associées à un faible pronostic vital. (Teng et al., 2012)

5. Objectifs et stratégies

5.1 Objectifs

Précédemment, le laboratoire LTAP a pu montrer que Syndécan-1 était libéré par les macrophages SPM immunosuppresseurs lors du développement du mésothéliome chez le rat. Parallèlement, nous nous demandons si des macrophages pulmonaires ayant des fonctions immunosuppressives expriment également Syndécan-1 et contribuent ainsi au développement de l'adénocarcinome pulmonaire.

Pour cela, un modèle de cancer pulmonaire chez la souris induit par des fibres de CNT a été établi par notre laboratoire l'année passée. Dans ce mémoire, les tissus pulmonaires, les liquides broncho-alvéolaires (BAL) et le plasma des souris de ce modèle ont été utilisés afin de quantifier et de localiser histologiquement Syndécan-1.

Ce projet de recherche a pour objectif de répondre à 3 questions principales :

- Les conditions d'instillation des CNT ont-elles un impact sur la quantité de Syndécan-1 soluble dans les poumons et dans la circulation ?
- La quantité de Syndécan-1 soluble est-elle corrélée au stade de l'adénocarcinome pulmonaire ?
- Quelle est la localisation histologique de Syndécan-1 dans les poumons et les macrophages pulmonaires expriment-ils le Syndécan-1 ?

5.2 Stratégies expérimentales

Nous avons réalisé deux expériences pour étudier la présence de Syndécan-1 dans l'adénocarcinome pulmonaire induit par des fibres de CNT. Lors de la première expérience, la protéine Syndécan-1 a été quantifiée dans le plasma et le liquide broncho-alvéolaire récoltés dans les poumons des souris du modèle de cancer pulmonaire. Cette expérience nous a permis de comparer la quantité du protéoglycan soluble présente suite aux différentes instillations de CNT et d'évaluer le lien entre le stade de l'adénocarcinome et la concentration de Syndécan-1. Ensuite, dans la deuxième expérience nous avons localisé histologiquement Syndécan-1 et les macrophages dans les poumons afin de découvrir si des macrophages expriment le Syndécan-1.

6. Matériels et méthodes

6.1 *Modèle de cancer pulmonaire chez la souris*

Le modèle de cancer pulmonaire induit par des fibres de CNT a été développé l'année passée par Antoine Quoidbach dans notre laboratoire (LTAP) chez deux souches de souris différentes : des souris mâles A/J (Charles River, Massachusetts, USA) et des souris mâles C57BL/6Rj abrégées B6 (Janvier Labs, France). Ces souris ont été traitées au 3-méthylcholanthrène (3MC), un cocarcinogène, par voie intra-péritonéale et ont été exposées aux particules par aspiration oro-pharyngée. Les particules utilisées sont des CNT-7 (MWCNT-XNRI, Mitsui & co, Japon), des CNT-T (tangled, Nagoya university, Japon) et du CB. Dans certains cas, aucun type de particules n'ont été instillées aux souris qui ont alors reçu une solution contenant uniquement du NaCl. De la même manière, certaines souris n'ont préalablement pas reçu de 3MC qui a alors été remplacé par de l'huile. (Quoidbach, 2022)

Suite à leur sacrifice, les poumons des souris ont été prélevés et mis en paraffine afin de fixer les structures cellulaires. L'étape suivante est la coupe de ces blocs de paraffine qui permet d'obtenir des coupes très fines de tissu pulmonaire. Ces coupes ont ensuite subi une coloration H&E (hématoxyline et éosine) pour mieux identifier les éventuelles zones tumorales au microscope. Cette analyse qualitative des poumons est suivie d'une analyse quantitative déterminant à l'aide du programme d'intelligence artificielle Halo la surface occupée par les zones tumorales. Les cinq types de surfaces reconnaissables comprennent le tissu sain, la dysplasie de grade 1 (pré-cancer), la dysplasie de grade 2 (adénocarcinome in situ), l'adénocarcinome papillaire et le « background ». Chacune de ces surfaces identifiées est exprimée en pourcentage de tissu total (surface identifiée [mm²] / surface totale [mm²]). (Quoidbach, 2022)

Dans le cadre du développement de ce modèle de cancer pulmonaire, trois expériences successives ont été réalisées. Lors de la première expérience, l'effet du 3MC seul a été comparé à celui de la combinaison de 3MC et de CNT-7 sur l'apparition de l'adénocarcinome pulmonaire. Des souris A/J ont de ce fait été prétraitées au 3MC avant d'être instillées aux CNT-7 ou au NaCl. La deuxième expérience a permis de comparer l'activité cancérigène des CNT-7 par rapport à celle des CNT-T chez des souris A/J.

Elle compte cinq combinaisons d’instillation possibles qui sont un groupe contrôle (sans 3MC, ni particules), un groupe traité au 3MC seulement, un groupe instillé aux 3MC et CNT-7 et un groupe instillé aux 3MC et CNT-T. Au terme de cette expérience, le liquide broncho-alvéolaire et le plasma des souris ont été récoltés en plus de leurs poumons. Finalement, la troisième expérience est similaire à la deuxième hormis qu’elle implique des souris de souche B6 et que certaines souris ont également été exposées au CB, une autre particule. Ainsi, le but de cette expérience est d’opposer l’activité cancérigène des CNT à celle du CB. Comme la deuxième expérience, le liquide broncho-alvéolaire et le plasma ont aussi été récoltés. (Quoidbach, 2022)

6.2 Expérience 1 : quantification de Syndécan-1 soluble

6.2.1 Échantillons

La première expérience est réalisée à l’aide des échantillons de plasma et de liquide broncho-alvéolaire récoltés chez chacune des souris de la deuxième et troisième expérience du modèle de cancer pulmonaire. La deuxième et troisième expérience comptent respectivement 22 souris de souche A/J et 24 souris de souche B6. Les conditions d’instillation de toutes ces souris sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

TABLEAU 1: CONDITIONS D’INSTILLATION DES SOURIS DE L’EXPÉRIENCE 2 ET 3 DU MODÈLE DE CANCER PULMONAIRE DÉVELOPPÉ PAR LE LABORATOIRE LTAP

Groupe	Souche de souris	Numéros d’échantillons	3MC	Particules
1	A/J	1 – 4	Non	NaCl
2	A/J	5 – 9	Oui	NaCl
3	A/J	10 – 13	Oui	CNT-7
4	A/J	14 – 17	Oui	CNT-T
5	A/J	18 – 22	Non	CNT-7
6	B6	23 – 26	Non	NaCl

7	B6	27 – 29	Oui	NaCl
8	B6	30 – 33	Non	CNT-7
9	B6	34 – 37	Oui	CNT-7
10	B6	38 – 41	Oui	CNT-T
11	B6	42 – 46	Oui	CB

La quantification de Syndécan-1 dans ces échantillons est obtenue grâce à un test ELISA en sandwich.

6.2.2 Principe de l'ELISA

Le test ELISA (Enzyme Linked Immuno-Assay) est une technique immunologique de détection et de quantification d'antigènes présents sur les protéines d'intérêt. Plus précisément, l'ELISA en sandwich implique d'une part des anticorps de capture fixés au fond des puits de micro-titration de sorte à capturer les antigènes d'intérêt et d'autre part des anticorps de détection qui les reconnaîtront. Les anticorps de détection sont couplés à une enzyme capable de transformer un substrat chromogène en un produit coloré. L'absorbance de ce produit coloré est mesurée grâce à un spectrophotomètre et est proportionnelle à la concentration de la protéine d'intérêt.

6.2.3 Protocole

Le kit ELISA Syndécan-1 souris (96 tests/kit, Emelca, Cat. #MBS944732) utilisé contient une microplaque de 96 puits dans lesquels les anticorps de capture sont déjà *pré-coated*. Tout d'abord, 100 microlitres de notre standard ou de nos échantillons de BAL (non dilué) ou plasma (dilué 2 fois) sont pipetés au fond de chaque puit où le Syndécan-1 présent se liera aux anticorps de capture. Puis, il s'en suit une incubation de la plaque pendant 2 heures à 37°C. Au terme de ces 2 heures, la solution de chaque micro-puit est retirée et 100 microlitres d'anticorps de détection conjugués à la Biotine (diluée 100 fois) y sont ajoutés. La plaque est alors à nouveau incubée à 37°C pendant 1 heure.

Après 3 lavages, 100 microlitres d'Avidine conjuguée à de l'Horseradish Peroxidase (HRP), (dilué 100 fois), sont également introduits dans tous les puits. Suite à une incubation d'une heure de la plaque à 37°C, 5 lavages sont réalisés et 90 microlitres de substrat chromogène 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) sont ajoutés. La plaque est incubée à 37°C pendant 15 à 30 minutes de sorte à laisser la réaction enzymatique se produire. Finalement, dans chaque micro-puit, 50 microlitres d'une solution Stop permettent d'inhiber l'action de la HRP. La densité optique de chaque puit de la microplaque est déterminée à 450 nanomètres. De plus, afin de corriger la longueur d'onde, une lecture à 540 nanomètres est effectuée. Les résultats sont calculées à l'aide de la courbe standard réalisée.

6.2.4 Tests statistiques

Divers tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 9.4. Des tests Analysis of Variance (ANOVA) suivis de tests à comparaison multiples de Dunnett, nous ont permis de comparer les moyennes des différents groupes d'instillation des deux souches de souris à la moyenne de leur groupe contrôle. Dans le cas de l'analyse d'une différence significative entre les moyennes de deux groupes d'instillation des fibres, nous avons utilisé un test de Student (non pairé, normalement distribué) .

Dans un second temps, la présence d'une éventuelle corrélation significative entre la concentration en Syndécan-1 dans les BAL et les plasmas et les différents grades de l'adénocarcinome pulmonaire murin est analysée grâce à un test sur la pertinence du coefficient de corrélation de Pearson et sur la pertinence de la pente, β_1 , d'un modèle de régression linéaire simple ($Y = \beta_0 + \beta_1 * X$) .

Une p-valeur est considérée comme significative en dessous de 0,05 et tous les tests sont *two-tailed*.

6.3 Expérience 2 : (co)localisation de Syndécan-1 et des macrophages dans les poumons

6.3.1 Échantillons

Cette deuxième expérience est réalisée à partir de blocs de paraffine contenant les poumons de souris provenant des 3 expériences réalisées lors du développement du modèle de cancer pulmonaire induit par les CNT ; Ainsi que des blocs de paraffine contenant le cerveau, l'iléon ou l'intestin grêle de souris contrôles (non atteintes de maladies) provenant d'autres expériences de notre laboratoire et de la plateforme d'imagerie 2IP (IREC, UCLouvain). L'organe d'intérêt est le poumon. Toutefois, les marquages sur les tissus des autres organes nous permettent d'avoir d'autres contrôles positifs et négatifs et ainsi d'augmenter le nombre de références dans la littérature. Tous les échantillons utilisés sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

TABLEAU 2: ÉCHANTILLONS DE POUMONS, CERVEAU, ILÉON ET INTESTIN GRÊLE DE SOURIS UTILISÉS POUR LA MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE EN IMMUNOHISTOCHEMIE

Organe	Souche de souris	Nom de l'échantillon	Condition d'instillation	Nombre de lames utilisées provenant de l'échantillon
Poumon	A/J	EXP1 – 10	3MC + CNT-7	5
Poumon	A/J	EXP1 – 16	3MC + CNT-7	6
Poumon	A/J	EXP1 – 12	3MC + CNT-7	4
Poumon	B6	EXP3 – 24	/ (huile + NaCl)	5
Poumon	A/J	EXP2 – 3	/ (huile + NaCl)	9
Poumon	A/J	EXP1 - 11	3MC + CNT-7	3
Iléon	Saloua (B6)	IA1	/	4
Iléon	Saloua (B6)	IA3	/	3
Iléon	¹	IL	/	3

¹ La souche des souris provenant de la plateforme d'imagerie 2IP (IREC, UCLouvain) est inconnue.

Intestin grêle	1	Small Intestine M	/	6
Cerveau	B6	B7	/	2
Cerveau	B6	B9	/	2
Cerveau	1	BRAIN M	/	7

D'abord, les localisations de Syndécan-1 et des macrophages dans ces échantillons de tissus sont obtenues à l'aide de l'immunohistochimie (IHC) en DAB, ensuite leur colocalisation est obtenue par immunofluorescence. Toutefois, une étape supplémentaire de coupe de blocs de paraffine est nécessaire au préalable.

6.3.2 Coupe des blocs de paraffine

La coupe des blocs est réalisée à l'aide d'un microtome (*semi-automated microtome HM340E Coolcut*). Celui-ci permet d'obtenir de très fines coupes (5 micromètres) de tissus correspondant à l'épaisseur d'une cellule.

Avant la découpe et afin de la faciliter, les blocs sont rapidement refroidis sur une plaque froide à -5°C. Ainsi, cela permet à la paraffine d'être bien solide.

Petit à petit, grâce à une lame de couteau rotative contre laquelle les échantillons s'écrasent, de fines coupes de tissus sont accumulées. Ces coupes sont par la suite déposées dans un bain-marie maintenu à 40°C. L'eau chaude permet d'étendre les coupes et de les déplier. Une fois qu'elles sont lisses, elles sont étalées sur une lame en verre à l'aide de la pression hydrostatique de l'eau sur le verre. Les lames utilisées sont des lames SuperFrost Plus (Thermo Scientific) qui sont chargées positivement. Ainsi, l'attraction électrostatique entre la lame et le tissu facilitera également la fixation de ce dernier sur cette première. Il n'est donc pas nécessaire d'avoir recours à un revêtement pour maintenir le tissu. Finalement, les lames sont mises à sécher et sont fin prêtes pour les immunomarquages.

6.3.3 Principe de l'immunohistochimie (indirecte) en DAB

L'immunohistochimie (indirecte) est une technique immunologique ayant pour but la localisation d'antigènes dans les cellules d'une coupe de tissu. Les antigènes sont détectés au moyen d'anticorps primaires spécifiques eux-mêmes reconnus par des anticorps secondaires conjugués à enzyme. L'anticorps secondaire est dirigé contre les immunoglobulines de l'animal dans lequel l'anticorps primaire a été produit.

Dans le cas de l'IHC en DAB, la révélation du complexe antigène-anticorps se réalise par la réaction de transformation d'un substrat, appelé chromogène, en un produit coloré. Cette réaction est catalysée par l'enzyme lié à l'anticorps secondaire. Le 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) est notamment un des chromogènes les plus utilisés en IHC et forme une couleur brune lorsqu'il est oxydé par le peroxyde d'hydrogène avec l'aide de l'enzyme Horseradish Peroxidase (HRP). Par ailleurs, une contre-coloration des noyaux à l'hématoxyline est souvent réalisée pour une meilleure visualisation des cellules.

6.3.4 Protocole de l'immunohistochimie (indirecte) en DAB

Protocole 1

Tout d'abord, les lames des tissus sont déparaffinées. La déparaffinisation consiste en 3 bains successifs de 5 minutes dans le toluène et puis dans l'isopropanol. Ensuite l'activité de l'endoperoxydase est inactivée en incubant pendant 20 minutes les lames dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'isopropanol (C_3H_8O), (20mL H_2O_2 + 180mL C_3H_8O), afin qu'elle n'interfère pas avec la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire. Après un lavage à l'eau distillée, les lames sont plongées dans un tampon citrate à pH 5,7 (225mL d'eau distillée + 25mL de tampon citrate + 675 μ L de Triton (20x)). La méthode Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) est utilisée pour l'élimination des antigènes liés (900W : 4min10s – 90W : 15min – 900W : 1min30s – repos à température ambiante : 15min). Puis, il s'en suit à nouveau un lavage à l'eau distillée et également au TBS/Tween 0,1%. Préalablement à l'application de l'anticorps primaire, les interactions non spécifiques sont bloquées avec de la BSA 5% dans du TBS/Tween 0,1% pendant 30 minutes à température ambiante.

Les tissus sur les lames sont ensuite recouvert d'anticorps primaire dilué dans du TBS/BSA 1%/Tween 0,1% et ils sont incubés pendant une nuit à 4°C.

Le lendemain, les lames subissent d'abord 3 lavages au TBS/Tween 0,1% de 5 minutes chacun. L'anticorps secondaire, adapté à l'espèce animale hôte de l'anticorps primaire et conjugué à l'enzyme Horseradish Peroxidase (HRP), est appliqué et cela est suivi par une incubation dont le temps et la température sont déterminés par l'anticorps secondaire utilisé. Dans le cas où le laboratoire ne possède pas d'anticorps secondaire adapté à l'espèce animale hôte de l'anticorps primaire, une étape supplémentaire est ajoutée afin de former un « pont » entre l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire conjugué à l'HRP que nous référons alors comme « le deuxième anticorps secondaire ». Cette étape se situe juste après les 3 lavages successifs au TBS/Tween et consiste en l'application d'un premier anticorps secondaire reconnaissant les immunoglobulines de l'anticorps primaire et produit dans l'espèce animale contre laquelle le deuxième anticorps secondaire est ciblé. L'application de ce premier anticorps secondaire est suivi de 3 lavages successifs de 5 minutes au TBS/Tween et de l'ajout du deuxième anticorps secondaire (couplé à l'HRP).

Puis, suite à 3 lavages au TBS/Tween de 5 minutes chacun, le substrat DAB (DAKO K3468 – 1mL de *DAB+ substrate buffer* et 1 goutte de *DAB+ chromogen*) est ajouté afin d'initier la réaction enzymatique. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les lames sont lavées à l'eau du robinet et puis à l'eau distillée pendant chaque fois 5 minutes. Ensuite, une contre-coloration des noyaux à l'hématoxyline (DAKO) est réalisée et est suivie d'une répétition des lavages successifs à l'eau du robinet et l'eau distillée. Finalement, les lames sont mises à sécher et subissent un « mounting » automatique d'une fine lamelle (*Sakura Tissue-Tek Film*) par une colleuse de lame (*Sakura Coverslipper*) qui est précédé par deux bains successifs de 1-2min dans du xylène.

Afin d'obtenir les images numériquement et de les analyser, les lames sont scannées avec un slide scanner (*3DHitech Pannoramic ScanII*).

protocole 2

Un autre protocole d'expérience a également été essayé pour certaines lames. Ce deuxième protocole est une version légèrement modifiée du premier protocole. En effet, seul le temps et la température d'incubation de l'anticorps primaire change.

Lors de ce deuxième protocole, l'anticorps primaire est incubé pendant 1 heure à température ambiante (au lieu d'une nuit à 4°C).

6.3.5 Essais détaillés de l'expérience par immunohistochimie (indirecte) en DAB

L'anticorps primaire utilisé pour la localisation des macrophages est un anticorps anti-F4/80 (*F40/80 Rabbit mAb, CellSignaling, Cat. #70076, Isotype : rabbit*). La glycoprotéine F4/80 est hautement exprimée à la surface de nombreux macrophages tissulaires murins et est ainsi devenu un marqueur très utilisé.

Concernant Syndécan-1 plusieurs anticorps primaires ont été essayés successivement : le *CD138 Polyclonal Antibody, ThermoScientific, Cat. #PA5-16918, Isotype : rabbit* et ensuite le *Purified Rat Anti-Mouse CD138, BD Biosciences, Cat. #553712, Isotype : rat*.

Finalement différents anticorps secondaires (ou une combinaison de ceux-ci) ont été utilisés : un anti-IgG de lapin (*EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit, DAKO Agilent, Cat. #K4003*) dont le temps d'incubation est de 40 minutes à température ambiante. Celui-ci a été combiné pour certaines lames à un anti-IgG de rat (dilué 100x dans du TBS/BSA 1%/Tween 0,1%) dont les cellules hôtes sont des cellules de lapin (*Rabbit Anti-Rat IgG Antibody (H+L), Unconjugated, Vector Laboratories, Cat. # AI-4000*) et dont le temps d'incubation est de 1 heure à température ambiante. Ainsi, cet anticorps lapin anti-rat permet de faire le lien entre un anticorps primaire avec des cellules hôtes de rat et un anticorps secondaire avec des cellules hôtes de lapin. Ensuite, un anti-IgG de rat (dilué 500x) conjugué à de l'HRP (*Peroxidase-AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (H+L) (min. X Bov, Ck, Gt, GP, Sy Hms, Hrs, Hu, Ms, Rb, Shp Sr Prot), Jackson ImmunoResearch, Cat. #712-035-153*) a également été employé. Son temps d'incubation est d'une heure à température ambiante.

Tous les immunomarquages réalisés sont présentés de manière chronologique dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

TABLEAU 3: ÉNUMÉRATION CHRONOLOGIQUE DE TOUS LES IMMUNOMARQUAGES EN DAB RÉALISÉS. LE NOM DE LA LAME, L'ORGANE DU TISSU MARQUÉ, L'OBJECTIF DU MARQUAGE, LE PROTOCOLE UTILISÉ, AINSI QUE L'ANTICORPS PRIMAIRE (ET SA CONCENTRATION) ET LE(S) ANTICORPS SECONDAIRE(S) SONT ÉGALEMENT DÉTAILLÉS.

Organe	Nom de la lame	Objectif de localisation	Protocole utilisé	Marque de l'anticorps primaire	Concentration de l'anticorps primaire et/ou dilution correspondante	Anticorps secondaires(s)
Poumon	EXP1 10.1	macrophages	1	CellSignaling	1/200 ²	Anti-Rabbit
Poumon	EXP1 10.2	Syndécan-1	1	ThermoScientific	0,46 µg/mL (dilution 1/100)	Anti-Rabbit
Poumon	EXP1 16.1	macrophages	1	CellSignaling	1/200 ³	Anti-Rabbit
Poumon	EXP1 16.2	Syndécan-1	1	ThermoScientific	0,46 µg/mL (dilution 1/100)	Anti-Rabbit
Cerveau	B7.1	Syndécan-1	1	ThermoScientific	0,46 µg/mL (dilution 1/100)	Anti-Rabbit
Cerveau	B7.2	Syndécan-1	1	ThermoScientific	0,46 µg/mL (dilution 1/100)	Anti-Rabbit
iléon	IA1.4	Syndécan-1	1	BD Biosciences	2,50 µg/mL (dilution 1/200)	Anti-Rabbit
Poumon	EXP1 16.3	Syndécan-1	1	BD Biosciences	2,50 µg/mL (dilution 1/200)	Anti-Rabbit

² La concentration initiale de l'anticorps primaire *F40/80 Rabbit mAb, CellSignaling, Cat. #70076* n'est pas donnée par le fournisseur (CellSignaling).

³ La concentration initiale de l'anticorps primaire *F40/80 Rabbit mAb, CellSignaling, Cat. #70076* n'est pas donnée par le fournisseur (CellSignaling).

Iléon	IA1.5	Syndécan-1	1	BD Biosciences	1 µg/mL (dilution 1/500)	Anti-Rabbit
Poumon	EXP1 16.4	Syndécan-1	1	BD Biosciences	1 µg/mL (dilution 1/500)	Anti-Rabbit
Cerveau	B9.1	Syndécan-1	1	BD Biosciences	1 µg/mL (dilution 1/500)	Anti-Rabbit
Poumon	EXP1 10.3	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,625 µg/mL (dilution 1/800)	Anti-Rabbit
Cerveau	B9.2	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,625 µg/mL (dilution 1/800)	Anti-Rabbit
Poumon	EXP1 12.1	Syndécan-1	1	BD Biosciences	10 µg/mL (dilution 1/50)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Iléon	IA3.4	Syndécan-1	1	BD Biosciences	10 µg/mL (dilution 1/50)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Poumon	EXP1 12.2	Syndécan-1	1	BD Biosciences	10 µg/mL (dilution 1/100)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Iléon	IA1.1	Syndécan-1	1	BD Biosciences	10 µg/mL (dilution 1/100)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Poumon	EXP1 12.4	Syndécan-1	1	BD Biosciences	10 µg/mL (dilution 1/500)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Iléon	IA1.3	Syndécan-1	1	BD Biosciences	10 µg/mL (dilution 1/500)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit

Poumon	EXP3 24.1	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,50 µg/mL (dilution 1/1000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Iléon	IA3.3	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,50 µg/mL (dilution 1/1000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Cerveau	BRAINM 9	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,50 µg/mL (dilution 1/1000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Poumon	EXP3 24.3	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,25 µg/mL (dilution 1/2000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Iléon	IA3.2	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,25 µg/mL (dilution 1/2000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Cerveau	BRAINM 8	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,25 µg/mL (dilution 1/2000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Poumon	EXP2 3.1	Syndécan-1	2	BD Biosciences	0,25 µg/mL (dilution 1/2000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Iléon	IL1	Syndécan-1	2	BD Biosciences	0,25 µg/mL (dilution 1/2000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Cerveau	BRAINM 3	Syndécan-1	2	BD Biosciences	0,25 µg/mL (dilution 1/2000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Poumon	EXP2 3.2	Syndécan-1	2	BD Biosciences	0,1 µg/mL (dilution 1/5000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit

Iléon	IL2	Syndécan-1	2	BD Biosciences	0,1 µg/mL (dilution 1/5000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Cerveau	BRAINM 6	Syndécan-1	2	BD Biosciences	0,1 µg/mL (dilution 1/5000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Poumon	EXP3 24.2	Syndécan-1	2	BD Biosciences	0,05 µg/mL (dilution 1/10000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Iléon	IL3	Syndécan-1	2	BD Biosciences	0,05 µg/mL (dilution 1/10000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Cerveau	BRAINM 4	Syndécan-1	2	BD Biosciences	0,05 µg/mL (dilution 1/10000)	Rabbit Anti-Rat + Anti-Rabbit
Poumon	EXP2 3.3	Syndécan-1	1	/	0 µg/mL	Anti-Rat
Intestin grêle	Int. grêle 1	Syndécan-1	1	/	0 µg/mL	Anti-Rat
Cerveau	BRAINM 5	Syndécan-1	1	/	0 µg/mL	Anti-Rat
Poumon	EXP2 3.4	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,1 µg/mL (dilution 1/5000)	Anti-Rat
Intestin grêle	Int. grêle 2	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,1 µg/mL (dilution 1/5000)	Anti-Rat
Cerveau	BRAINM 7	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,1 µg/mL (dilution 1/5000)	Anti-Rat
Poumon	EXP2 3.5	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,05 µg/mL (dilution 1/10000)	Anti-Rat

Intestin grêle	Int. grêle 4	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,05 µg/mL (dilution 1/10000)	Anti-Rat
Cerveau	BRAINM 10	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,05 µg/mL (dilution 1/10000)	Anti-Rat
Poumon	EXP2 3.6	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,01 µg/mL (dilution 1/50000)	Anti-Rat
Intestin grêle	Int. grêle 5	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,01 µg/mL (dilution 1/50000)	Anti-Rat
Cerveau	BRAINM 12	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,01 µg/mL (dilution 1/50000)	Anti-Rat
Poumon	EXP2 3.7	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,50 µg/mL (dilution 1/1000)	Anti-Rat
Poumon	EXP1 11.3	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,50 µg/mL (dilution 1/1000)	Anti-Rat
Intestin grêle	Int. grêle 6	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,50 µg/mL (dilution 1/1000)	Anti-Rat
Poumon	EXP2 3.8	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,25 µg/mL (dilution 1/2000)	Anti-Rat
Poumon	EXP1 12.3	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,25 µg/mL (dilution 1/2000)	Anti-Rat
Intestin grêle	Int. grêle 7	Syndécan-1	1	BD Biosciences	0,25 µg/mL (dilution 1/2000)	Anti-Rat

6.3.6 Principe de l'immunofluorescence (indirecte) en multiplex

L'immunofluorescence (indirecte) est également une technique immunohistochimique qui repose sur la détection d'un antigène d'intérêt par un anticorps primaire spécifique lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une enzyme. Cependant, dans le cas de l'immunofluorescence, le complexe antigène-anticorps formé n'est pas révélé avec un chromogène, mais avec un fluorophore. Un fluorophore est une molécule absorbant de la lumière à une longueur d'onde spécifique et réémettant cette lumière à une longueur d'onde plus élevée.

L'immunofluorescence en multiplex permet de marquer deux antigènes d'intérêt simultanément et d'obtenir ainsi leur colocalisation. Cette technique se base sur le système d'amplification de signal par la Tyramide (TSA). Lors des marquages, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'enzyme lié à l'anticorps secondaire, l'HRP, convertit la Tyramide qui est couplé à un fluorophore en radicaux libres. Ces radicaux libres hautement réactifs forment des liaisons covalentes à proximité de l'antigène. Les antigènes sont alors visualisés par le signal fluorescent des fluorophores.

6.3.7 Protocole de l'immunofluorescence (indirecte) en multiplex

Tout d'abord, les lames des tissus sont déparaffinées. La déparaffinisation consiste en 3 bains successifs de 5 minutes dans le toluène et puis dans l'isopropanol. Ensuite l'activité de l'endoperoxydase est inactivée en incubant pendant 20 minutes les lames dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'isopropanol (C_3H_8O), (20mL H_2O_2 + 180mL C_3H_8O), afin qu'elle n'interfère pas avec la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire. Après un lavage à l'eau distillée, les lames sont plongées dans un tampon citrate à pH 5,7 (225mL d'eau distillée + 25mL de tampon citrate + 675 μ L de Triton (20x)). La méthode Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) est utilisée pour l'élimination des antigènes liés (900W : 4min10s – 90W : 15min – 900W : 1min30s – repos à température ambiante : 15min). Puis, il s'en suit à nouveau un lavage à l'eau distillée et également au TBS/Tween 0,1%. Préalablement à l'application de l'anticorps primaire, les interactions non spécifiques sont bloquées avec de la BSA 5% dans du TBS/Tween 0,1% pendant 30 minutes à température ambiante.

Les tissus sur les lames sont ensuite recouverts d'anticorps primaire dilué dans de la TBS/BSA 1%/Tween 0,1% et ils sont incubés pendant une nuit à 4°C.

Le lendemain, les lames subissent d'abord 3 lavages au TBS/Tween 0,1% de 5 minutes chacun. L'anticorps secondaire, adapté à l'espèce animale hôte de l'anticorps primaire et conjugué à l'enzyme Horseradish Peroxidase (HRP), est appliqué et cela est suivi par une incubation dont le temps et la température sont déterminés par l'anticorps secondaire utilisé. Puis, suite à 3 lavages au TBS/Tween 0,1% de 5 minutes chacun, l'étape de l'amplification a lieu avec l'ajout de la TSA couplée au fluorophore choisi diluée 200 fois dans une solution Borate/H₂O₂ 0,003% pour la révélation du complexe antigène-anticorps dont le temps d'incubation est de 10 minutes à température ambiante. Les lames sont alors à nouveau lavées 3 fois pendant 5 minutes au TBS/Tween 0,1%.

Après ces lavages, les étapes du protocole à partir de l'élimination des antigènes via la méthode HIER sont répétées entièrement. Pendant cette répétition des étapes, les anticorps primaire et secondaires du deuxième antigène d'intérêt sont appliqués. Puis, les noyaux subissent une contre-coloration durant 5 minutes à température ambiante grâce à une solution de Hoechst dilué dans du TBS/BSA 10%/Tween 0,1%. Finalement, les lames sont lavées dans du TBS/Tween 0,1% pendant 5 minutes, puis 3 fois 5 minutes dans de l'eau distillée.

Les lames sont montées manuellement en y appliquant 1 goutte de *DAKO fluorescence mounting medium* et en les recouvrant d'un couvre-lames.

Afin d'obtenir les images numériquement et de les analyser, les lames sont scannées avec un slide scanner (*Axiocan Zeiss Z1*).

6.3.8 Essais détaillés de l'immunofluorescence (indirecte) en multiplex

Les anticorps primaires utilisés sont le *F40/80 Rabbit mAb, CellSignaling, Cat. #70076, Isotype : rabbit* dilué 200 fois dans du TBS/BSA 1%/Tween 0,1% pour le marquage des macrophages et le *Purified Rat Anti-Mouse CD138, BD Biosciences, Cat. #553712, Isotype : rat* à une concentration de 0,25 µg/mL dans du TBS/BSA 1%/Tween 0,1%) pour celui de Syndécan-1.

Ensuite, les anticorps secondaires utilisés sont les suivants : le anti-rabbit *EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit*, DAKO Agilent, Cat. #K4003 qui reconnaît l'anticorps primaire des macrophages et le anti-rat *Peroxidase-AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (H+L) (min. X Bov, Ck, Gt, GP, Sy Hms, Hrs, Hu, Ms, Rb, Shp Sr Prot)*, Jackson ImmunoResearch, Cat. #712-035-153 qui reconnaît celui de Syndécan-1.

Les macrophages sont révélés avec de la Tyramide couplée au fluorophore *Alexa Fluor 488*, *Invitrogen* émettant une lumière verte, tandis que Syndécan-1 est lui révélé avec de la Tyramide couplée au fluorophore *Alexa Fluor 647*, *Invitrogen* émettant une lumière rouge.

Tous les marquages fluorescents réalisés sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

TABLEAU 4: ÉNUMÉRATION DE TOUS LES IMMUNOMARQUAGES EN FLUORESCENCE RÉALISÉS. LE NOM DE LA LAME, L'ORGANE DU TISSU MARQUÉ AINSI QUE L'ORDRE DES ANTICORPS PRIMAIRES ET ANTICORPS SECONDAIRE SONT ÉGALEMENT DÉTAILLÉS.

Organe	Nom de la lame	Marque anticorps primaire 1	Anticorps secondaire 1	Marque anticorps primaire 2	Marque anticorps secondaire 2
Poumon	EXP2 3.11	CellSignaling	Anti-rabbit	BD Biosciences	Anti-rat
Poumon	EXP1 16 CP3	CellSignaling	Anti-rabbit	BD Biosciences	Anti-rat
Poumon	EXP1 10 CP3	CellSignaling	Anti-rabbit	BD Biosciences	Anti-rat
Poumon	EXP1 11.1	CellSignaling	Anti-rabbit	BD Biosciences	Anti-rat
Poumon	EXP2 3.12	BD Biosciences	Anti-rat	CellSignaling	Anti-rabbit
Poumon	EXP1 16 CP4	BD Biosciences	Anti-rat	CellSignaling	Anti-rabbit

Poumon	EXP1 10 CP4	BD Biosciences	Anti-rat	CellSignaling	Anti-rabbit
Poumon	EXP1 11.2	BD Biosciences	Anti-rat	CellSignaling	Anti-rabbit

7. Résultats

7.1 Impact des CNT sur la concentration plasmique et pulmonaire de Syndécan-1 soluble

Nous avons dans un premier temps quantifié la concentration de Syndécan-1 soluble présent dans chaque échantillon de plasma et de liquide broncho-alvéolaire chez les souris A/J et C57BL/6 traitées ou non aux CNT et au cocarcinogène 3MC. Pour chaque condition d'instillation différente, la concentration moyenne et sa déviation standard ont été calculées.

Nous avons comparé les résultats obtenus pour les différents groupes d'instillation à ceux des groupes contrôles qui n'ont ni été prétraités au 3MC, ni reçus des particules. Concernant le BAL, autant pour la souche A/J que la souche B6, il n'existe pas de différence significative au niveau de la concentration de Syndécan-1 entre les souris contrôles et traitées. Ni le 3MC, ni les CNT-7, ni les CNT-T ou encore leur combinaison influencent la concentration du protéoglycan. Ensuite, concernant le plasma, les observations obtenues à partir des souris B6 sont similaires à ceux du BAL (Annexe 1). Cependant, chez les souris A/J, après l'instillation des CNT-7 et l'injection du 3MC et ou de l'huile, une augmentation de la concentration en Syndécan-1 soluble est observée (Figure 3). Une comparaison additionnelle a alors démontré que cette augmentation est seulement due aux CNT-7 et non au 3MC. En effet, le 3MC, tout comme les CNT-T, n'affecte pas les concentrations de Syndécan-1 soluble.

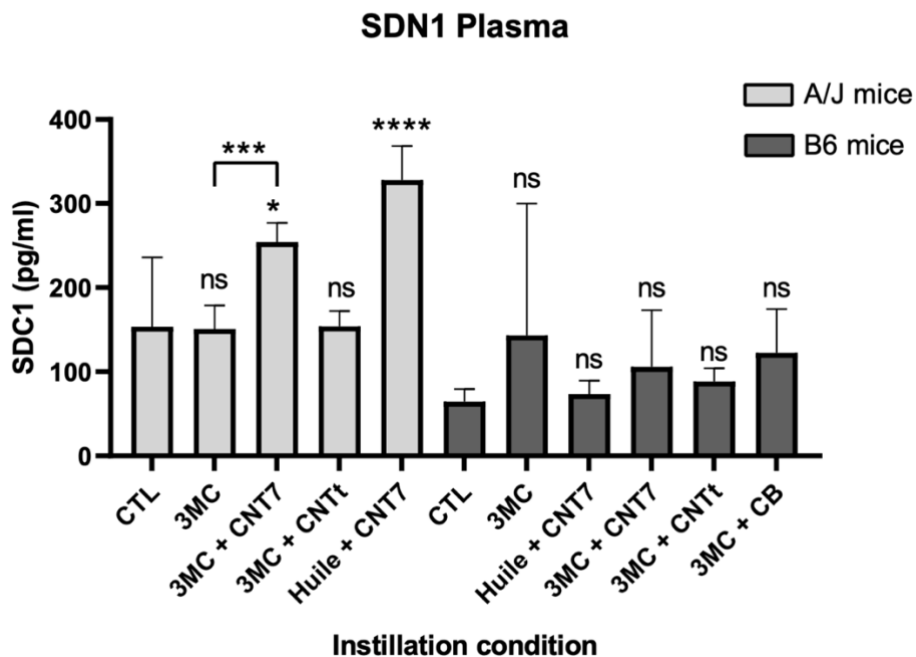


FIGURE 3: CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE SYNDÉCAN-1 SOLUBLE CHEZ LES SOURIS A/J ET B6 EN FONCTION DES DIFFÉRENTES CONDITIONS D'INSTILLATION. DES HAUSSES DE CONCENTRATION DE SYNDÉCAN-1 SONT OBSERVÉES DANS LE PLASMA DE SOURIS A/J APRÈS UNE INSTILLATION AUX CNT-7 ET UN TRAITEMENT AU 3MC ET OU À L'UILE. SEULS LES CNT-7 INFLUENCENT LA CONCENTRATION. TESTS STATISTIQUES : CHAQUE BARRE CORRESPOND À UNE MOYENNE DES ÉCHANTILLONS DU GROUPE ± SD. UN TEST ANOVA ONE-WAY A ÉTÉ EFFECTUÉ SUIVI D'UN TEST DE DUNNETT À COMPARAISONS MULTIPLES PAR RAPPORT AUX GROUPES CONTRÔLE. NS=NON SIGNIFICATIF, *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$ INDIQUENT UNE DIFFÉRENCE STATISTIQUEMENT NON SIGNIFICATIVE/SIGNIFICATIVE PAR RAPPORT AU GROUPE CONTRÔLE.

7.2 La corrélation entre la concentration de Syndécan-1 soluble et les différents stades de l'adénocarcinome

Nous avons ensuite comparé les teneurs en Syndécan-1 aux différents stades d'adénocarcinome papillaire identifiés dans le modèle de cancer pulmonaire développé par Antoine Quoidbach. Pour chaque échantillon de BAL ou de plasma, nous avons analysé s'il existe une éventuelle corrélation significative entre d'une part la quantité de Syndécan-1 présente et d'autre part la surface occupée par un stade du cancer par rapport à la surface totale du tissu pulmonaire. Outre les tests de corrélation de Pearson, des courbes de régression linéaire ont été estimées afin de mieux illustrer les effets des deux variables l'une sur l'autre.

Aucune corrélation avec la concentration de la protéine n'est observée au niveau des tissus sains, du stade in situ et du stade papillaire en ce qui concerne les BAL et les plasmas des deux souches de souris (Annexe 2).

Il en est de même pour le stade précancéreux des souris B6 (BAL et plasma), (Annexe 2). Par contre, nous observons que la concentration de Syndécan-1 dans le plasma est corrélée de manière significative à la surface précancéreuse présente dans le tissu total chez les souris A/J (Tableau 5 et Figure 4). L'estimation de la régression linéaire confirme ce résultat, la quantité de Syndécan-1 est associée au stade précancéreux et inversement. En outre, cette corrélation semble positive. Au plus la concentration en Syndécan-1 est élevée, au plus la surface précancéreuse dans les tissus augmente. Cette association n'a pas été observée en analysant les teneurs de Syndécan-1 dans le BAL (Annexe 2).

TABLEAU 5: COEFFICIENT DE CORRÉLATION DE PEARSON ENTRE LA SURFACE OCCUPÉE PAR LE STADE PRÉCANCÉREUX, PAR RAPPORT À LA SURFACE TOTALE DU TISSU PULMONAIRE, ET LA CONCENTRATION DE SYNDÉCAN-1 DANS LE PLASMA DES SOURIS A/J. LE STADE PRÉCANCÉREUX EST CORRÉLÉ POSITIVEMENT À LA CONCENTRATION PLASMATIQUE DE SYNDÉCAN-1 DES SOURIS A/J. TESTS STATISTIQUES : UN TEST SUR LE COEFFICIENT DE CORRÉLATION DE PEARSON A ÉTÉ EFFECTUÉ. *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001, ****=p<0.0001 INDIQUENT UNE CORRÉLATION STATISTIQUEMENT SIGNIFICATIVE.

Stade du cancer	Coefficient de corrélation de Pearson
Pré-cancer	0,4352*

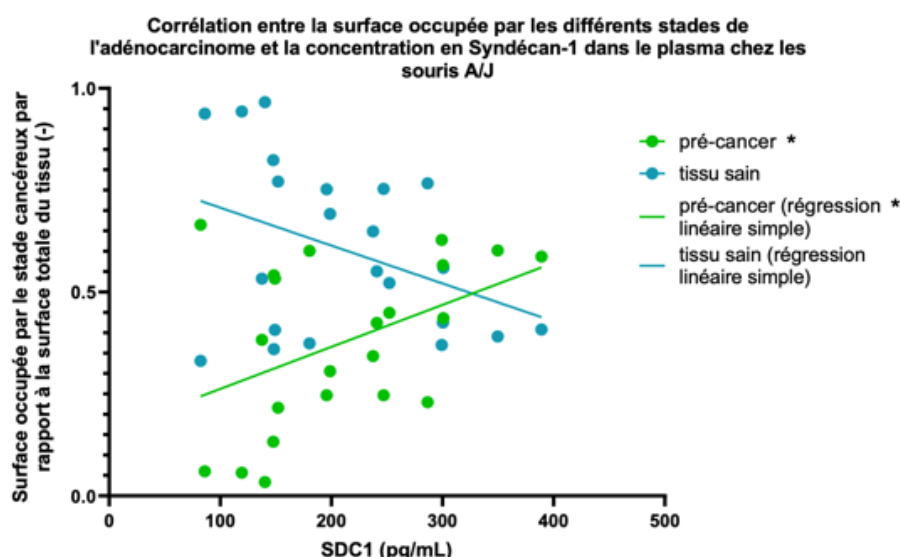


FIGURE 4: SURFACES OCCUPÉES PAR LE TISSU SAIN ET LE STADE PRÉ-CANCÉREUX PAR RAPPORT À LA SURFACE TOTAL DU TISSU PULMONAIRE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS EN SYNDÉCAN-1 DANS LE PLASMA DES SOURIS A/J. AU PLUS LA CONCENTRATION DE SYNDÉCAN-1 EST ÉLEVÉE, AU PLUS LA SURFACE PRÉ-CANCÉREUSE DE L'ADÉNOCARCINOME EST IMPORTANTE. TESTS STATISTIQUES : L'ASSOCIATION ENTRE CHAQUE GRADE ET LA CONCENTRATION EN SDC-1 EST MESURÉE À L'AIDE D'UN MODÈLE DE RÉGRESSION LINÉAIRE SIMPLE, SUIVI D'UN TEST SUR LA PENTE, β_1 , DE LA RÉGRESSION LINÉAIRE. *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001, ****=p<0.0001 INDIQUENT UNE VALEUR DE β_1 SIGNIFICATIVEMENT DIFFÉRENTE DE 0.

7.3 Colocalisation des macrophages et Syndécan-1 dans les poumons

7.3.1 Localisation des macrophages pulmonaires et de Syndécan-1 par immunohistochimie en DAB

Sur les marquages réalisés par immunohistochimie en DAB, la couleur brune correspond à la couleur de la forme oxydée du chromogène DAB et correspond donc aux macrophages ou à Syndécan-1. Les noyaux des cellules sont colorés en bleu.

Les spécificités et les concentrations optimales de l'anticorps primaire anti-macrophages *F40/80 Rabbit mAb, CellSignaling* et de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin, couplé à l'HRP, (*EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit, DAKO Agilent*), avaient déjà été analysées et confirmées précédemment dans le mémoire de Léa Hiéronimus.

Concernant Syndécan-1, les immunomarquages réalisés avec l'anticorps primaire anti-CD138 (*Purified Rat Anti-Mouse CD138, BD Biosciences*) et révélés grâce à l'anticorps secondaire anti-rat (*Peroxidase-AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch*) sont les seuls concluants.

Tout d'abord, leurs spécificités respectives ont été vérifiées et confirmées : d'une part, l'anti-CD138 de BD Biosciences pour Syndécan-1 en utilisant des coupes de cerveau de souris, le cerveau constituant notamment un contrôle négatif pour la protéine ; Et d'autre part l'anti-rat, conjugué à l'HRP, pour les immunoglobulines de rat en omettant l'ajout d'anticorps primaire lors du marquage d'une lame de poumon/d'iléon, agissant comme contrôles positifs (Figure 5).

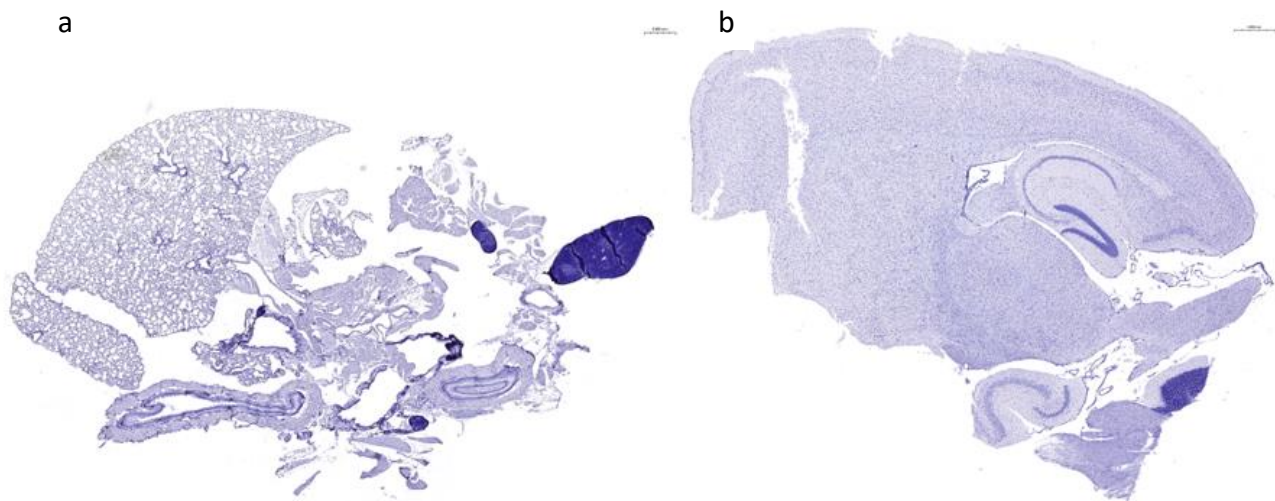


FIGURE 5: IMMUNOMARQUAGES VÉRIFIANT LA SPÉCIFICITÉ D'UN ANTICORPS PRIMAIRE ET SECONDAIRE POUR LA LOCALISATION DE SYNDÉCAN-1. A) L'ANTICORPS SECONDAIRE *PEROXIDASE-AFFINIPURE DONKEY ANTI-RAT IgG (H+L)*, JACKSON IMMUNORESEARCH EST VÉRIFIÉ EN OMETTANT L'ANTICORPS PRIMAIRE ANTI-CD138 SUR UNE COUPE DE POUMON AGISSANT COMME CONTRÔLE POSITIF (LAME : EXP2 – 3.3, G = 2.3x, ÉCHELLE : 0.500MM) ET B) L'ANTICORPS PRIMAIRE *PURIFIED RAT ANTI-MOUSE CD138*, BD BIOSCIENCES EST VÉRIFIÉ AVEC UNE COUPE DE CERVEAU AGISSANT COMME CONTRÔLE NÉGATIF (LAME BRAINM 10, G = 3.4x, ÉCHELLE : 0.500MM). SUR LES DEUX LAMES, AUCUN MARQUAGE BRUN N'EST VISIBLE. CELA PERMET DONC DE CONCLURE QUE LES DEUX ANTICORPS PRÉSENTENT UNE BONNE SPÉCIFICITÉ.

Ensuite, plusieurs concentrations de l'anticorps primaire anti-CD138 provenant de BD Biosciences ont été testées sur des coupes de poumons et d'iléon afin d'obtenir un marquage précis et sans bruit de fond. Les marquages sont optimaux avec une concentration de l'anticorps primaire entre 0,25 µg/mL et 0,50 µg/mL. A partir de 0,25 µg/mL, une saturation de la formation du complexe antigène-anticorps primaire est atteinte.

Dans des poumons sains, Syndécan-1 est essentiellement observable au niveau des cellules épithéliales (Figure 6a). Sur des tissus pulmonaires atteints par l'adénocarcinome, les marquages du protéoglycan sont variables en fonction de la souris (Figure 6b, 6c). Par exemple, dans une zone tumorale d'un tissu pulmonaire atteint par l'adénocarcinome papillaire murin, (le dernier stade), aucun marquage de Syndécan-1 n'est visible (Figure 6b). Mais dans un tissu atteint par l'adénocarcinome in situ, le protéoglycan est observable (Figure 7a). Ou encore, selon la souris, en dehors de la zone tumorale, des marquages de Syndécan-1 sont visibles au niveau des cellules épithéliales comme dans les tissus sains, mais également dans le parenchyme autour des alvéoles (Figure 6c).

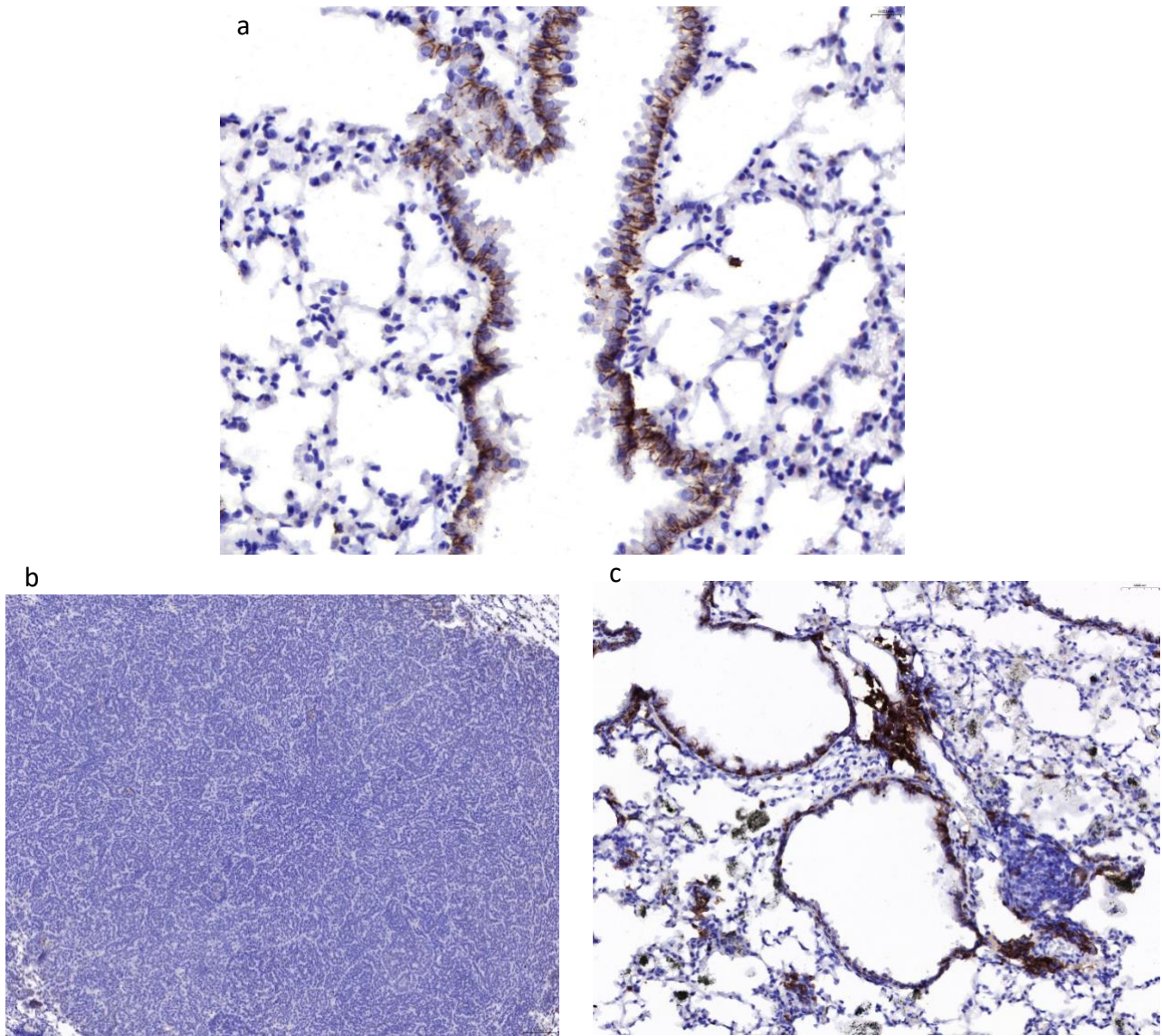
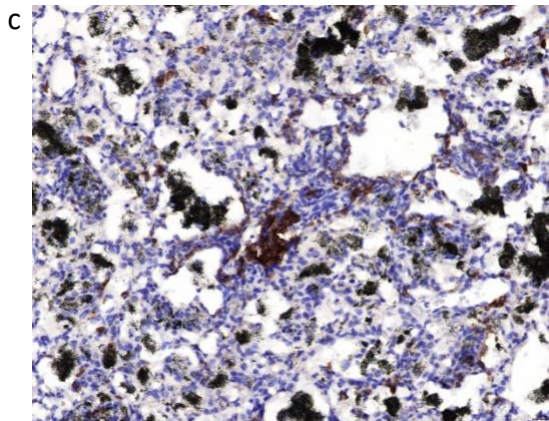
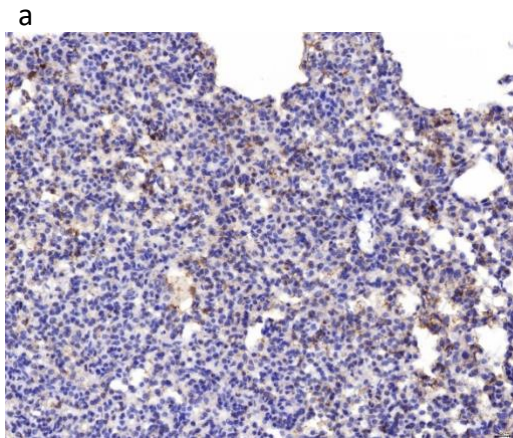


FIGURE 6: IMMUNOMARQUAGES EN DAB DE SYNDÉCAN-1 SUR DES COUPES DE TISSUS PULMONAIRES. L'ANTICORPS PRIMAIRE *PURIFIED RAT ANTI-MOUSE CD138*, *BD BIOSCIENCES* AVEC UNE CONCENTRATION DE 0,50 µG/ML ET L'ANTICORPS SECONDAIRE *PEROXIDASE-AFFINI PURE DONKEY ANTI-RAT IgG (H+L)*, *JACKSON IMMUNORESEARCH* DILUÉ 500 FOIS SONT UTILISÉS. A) IMMUNOMARQUAGE DE SYNDÉCAN-1 SUR LE TISSU PULMONAIRE D'UNE SOURIS CONTRÔLE (NON INSTILLÉE AVEC DU 3MC, NI DES CNT). LE PROTÉOGLYCAN EST ESSENTIELLEMENT MARQUÉ AU NIVEAU DES CELLULES ÉPITHÉLIALES. (LAME : EXP2 – 3.7, G = 54.4x, ÉCHELLE = 0.020MM). B, C) IMMUNOMARQUAGES SUR LE TISSU PULMONAIRE D'UNE SOURIS PRÉTRAITÉE AU 3MC ET INSTILLÉE AUX CNT-7 ATTEINTE DU DERNIER STADE DE L'ADÉNOCARCINOME PULMONAIRE. B) UNE ZONE Tumorale NE PRÉSENTANT PAS DE MARQUAGES DE SYNDÉCAN-1. (LAME : EXP1 – 12.3, G = 15.2x, ÉCHELLE : 0.100MM) C) UNE ZONE NON Tumorale PRÉSENTANT DES MARQUAGES DU PROTÉOGLYCAN AU NIVEAU DES CELLULES ÉPITHÉLIALES ET DU PARENCHYME. DES AMAS DE CNT-7 SONT OBSERVABLES EN NOIR. (LAME : EXP1 – 12.3, G = 33.8x, ÉCHELLE = 0.050MM)

Comme les immunomarquages de Syndécan-1, des marquages de macrophages pulmonaires sur des poumons atteints des différents stades de l'adénocarcinome murin sont observables dans le parenchyme pulmonaire, les alvéoles et dans les tumeurs (Figure 7b, 7d). Cependant il n'est pas possible d'établir des analogies et des différences concrètes entre les localisations des macrophages et Syndécan-1, et par conséquent, de déterminer si certains macrophages expriment le protéoglycan (Figure 7).

Syndécan-1



Macrophages pulmonaires

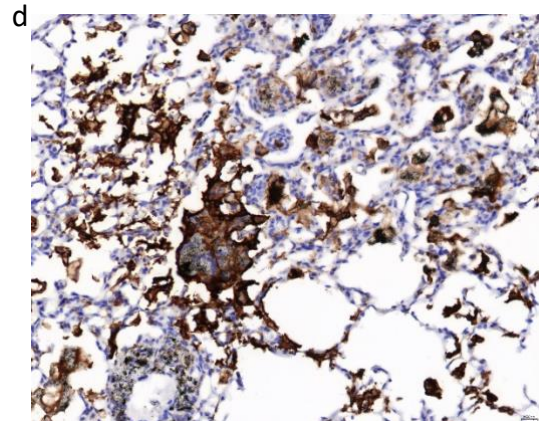
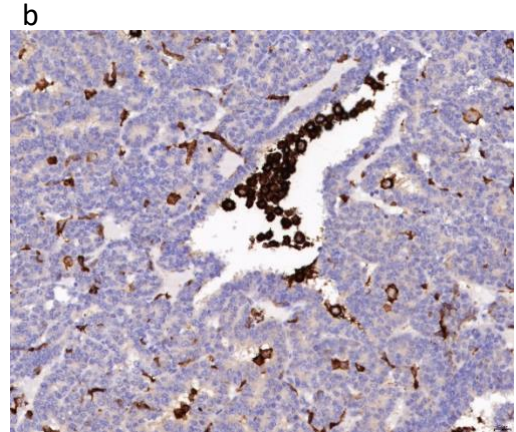


FIGURE 7: LOCALISATION DE SYNDÉCAN-1 (À GAUCHE) ET DES MACROPHAGES PULMONAIRES (À DROITE) SUR DES COUPES DE POUMONS. A, B) DES ZONES TUMORALES SUR DES COUPES DE SOURIS DIFFÉRENTES ATTEINTES RESPECTIVEMENT DE L'ADÉNOCARCINOME IN SITU ET L'ADÉNOCARCINOME PAPILLAIRE PRÉSENTENT DES IMMUNOMARQUAGES POUR SYNDÉCAN-1 (LAME : EXP1- 11.3, G = 41.8x, ÉCHELLE : 0.020MM) ET POUR DES MACROPHAGES (LAME : EXP1 – 16.1, G = 41.8x, ÉCHELLE : 0.020MM). C, D) DES ZONES NON TUMORALES SUR DES COUPES DE SOURIS DIFFÉRENTES ATTEINTES RESPECTIVEMENT DE L'ADÉNOCARCINOME IN SITU ET LE STADE PRÉ-CANCÉREUX MONTRENT DES MARQUAGES DE SYNDÉCAN-1 (LAME : EXP1 – 11.3, G = 41.8x, ÉCHELLE : 0.020MM) ET DES MACROPHAGES PULMONAIRES (LAME : EXP1 – 10.1, G = 41.8x, ÉCHELLE : 0.020MM) DANS LE PARENCHYME.

7.3.2 Colocalisation des macrophages pulmonaires et de Syndécan-1 par immunofluorescence

Sur les marquages réalisés par immunofluorescence, les macrophages pulmonaires sont colorés en vert, Syndécan-1 est coloré en rouge et les noyaux sont colorés en bleu.

Les macrophages pulmonaires et Syndécan-1 ont été colocalisés dans des tissus pulmonaires sains (contrôles), des tissus pulmonaires atteints du stade précancéreux (stade I), atteints de l'adénocarcinome in situ (stade II) ou encore atteints de l'adénocarcinome papillaire (stade III).

Concernant les tissus sains (Figure 8a, 8c), peu de marquages des macrophages et de Syndécan-1 sont observés. Les macrophages sont situés aléatoirement sur l'ensemble du tissu pulmonaire. Aucun macrophage n'exprime Syndécan-1.

Qualitativement, il est constatable que le nombre de macrophages augmente chez les souris atteintes du stade précancéreux de l'adénocarcinome, surtout dans les zones dysplasiques. Les marquages de Syndécan-1 augmentent également dans les zones dysplasiques, mais moins fortement et y sont essentiellement visibles au niveau du parenchyme (Figure 8b, 8d, 8e, 8f). Comme dans les tissus sains, aucun co-marquage n'est observable.

Les tissus atteints de l'adénocarcinome in situ présentent beaucoup de marquages, tant de Syndécan-1 que des macrophages dans le parenchyme pulmonaire en périphérie de la tumeur (Figure 9e, 9g). Par contre, à l'intérieur de la tumeur, beaucoup de macrophages, mais peu de Syndécan-1 sont observés (Figure 9a, 9c). Toutefois, aucun macrophage n'exprime le protéoglycan.

Finalement, au niveau de l'adénocarcinome papillaire, des marquages macrophagiques sont localisés sur l'ensemble du tissu périphérique et intra-tumoral. A nouveau, moins de marquages de Syndécan-1 sont visibles (Figure 9b, 9f, 9h). Aucun co-marquage de Syndécan-1 et des macrophages n'est observé, excepté dans une zone intra-tumorale particulière (Figure 9d). La superposition des deux marquages donne une couleur orange-jaune. Les macrophages exprimant le protéoglycan ne sont présents qu'en très faible nombre et la structure histologique, à l'intérieur de la tumeur, dans laquelle ils sont localisés est inconnue.

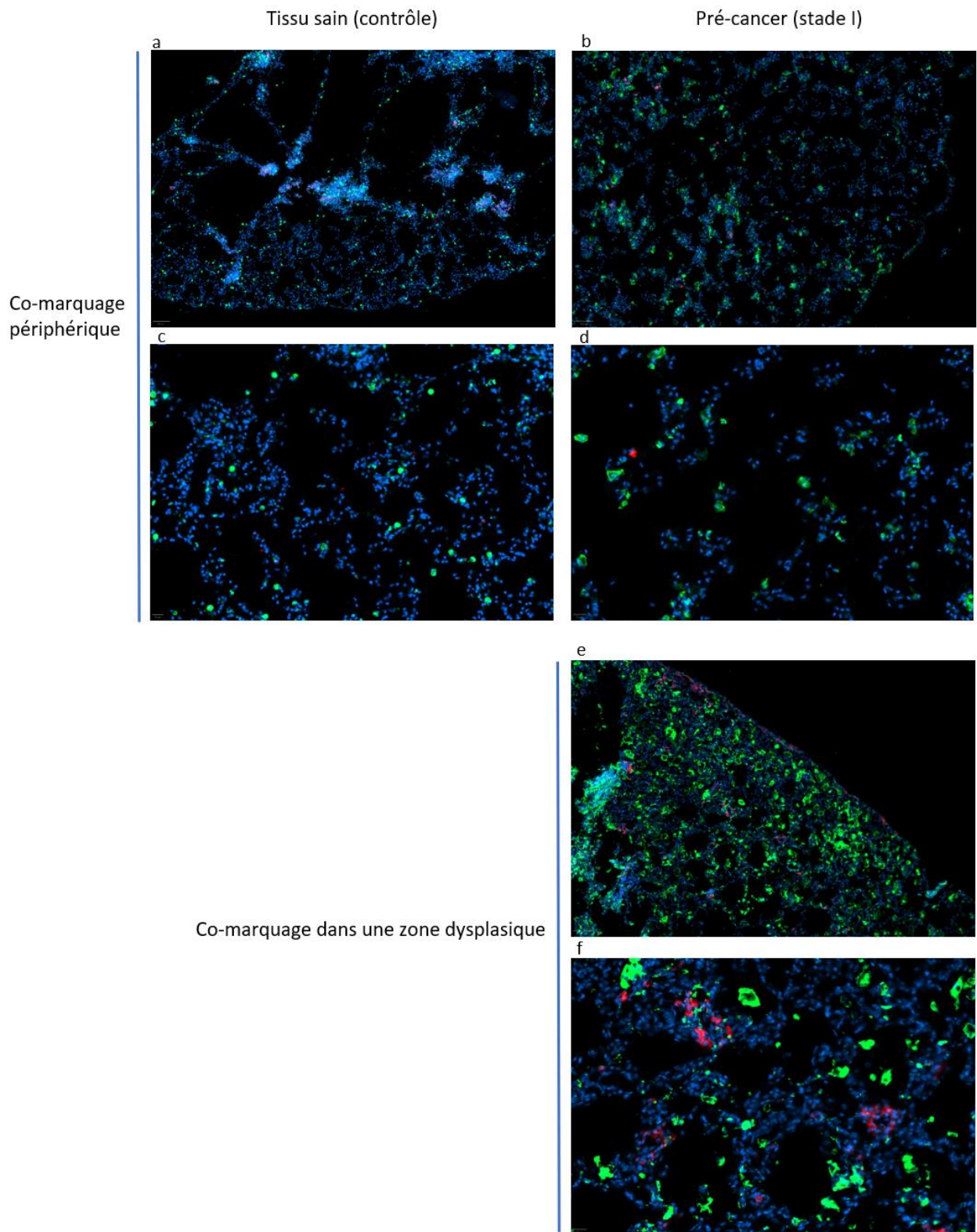


FIGURE 8: COLOCALISATION DES MACROPHAGES PULMONAIRES ET DE SYNDÉCAN-1 PAR IMMUNOFLUORESCENCE DANS DES TISSUS DE SOURIS CONTRÔLES (A, C) ET DANS DES TISSUS PÉRIPHÉRIQUES ET DYSPLASIQUES DE SOURIS ATTEINTES DU STADE PRÉCANCÉREUX DE L'ADÉNOCARCINOME PULMONAIRE (B, D, E, F). LES MACROPHAGES PULMONAIRES N'EXPRIMENT PAS SYNDÉCAN-1 DANS CES TISSUS PULMONAIRES. A) LAME : EXP2 – 3.12, G = 5.72x, ÉCHELLE : 100µm. B) LAME : EXP1 – 10 CP3, G = 6.69x, ÉCHELLE : 100µm. C) LAME : EXP2 – 3.12, G = 18.87x, ÉCHELLE : 20µm. D) LAME : EXP1 – 10 CP3, G = 22.06x, ÉCHELLE : 20µm. E) LAME : EXP1 – 10 CP3, G = 6.96x, ÉCHELLE : 100µm. F) LAME : EXP1 – 10 CP3, G = 22.97x, ÉCHELLE : 20µm.

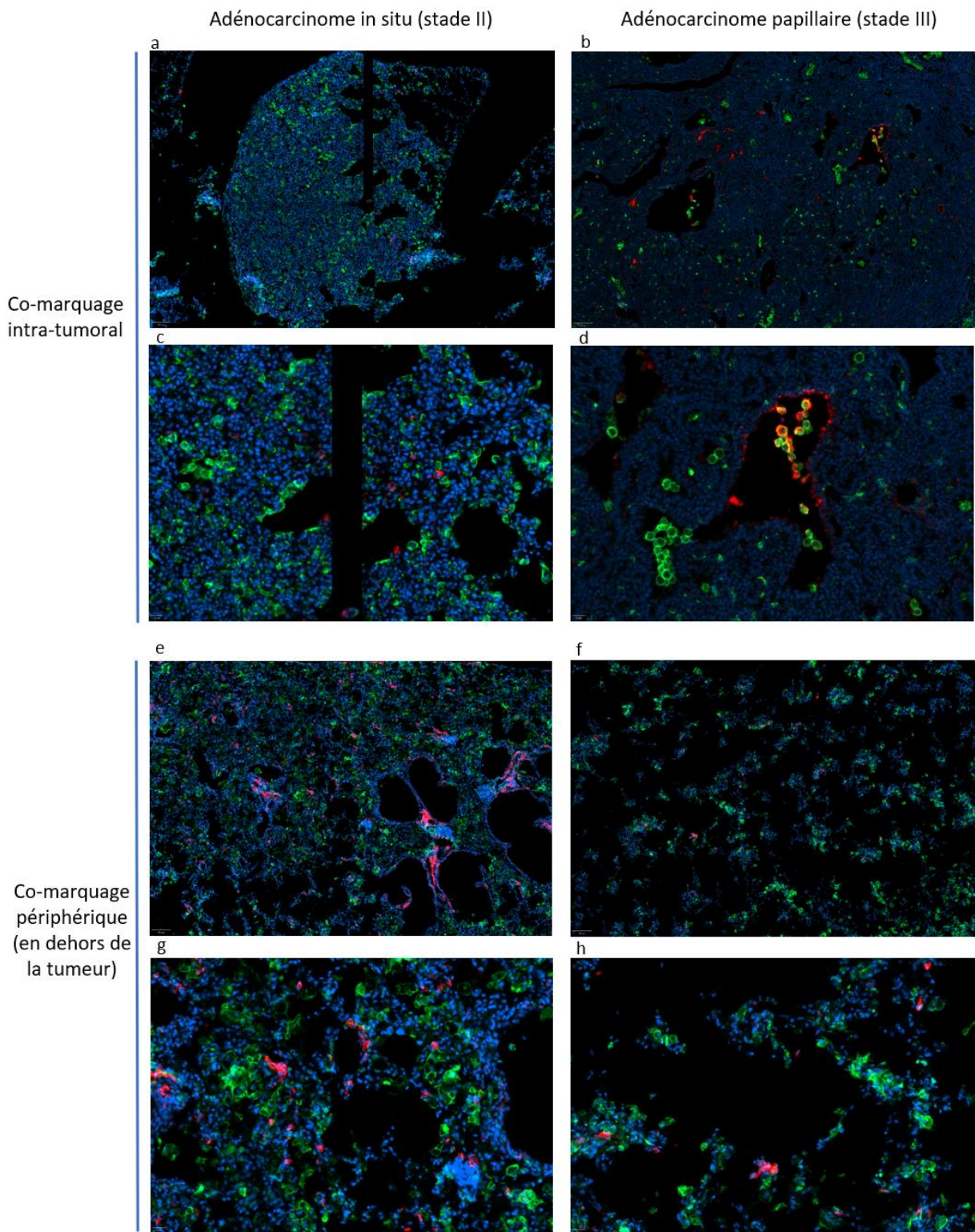


FIGURE 9: COLOCALISATION DES MACROPHAGES PULMONAIRES ET DE SYNDÉCAN-1 PAR IMMUNOFLUORESCENCE À L'INTÉRIEUR ET EN DEHORS DE TUMEURS CHEZ DES SOURIS ATTEINTES DE L'ADÉNOCARCINOME IN SITU (A, C, E, G) ET L'ADÉNOCARCINOME PAPILLAIRE (B, D, F, H). SAUF DANS UNE ZONE PARTICULIÈRE INTRA-TUMORALE DE L'ADÉNOCARCINOME PAPILLAIRE, LES MACROPHAGES PULMONAIRES N'EXPRIMENT PAS SYNDÉCAN-1. A, E) LAME : EXP1 – 11.1, G = 6.46x, ÉCHELLE : 100µm. B, F) LAME : EXP1 – 16 CP4, G = 6.50x, ÉCHELLE : 100µm. C, G) LAME : EXP1 – 11.1, G = 21.33x, ÉCHELLE : 20µm. D, H) LAME : EXP1 – 16 CP4, G = 21.46x, ÉCHELLE : 20µm.

8. Conclusion générale

Selon les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire, les CNT-7 influencent la concentration de Syndécan-1 dans le plasma des souris A/J. En effet, une instillation aux CNT-7 est associée à une augmentation de la concentration de Syndécan-1.

Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre la concentration plasmatique de Syndécan-1 chez les souris A/J et le stade pré-cancéreux de l'adénocarcinome pulmonaire murin. Une concentration en Syndécan-1 élevée dans le plasma est notamment associée à un tissu pulmonaire fortement atteint par le stade non invasif pré-cancéreux.

Ensuite, dans les tissus pulmonaires, la localisation de Syndécan-1 par IHC en DAB est variable selon les tissus de souris, mais elle se situe essentiellement au niveau des cellules épithéliales. Il n'est pas possible de déterminer par IHC en DAB si certains macrophages expriment le protéoglycan.

Finalement, grâce à l'immunofluorescence en multiplex, il est possible de réaliser des co-marquages des macrophages et de Syndécan-1. Aucun co-marquage n'est observé sur les tissus pulmonaires des souris analysées, qu'elles soient saines ou souffrantes des différents stades de l'adénocarcinome. Une zone intra-tumorale de l'adénocarcinome papillaire contient cependant plusieurs macrophages exprimant le Syndécan-1.

9. Discussion et perspectives

L'objectif de ce projet de recherche était de localiser le Syndécan-1 afin de déterminer si des macrophages pulmonaires expriment le protéoglycan, mais également d'évaluer l'impact de l'inhalation de CNT sur sa présence dans les poumons et la circulation, ou encore d'estimer d'éventuelles corrélations entre sa quantité sous forme soluble et les différents stades de l'adénocarcinome pulmonaire.

La présence de Syndécan-1 sous forme soluble est due au processus d'*ectodomain shedding* qui est hautement régulé. Ce mécanisme peut par exemple être accéléré par l'action directe de protéases comme la thrombine, la plasmine et l'élastase ou par l'action indirecte d'héparanases clivant les héparanes sulfates et facilitant ainsi le clivage du protéoglycan par les métalloprotéinases. (Couchman, 2021 ; Joensuu et al., 2002) Nos résultats indiquent que la concentration de Syndécan-1 soluble est seulement influencée par les CNT-7 dans le plasma des souris A/J. En effet, les CNT-7 induisent une augmentation de sa concentration dans le plasma. Cette augmentation pourrait donc s'expliquer par un possible effet qu'auraient les CNT-7 sur l'activité des protéases, les héparanases ou sur les métalloprotéinases.

Ensuite, une corrélation a été trouvée entre le stade précancéreux de l'adénocarcinome pulmonaire et la concentration plasmatique de Syndécan-1 des souris A/J. La concentration du protéoglycan augmente avec l'apparition du stade précancéreux dans le tissu pulmonaire. Syndécan-1 pourrait donc être utilisé comme un biomarqueur lors du développement précoce de l'adénocarcinome, sa présence attestant de l'avancée de l'adénocarcinome non invasif dans le tissu pulmonaire.

Selon de nombreuses études (Couchman, 2021 ; Joensuu et al., 2002 ; Linnerth et al., 2005), une concentration élevée de Syndécan-1 dans le sérum est associée à un pronostic vital faible dans le cancer pulmonaire. Au plus la concentration du protéoglycan dans le sérum est haute, au plus le cancer est avancé. Joensuu et al., 2002 a par exemple démontré que des patients souffrants du cancer pulmonaire non à petites cellules, dont l'adénocarcinome fait partie, voient leur temps de survie diminuer au plus la concentration en Syndécan-1 dans leur sérum est élevée. Par ailleurs, il a confirmé cette association quel que soit le stade du cancer duquel les patients sont atteints en regroupant les stades précoces et les stades avancés.

(Joensuu et al., 2002) Ces résultats correspondent donc à nos résultats pour le stade précancéreux de l'adénocarcinome pulmonaire murin.

Comme mentionné ci-dessus, tous ces résultats ne sont qu'observables chez les souris A/J et non les souris B6. Cette différence de résultats pourrait être due à la résistance plus élevée des souris B6 au cancer pulmonaire, par rapport aux A/J. (Domínguez-Punaro et al., 2008)

A l'opposé du plasma, la concentration de Syndécan-1 dans le BAL ne varie pas suite au traitement du 3MC et/ou des différents types de CNT, que ce soit chez les souris A/J ou B6. Kliment et al., 2009 a également analysé la quantité de Syndécan-1 soluble dans le BAL de souris (B6), mais suite à une exposition aux fibres d'asbeste. A l'aide d'un modèle expérimental murin de fibrose pulmonaire, il a notamment découvert que les fibres d'asbeste induisent une augmentation significative de la forme soluble de Syndécan-1 dans le BAL 28 jours après l'instillation. (Kliment et al., 2009) Des expositions aux CNT et à l'amiante, malgré leurs propriétés physico-chimiques communes, conduiraient donc à des réponses différentes concernant le protéoglycan. Il faut cependant noter que les BAL des souris du modèle de cancer pulmonaire utilisés lors de nos expériences ont été récoltés entre 6 et 8 mois après la dernière instillation aux CNT.

Dans un second temps, la colocalisation des macrophages pulmonaires et de (la forme membranaire de) Syndécan-1 sur des tissus pulmonaires de souris A/J a démontré que Syndécan-1 n'était pas exprimé par les macrophages. Une exception subsiste cependant dans une région intra-tumorale particulière du dernier stade de l'adénocarcinome. Cette structure cellulaire dans laquelle se situent les quelques co-marquages ne fait pas partie de la tumeur en tant que telle et est inconnue. Plusieurs hypothèses non exhaustives ont donc été soulevées. Il pourrait s'agir de bronchioles envahies par la tumeur, ou d'un vaisseau à l'intérieur de la tumeur appartenant par exemple au réseau lymphatique ou vasculaire. Dans le cas éventuel où les macrophages exprimant Syndécan-1 se trouvent dans un vaisseau sanguin intra-tumoral, il pourrait alors y avoir un lien entre ces résultats histologiques et les résultats obtenus dans le plasma. Ces cellules pourraient également correspondre aux monocytes/macrophages immatures identifiés dans notre laboratoire à partir d'un modèle de mésothéliome. (Huaux et al., 2016)

Finalement, ces résultats ne s'accordent donc pas avec ceux de Orsi, 2021 obtenus grâce à un modèle expérimental de mésothéliome pleural malin induit par des fibres de CNT chez le rat. En effet, Orsi, 2021 a démontré que lors du développement précoce du mésothéliome pleural malin, les macrophages SPM immunosuppresseurs recrutés suite à la *Macrophage Disappearance Reaction* expriment Syndécan-1. (Orsi, 2021) Ainsi, ceci constituerait un exemple de dissimilitude entre le mésothéliome et l'adénocarcinome pulmonaire.

9.1 Perspectives

Tout d'abord, vu le faible nombre de tissus pulmonaires, atteints des différents stades de l'adénocarcinome qui ont été co-marqués, il n'est pas possible de généraliser nos résultats. De plus, l'immunofluorescence en multiplex est une technique délicate car les tissus peuvent être endommagés et cela peut donc fausser les résultats. Ainsi, dans le cadre de futures recherches, la réalisation des co-marquages des macrophages et de Syndécan-1 dans les poumons des souris non testées, permettront de vérifier (et peut-être confirmer) les résultats actuels. En effet, en augmentant le nombre d'échantillons, la colocalisation sera significativement plus pertinente.

Ensuite, il serait pertinent de découvrir la nature de la structure cellulaire intra-tumorale dans laquelle les macrophages pulmonaires exprimant Syndécan-1 sont situés. Celle-ci nous en apprendra plus sur l'origine de ces macrophages et donc l'origine de la présence du protéoglycan dans la tumeur. Afin de par exemple savoir s'il s'agit d'un vaisseau vasculaire, un marqueur de cellules endothéliales telles que la protéine CD31 pourrait être utilisé. (CliniSciences, n.d.) Néanmoins, selon nos résultats actuels, dans les tissus touchés par l'adénocarcinome pulmonaire, l'expression de Syndécan-1 est majoritairement non macrophagique. Connaître les autres types cellulaires l'exprimant nous aidera donc également à mieux comprendre son rôle dans la tumorigenèse. Il est par exemple de source connue que Syndécan-1 est fortement exprimé à la surface de cellules plasmatiques. (Backman et al., 2021)

Finalement, il serait intéressant de développer un nouveau modèle expérimental murin de cancer pulmonaire induit par des CNT dans lequel les souris sont sacrifiées après un laps de temps plus court par rapport à la dernière instillation des différentes particules.

Parallèlement au modèle de mésothéliome pleural malin induit par des CNT chez le rat, développé par M. Orsi dans le LTAP, les divers groupes de souris pourraient être sacrifiés 3, 7 et 15 jours après leur dernier traitement aux CNT. Ce modèle permettrait ainsi d'étudier le développement précoce de l'adénocarcinome pulmonaire murin, lorsque les tumeurs ne sont pas encore très développées. Suite aux sacrifices des souris, les tissus pulmonaires, le BAL et le plasma seraient à nouveau récoltés et les expériences réalisées (la qualification et quantification des différents stades de l'adénocarcinome, la quantification de Syndécan-1 et la localisation en multiplex des macrophages et du protéoglycan) pourraient être répétées et comparées aux résultats actuels.

10. Bibliographie

- Aegerter, H., Lambrecht, B. N., & Jakubzick, C. V. (2022). Biology of lung macrophages in health and disease. *Immunity*, 55(9), 1564–1580. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.010>
- Angsana, J., Chen, J., Smith, S., Xiao, J., Wen, J., Liu, L., Haller, C. A., & Chaikof, E. L. (2015). Syndecan-1 Modulates the Motility and Resolution Responses of Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(2), 332–340. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304720>
- Babele, P., Verma, M., & Bhatia, R. (2021). Carbon nanotubes: A review on risks assessment, mechanism of toxicity and future directives to prevent health implication. *BIOCELL*, 45(2), Article 2. <https://doi.org/10.32604/biocell.2021.013409>
- Backman, M., La Fleur, L., Kurppa, P., Djureinovic, D., Elfving, H., Brunnström, H., Mattsson, J. S. M., Lindberg, A., Pontén, V., Eltahir, M., Mangsbo, S., Gulyas, M., Isaksson, J., Jirström, K., Kärre, K., Leandersson, K., Mezheyeuski, A., Pontén, F., Strell, C., ... Micke, P. (2021). Infiltration of NK and plasma cells is associated with a distinct immune subset in non-small cell lung cancer. *The Journal of Pathology*, 255(3), 243–256. <https://doi.org/10.1002/path.5772>
- Borczuk, A. C. (2022). Updates in grading and invasion assessment in lung adenocarcinoma. *Modern Pathology*, 35(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41379-021-00934-3>
- Cheng, Y. Y., Rath, E. M., Linton, A., Yuen, M. L., Takahashi, K., & Lee, K. (2020). The Current Understanding Of Asbestos-Induced Epigenetic Changes Associated With Lung Cancer. *Lung Cancer (Auckland, N.Z.)*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S186843>
- CliniSciences. (n.d.). *Anti-CD31 CE/IVD pour IHC - Pathologies hématologiques Clinisciences*. Retrieved 11 June 2023, from <https://www.clinisciences.com/achat/cat-anti-cd31-ce-ivd-pour-ihc-pathologies-4400.html#>
- Couchman, J. R. (2021). Syndecan-1 (CD138), Carcinomas and EMT. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4227. <https://doi.org/10.3390/ijms22084227>

- *Déverrouiller le système immunitaire contre les cellules cancéreuses | Institut Curie.* (n.d.). Retrieved 2 December 2022, from <https://curie.fr/dossier-pedagogique/deverrouiller-le-systeme-immunitaire-contre-les-cellules-cancereuses>
- Domínguez-Punaro, M. de la C., Segura, M., Radzioch, D., Rivest, S., & Gottschalk, M. (2008). Comparison of the Susceptibilities of C57BL/6 and A/J Mouse Strains to Streptococcus suis Serotype 2 Infection. *Infection and Immunity*, *76*(9), 3901–3910. <https://doi.org/10.1128/iai.00350-08>
- Donaldson, K., Poland, C. A., Murphy, F. A., MacFarlane, M., Chernova, T., & Schinwald, A. (2013). Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos— Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(15), 2078–2086. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.014>
- Dong, J., & Ma, Q. (2015). Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity. *Nanotoxicology*, *9*(5), 658–676. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1009187>
- Dong, J., & Ma, Q. (2018). Type 2 Immune Mechanisms in Carbon Nanotube-Induced Lung Fibrosis. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01120>
- Dong, J., & Ma, Q. (2019). Integration of inflammation, fibrosis, and cancer induced by carbon nanotubes. *Nanotoxicology*, *13*(9), 1244–1274. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1651920>
- Duke, K. S., & Bonner, J. C. (2018). Mechanisms of carbon nanotube-induced pulmonary fibrosis: A physicochemical characteristic perspective. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *10*(3), e1498. <https://doi.org/10.1002/wnan.1498>
- Grosse, Y., Loomis, D., Guyton, K. Z., Lauby-Secretan, B., Ghissassi, F. E., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., & Straif, K. (2014). Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *The Lancet Oncology*, *15*(13), 1427–1428. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71109-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71109-X)

- Guo, S., Wu, X., Lei, T., Zhong, R., Wang, Y., Zhang, L., Zhao, Q., Huang, Y., Shi, Y., & Wu, L. (2022). The Role and Therapeutic Value of Syndecan-1 in Cancer Metastasis and Drug Resistance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 784983. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.784983>
- Han, S., Zhuang, H., Shumyak, S., Wu, J., Li, H., Yang, L.-J., & Reeves, W. H. (2017). A novel subset of anti-inflammatory CD138+ macrophages is deficient in mice with experimental lupus*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 199(4), 1261–1274. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700099>
- Huaux, F., d’Ursel de Bousies, V., Parent, M.-A., Orsi, M., Uwambayinema, F., Devosse, R., Ibouaadata, S., Yakoub, Y., Panin, N., Palmari-Pallag, M., van der Bruggen, P., Bailly, C., Marega, R., Marbaix, E., & Lison, D. (2016). Mesothelioma response to carbon nanotubes is associated with an early and selective accumulation of immunosuppressive monocytic cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0158-0>
- Husgafvel-Pursiainen, K., Karjalainen, A., Kannio, A., Anttila, S., Partanen, T., Ojajärvi, A., & Vainio, H. (1999). Lung Cancer and Past Occupational Exposure to Asbestos. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20(4), 667–674. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.4.3404>
- Hutchinson, B. D., Shroff, G. S., Truong, M. T., & Ko, J. P. (2019). Spectrum of Lung Adenocarcinoma. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 40(3), 255–264. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2018.11.009>
- Joensuu, H., Anttonen, A., Eriksson, M., Mäkitaro, R., Alfthan, H., Kinnula, V., & Leppä, S. (2002). Soluble Syndecan-1 and Serum Basic Fibroblast Growth Factor Are New Prognostic Factors in Lung Cancer. *Cancer Research*, 62(18), 5210–5217.
- Kane, A. B., Hurt, R. H., & Gao, H. (2018). The Asbestos-Carbon Nanotube Analogy: An Update. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 361, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.06.027>

- Kind, S., Merenkow, C., Büscheck, F., Möller, K., Dum, D., Chirico, V., Luebke, A. M., Höflmayer, D., Hinsch, A., Jacobsen, F., Göbel, C., Weidemann, S., Fraune, C., Möller-Koop, C., Hube-Magg, C., Clauditz, T. S., Simon, R., Sauter, G., Wilczak, W., ... Marx, A. (2019). Prevalence of Syndecan-1 (CD138) Expression in Different Kinds of Human Tumors and Normal Tissues. *Disease Markers*, 2019, 4928315. <https://doi.org/10.1155/2019/4928315>
- Kliment, C. R., Englert, J. M., Gochuico, B. R., Yu, G., Kaminski, N., Rosas, I., & Oury, T. D. (2009). Oxidative Stress Alters Syndecan-1 Distribution in Lungs with Pulmonary Fibrosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(6), 3537–3545. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807001200>
- Kuempel, E. D., Jaurand, M.-C., Møller, P., Morimoto, Y., Kobayashi, N., Pinkerton, K. E., Sargent, L. M., Vermeulen, R. C. H., Fubini, B., & Kane, A. B. (2017). Evaluating the mechanistic evidence and key data gaps in assessing the potential carcinogenicity of carbon nanotubes and nanofibers in humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 47(1), 1–58. <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1206061>
- Lanone, S., Andujar, P., Kermanizadeh, A., & Boczkowski, J. (2013). Determinants of carbon nanotube toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(15), 2063–2069. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.019>
- Législation amiante en Belgique. (n.d.). *INVENTAIRE AMIANTE - ASBESTE*. Retrieved 25 May 2023, from <https://asbestosconsulting.be/legislation/>
- Linnerth, N. M., Sirbovan, K., & Moorehead, R. A. (2005). Use of a transgenic mouse model to identify markers of human lung tumors. *International Journal of Cancer*, 114(6), 977–982. <https://doi.org/10.1002/ijc.20814>
- Ma, R.-Y., Black, A., & Qian, B.-Z. (2022). Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends in Immunology*, 43(7), 546–563. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.04.008>
- Madeddu, C., Donisi, C., Liscia, N., Lai, E., Scartozzi, M., & Macciò, A. (2022). EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer and Resistance to Immunotherapy: Role of the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6489. <https://doi.org/10.3390/ijms23126489>

- Møller, P., Christophersen, D. V., Jensen, D. M., Kermanizadeh, A., Roursgaard, M., Jacobsen, N. R., Hemmingsen, J. G., Danielsen, P. H., Cao, Y., Jantzen, K., Klingberg, H., Hersoug, L.-G., & Loft, S. (2014). Role of oxidative stress in carbon nanotube-generated health effects. *Archives of Toxicology*, *88*(11), 1939–1964. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1356-x>
- Møller, P., Wils, R. S., Di Ianni, E., Gutierrez, C. A. T., Roursgaard, M., & Jacobsen, N. R. (2021). Genotoxicity of multi-walled carbon nanotube reference materials in mammalian cells and animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *788*, 108393. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108393>
- Myers, D. J., & Wallen, J. M. (2022). Lung Adenocarcinoma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578/>
- Negri, V., Pacheco-Torres, J., Calle, D., & López-Larrubia, P. (2020). Carbon Nanotubes in Biomedicine. *Topics in Current Chemistry*, *378*(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0278-8>
- Orsi, M. (2021). *Characterization of a new intermediate macrophage subpopulation: SDC-1 positive SPM-like macrophages possess immunosuppressive functions in early mesotheliomagenic responses to carbon nanotubes* [Université Catholique de Louvain]. <http://oatd.org/oatd/record?record=handle%5C%3A2078.1%5C%2F244521>
- Orsi, M., Palmi-Pallag, M., Yakoub, Y., Ibouaaden, S., De Beukelaer, M., Bouzin, C., Bearzatto, B., Ambroise, J., Gala, J.-L., Brusa, D., Lison, D., & Huaux, F. (2021). Monocytic Ontogeny of Regenerated Macrophages Characterizes the Mesotheliomagenic Responses to Carbon Nanotubes. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.666107>
- Palaiologou, M., Delladetsima, I., & Tiniakos, D. (2014). CD138 (syndecan-1) expression in health and disease. *Histology and Histopathology*, *29*, 177–189. <https://doi.org/10.14670/HH-29.177>
- Parimon, T., Brauer, R., Schlesinger, S. Y., Xie, T., Jiang, D., Ge, L., Huang, Y., Birkland, T. P., Parks, W. C., Habel, D. M., Hogaboam, C. M., Gharib, S. A., Deng, N., Liu, Z., & Chen, P. (2018). Syndecan-1 Controls Lung Tumorigenesis by Regulating miRNAs Packaged in Exosomes. *The American Journal of Pathology*, *188*(4), 1094–1103. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.12.009>

- Quoidbach, A. (2022). *Développement d'un modèle de cancer pulmonaire induit par des nanotubes de carbone* [UCLouvain]. <http://hdl.handle.net/2078.1/thesis:35709>
- Sargent, L. M., Porter, D. W., Staska, L. M., Hubbs, A. F., Lowry, D. T., Battelli, L., Siegrist, K. J., Kashon, M. L., Mercer, R. R., Bauer, A. K., Chen, B. T., Salisbury, J. L., Frazer, D., McKinney, W., Andrew, M., Tsuruoka, S., Endo, M., Fluharty, K. L., Castranova, V., & Reynolds, S. H. (2014). Promotion of lung adenocarcinoma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Particle and Fibre Toxicology*, *11*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-3>
- Seguin, L., Durandy, M., & Feral, C. C. (2022). Lung Adenocarcinoma Tumor Origin: A Guide for Personalized Medicine. *Cancers*, *14*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/cancers14071759>
- Sheikhpour, M., Naghinejad, M., Kasaeian, A., Lohrasbi, A., Shahraeini, S. S., & Zomorodbakhsh, S. (2020). The Applications of Carbon Nanotubes in the Diagnosis and Treatment of Lung Cancer: A Critical Review. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 7063–7078. <https://doi.org/10.2147/IJN.S263238>
- Spella, M., & Stathopoulos, G. T. (2021). Immune Resistance in Lung Adenocarcinoma. *Cancers*, *13*(3), 384. <https://doi.org/10.3390/cancers13030384>
- Stayner, L., Welch, L. S., & Lemen, R. (2013). The worldwide pandemic of asbestos-related diseases. *Annual Review of Public Health*, *34*, 205–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031811-124704>
- Succony, L., Rassl, D., Barker, A., McCaughan, F., & Rintoul, R. (2021). Adenocarcinoma spectrum lesions of the lung: Detection, pathology and treatment strategies. *Cancer Treatment Reviews*, *99*, 102237. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102237>
- Svadlakova, T., Holmannova, D., Kolackova, M., Malkova, A., Krejsek, J., & Fiala, Z. (2022). Immunotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials, Starring Phagocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(16), 8889. <https://doi.org/10.3390/ijms23168889>

- Teixeira, F. C. O. B., & Götte, M. (2020). Involvement of Syndecan-1 and Heparanase in Cancer and Inflammation. In I. Vlodavsky, R. D. Sanderson, & N. Ilan (Eds.), *Heparanase: From Basic Research to Clinical Applications* (pp. 97–135). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34521-1_4
- Teng, Y. H.-F., Aquino, R. S., & Park, P. W. (2012). Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, 31(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.10.001>
- Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *The Lancet*, 398(10299), 535–554. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3)
- Thomas, D. H., Attanoos, R. L., & Gibbs, A. R. (2004). Coexistent atypical adenomatous hyperplasia, primary lung adenocarcinoma and pleural mesothelioma in an asbestos-exposed subject. *Histopathology*, 45(5), 540–542. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01939.x>
- Trovato, M. C., Andronico, D., Sciacchitano, S., Ruggeri, R. M., Picerno, I., Pietro, A. D., & Visalli, G. (2018). Nanostructures: Between natural environment and medical practice. *Reviews on Environmental Health*, 33(3), 295–307. <https://doi.org/10.1515/reveh-2017-0036>
- Vietti, G., Lison, D., & van den Brule, S. (2016). Mechanisms of lung fibrosis induced by carbon nanotubes: Towards an Adverse Outcome Pathway (AOP). *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0123-y>
- Xiao, J., Angsana, J., Wen, J., Smith, S. V., Park, P. W., Ford, M. L., Haller, C. A., & Chaikof, E. L. (2012). Syndecan-1 Displays a Protective Role in Aortic Aneurysm Formation by Modulating T Cell-Mediated Responses. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(2), 386–396. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.242198>

Le rôle de Syndécan-1 dans le cancer pulmonaire induit par des fibres : une approche en images qualitatives

L'adénocarcinome pulmonaire est une tumeur maligne qui trouve son origine dans les alvéoles pulmonaires. Les causes principales menant au développement de ce cancer sont la fumée de cigarettes et l'exposition à des fibres toxiques telles que l'amiante et les nanotubes de carbone (CNT). Par certaines propriétés physico-chimiques, les CNT montrent des similarités avec les fibres d'asbeste. Ainsi, il a été découvert que certains types de CNT sont toxiques, comme les MWCNT-7 classifiés depuis 2015 par l'IARC de cancérogènes potentiels chez l'homme. Une association entre le développement de l'adénocarcinome pulmonaire et les CNT a été établie dans des modèles murins, mais les mécanismes spécifiques ne sont encore que peu connus.

Outre l'adénocarcinome pulmonaire, les CNT induisent également le mésothéliome pleural malin dont le modèle expérimental est semblable. Récemment, un nouveau type de macrophages a été découvert par notre laboratoire durant le stade précoce du développement du mésothéliome: les *Small Peritoneal Macrophages* (SPM) *immunosuppresseurs*, qui favorisent le développement d'un microenvironnement immunosuppresseur précoce et qui surexpriment notamment spécifiquement le protéoglycan Syndécan-1.

L'objectif de ce projet de recherche est de déterminer si des macrophages pulmonaires lors du développement de l'adénocarcinome pulmonaire expriment également Syndécan-1. Par ailleurs, la relation entre d'un côté la quantité de Syndécan-1 et de l'autre les différents stades de l'adénocarcinome pulmonaire ou l'instillation de CNT est analysée. Afin de répondre à ces objectifs, un protocole de colocalisation des macrophages pulmonaires et de Syndécan-1 a été mis au point par immunohistochimie (IHC) et des analyses de quantification de Syndécan-1 soluble ont été réalisées par ELISA, tous les deux à l'aide d'un modèle d'adénocarcinome pulmonaire murin induit par des CNT développé l'année passée dans notre laboratoire (LTAP, UCLouvain).

Selon nos résultats, les macrophages pulmonaires n'expriment pas le Syndécan-1, excepté dans une zone intra-tumorale particulière du dernier stade de l'adénocarcinome pulmonaire. Finalement, nos résultats indiquent que les CNT influencent la quantité de Syndécan-1 dans le plasma et que le stade pré-cancéreux de l'adénocarcinome pulmonaire est corrélé positivement à la présence du protéoglycan dans le plasma également.