

UNIVERSITE PARIS XI

**BIOLOGIE ET THERAPEUTIQUES INNOVANTES DES
GRANDES FONCTIONS**



Spécialité M2 IMMUNOLOGIE
PROMOTION 2005/2006



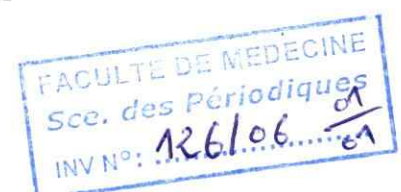
Mémoire présenté par
Nadir BENSLIMANE

Titre

**GILZ et micro-environnement tumoral dans les tumeurs
épithéliales de l'ovaire**

Responsable de recherche : Madame le Docteur V. MACHELON

INSERM U 764 –
32 rue des carnets – 92140 CLAMART



SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
INTRODUCTION	4
MATERIEL ET METHODES.....	
1. Culture cellulaire.....	
2. Transfection <i>SiRNA GILZ</i>	
3. Extraction des ANR totaux.....	
4. Reverse transcriptase.....	
5. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	
6. PCR Quantitative	
7. Cytométrie en flux	
8. Mise en évidence des protéines par Western-Blot	
9. Immunohistochimie.....	
RESULTATS.....	
Première partie : Etude par immunohistochimie de l'expression de GILZ, CX3CL1, CXCL12 dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire	
1. Expression de GILZ dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire.....	
2. Expression de la chimiokine CXCL12 dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire	
3. Expression de la chimiokine CX3CL1 dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire.....	
4. Corrélation entre l'expression des chimiokines CXCL12 et de CX3CL1	
5. Corrélation entre l'expression des chimiokines CXCL12 et de CX3CL1 et GILZ....	
Deuxième partie : Contrôle de la production des chimiokines CXCL12 et CX3CL1 par GILZ.....	
1. Expression de GILZ dans la lignée cellulaire SKOV-3.....	
2. Inhibition de GILZ dans la lignée SKOV-3 par un <i>SiRNA GILZ</i>	
3. Conséquences de la diminution de l'expression de GILZ dans les cellules SKOV-3 sur la production de CXCL12 et CX3CL1 (transcrits et protéines).....	
DISCUSSIONS & CONCLUSIONS.....	
PERSPECTIVES.....	
ANNEXES.....	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	

Résumé

Les tumeurs épithéliales de l'ovaire sont en France la 6^{ème} cause de mortalité par cancer chez la femme. Dans ce travail nous avons cherché à définir le rôle du glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ), un facteur connu pour induire la tolérance immunitaire, dans le contrôle du micro-environnement tumoral dans les tumeurs ovariennes. Les chimiokines produites localement par les cellules tumorales sont une composante essentielle du micro-environnement tumoral, comme cela est maintenant bien établi pour CXCL12. Nous avons montré pour la première fois que la production de CXCL12 est fortement associée à la production de CX3CL1 dans les cellules tumorales des tumeurs ovariennes. Cette production a été mise en évidence *in situ* par immunohistochimie sur des échantillons d'adénocarcinomes ovariens provenant de l'hôpital Antoine Bécclère. Les patientes incluses dans cette étude ont été opérées entre novembre 2004 et avril 2006 dans le service de gynécologie de l'hôpital Antoine Bécclère à Clamart. Elles présentaient une tumeur de l'ovaire nécessitant une exérèse chirurgicale. Les volumes tissulaires ont été pris sur les pièces opératoires après examen par le service d'anatomie-pathologie. En revanche l'expression de GILZ dans les cellules tumorales inhibe la production par les cellules tumorales de CX3CL1 et CXCL12. Ces résultats obtenus par immunohistochimie sur une vingtaine d'échantillons de tumeurs inclus en paraffine ont été confirmés par une étude *in vitro* utilisant la lignée tumorale SKOV-3. Les cellules SKOV-3 expriment GILZ. La transfection de siRNA GILZ éteint l'expression de GILZ, et en parallèle augmente fortement la production de CX3CL1 et CXCL12. Ces résultats montrent que GILZ est un facteur essentiel de la régulation de la production de CXCL12 et CX3CL1 dans les tumeurs ovariennes. Il est aussi intéressant de noter que la plupart des tumeurs de grade I bien différenciées morphologiquement produisent les deux chimiokines tandis que les tumeurs de grade III indifférenciées ne les produisent généralement pas. De la même façon la plupart des tumeurs GILZ+ sont des tumeurs de grade III. Si de nombreuses données récentes indiquent que la chimiokine CXCL12 contribue à réduire la réponse anti-tumorale, on ne dispose pour l'instant d'aucune donnée concernant le rôle de la chimiokine CX3CL1 dans les tumeurs ovariennes. Dans la suite de ce travail nous déterminerons si la chimiokine CX3CL1 en association avec CXCL12, a un rôle actif sur le recrutement de cellules immunitaires (cytotoxiques ou au contraire inductrices de tolérance immunitaire) et le contrôle de la réponse anti-tumorale.