

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PARIS-DIDEROT

Spécialité

Oncogénèse

Ecole doctorale Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (ED 561)

Présentée par

Brice MALGRAS

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS-DIDEROT

Facteurs mécaniques de la dissémination tumorale

Soutenue le 16 Décembre 2019 devant le jury composé de

Professeur Alain SAUVANET, Hôpital Beaujon, AP-HP
Professeur Marc POCARD, Hôpital Lariboisière, AP-HP
Professeur Jean-Marc REGIMBEAU, CHU Amiens-Picardie
Docteur Clarisse EVENO, CHU Lille (C. Huriez)
Professeur Jean-Philippe AVARO, HIA Sainte Anne
Docteur Florence GAZEAU, laboratoire MSC CNRS

Président du jury
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENTS

-**Au Professeur Marc POCARD** : un grand merci pour m'avoir confié ce travail, et pour tout ce que vous avez et faites encore pour moi ; je ne vous en serai jamais assez reconnaissant.

-**Au Professeur Alain SAUVANET** : votre présence dans le jury nous honore, merci encore pour vos enseignements et la bonne humeur qui les accompagne.

-**Au Professeur Jean-Marc REGIMBEAU** : un grand merci d'avoir pris du temps pour juger ce travail et vos conseils avisés.

-**Au Professeur Jean-Philippe AVARO** : merci d'avoir accepté de juger ce travail, cela me tenait à cœur qu'un militaire aussi participe à ce jury.

-**Au Docteur Clarisse EVENO** : merci de juger ce travail depuis le début et pour tous ces bons moments passés à Lariboisière.

-**Au Docteur Florence GAZEAU** : merci d'avoir participé au comité de suivi de thèse et d'apporter votre expertise dans ce domaine que vous connaissez bien.

-A ma famille, mes amis et mes collègues

Table des matières

1. Introduction.....	4
2. Matériel et méthodes	21
2.1. 1^{ère} série d'expériences.....	21
2.1.1. Expérimentations in vitro	22
2.1.2. Expérimentations in vivo.....	25
2.1.3. RESULTATS	47
2.1.4. Conclusion de la 1 ^{ère} série d'expériences	64
2.2. 2^{ème} série d'expériences.....	65
2.2.1. Culture cellulaire	65
2.2.2. Marquage magnétique des cellules.....	66
2.2.3. Magnétophorèse et quantité de fer internalisée	67
2.2.4. Test de viabilité cellulaire	68
2.2.5. Moulage magnétique des sphéroïdes de cellules CT 26	69
2.2.6. Autre méthode de formation des sphéroïdes : goutte pendante	72
2.2.7. Dernière méthode de formation des sphéroïdes par pointe magnétique	74
2.2.8. Compression magnétique des sphéroïdes marqués.....	75
2.2.9. Etablissement de la durée de compression pour les expérimentations	77
2.2.10. Mesure de l'effet de la compression grâce au test bleu alamar avec les différentes méthodes de formation des agrégats.....	82
2.2.11. Test de prolifération cellulaire avec le Ki67	88
2.2.12. Localisation des noyaux Ki67 +	92
2.2.13. Cryosection et immunofluorescence	100
2.2.14. Analyse microscopique et des images.....	101
2.2.15. Expérimentations in vivo.....	102
2.2.16. Résultats	103
2.2.17. Expérimentations in-vivo : injections intrapéritonéales de sphéroïdes magnétiques.....	115
2.2.18. Conclusions 2 ^{ème} série d'expériences	121
2.3. 3^{ème} série d'expériences.....	122
2.3.1. Injections intra-spléniques + laparotomie.....	122
2.3.2. Injection intra-spléniques + aimant sous cutané.....	126
2.3.3. Conclusions 3 ^{ème} série d'expériences.....	128
3. Discussion	129
4. Conclusions.....	137
5. Perspectives	138
6. Références.....	139
7. Annexes	151

1. Introduction

Une tumeur maligne est une grosseur liée à une accumulation de cellules anormales qui va avoir tendance à grossir et envahir les tissus avoisinants, mais aussi à migrer vers d'autres organes à distance sous forme de métastases.

Les tumeurs ne se développent pas de façon isolée mais ont besoin systématiquement de leur microenvironnement avec lequel elles sont en constante interaction biochimique. Mais à la différence d'un tissu normal où le dialogue entre les cellules et leur microenvironnement a pour but de maintenir une homéostasie, dans un tissu tumoral les cellules ont acquis via des altérations génétiques un phénotype les rendant agressives vis à vis de leur microenvironnement. Elles remodelent ainsi leur stroma afin de le rendre permissif, d'en obtenir le soutien nécessaire pour grossir localement et envoyer à distance des cellules tumorales qui vont pouvoir donner secondairement des métastases.

C'est d'ailleurs à la base de la théorie de Stephen Paget expliquant le mode de dissémination métastatique des différentes tumeurs qui pour s'implanter dans un organe à distance ont besoin d'une adéquation entre la cellule tumorale (« seed ») et un microenvironnement ou stroma favorable (« soil »). En effet la dissémination métastatique ne se fait pas au hasard mais uniquement lorsqu'il existe une affinité entre la cellule tumorale et son microenvironnement. (1,2)

Il existe donc clairement un dialogue biochimique entre les cellules cancéreuses et leur stroma afin de permettre la croissance et la dissémination des tumeurs.

La croissance d'une tumeur entraîne une augmentation de son volume qui se fait donc aux dépens des tissus environnants au sein desquels elle se développe; ainsi la question est de savoir si dans ce processus de croissance tumorale il existe, en plus du dialogue

biochimique, des interactions mécaniques entre la tumeur et son environnement (ou la cellule tumorale et son microenvironnement) liées à cette compétition dans l'espace.

Ce dialogue mécanique est connu et intervient d'ailleurs déjà de façon physiologique dans le maintien de l'homéostasie des tissus. (3)

Par exemple le tube digestif est soumis de façon physiologique à des forces mécaniques macroscopiques (péristaltisme, contractions segmentaires) et microscopiques (mouvements et contractions des villosités intestinales) assurant le transit intestinal. (4–7)

Ces forces mécaniques peuvent être responsables de modifications épithéliales (comme la prolifération ou la migration cellulaire nécessaires à la cicatrisation) ou non épithéliales (cellules entérochromaffines, endothéliales, musculaires lisses, inflammatoires, nerveuses ou macrophages). (8–10)

En ce qui concerne les tumeurs, celles-ci sont également naturellement soumises à des forces mécaniques lors de leur développement car elles doivent se faire de la place au sein d'un environnement confiné représenté par les tissus sains environnants.

Certains auteurs ont d'ailleurs montré dans leurs expériences utilisant des modèles murins et humains que les tumeurs au cours de leur développement accumulaient une tension interne, un « stress » mécanique lié aux tissus environnants. En effet la section de tumeurs venant tout juste d'être réséquées, donc plus sous la contrainte mécanique des tissus avoisinants, montraient une relaxation de celles-ci, témoin d'une tension ou d'un « stress » interne emmagasiné lors de leur croissance. (11)

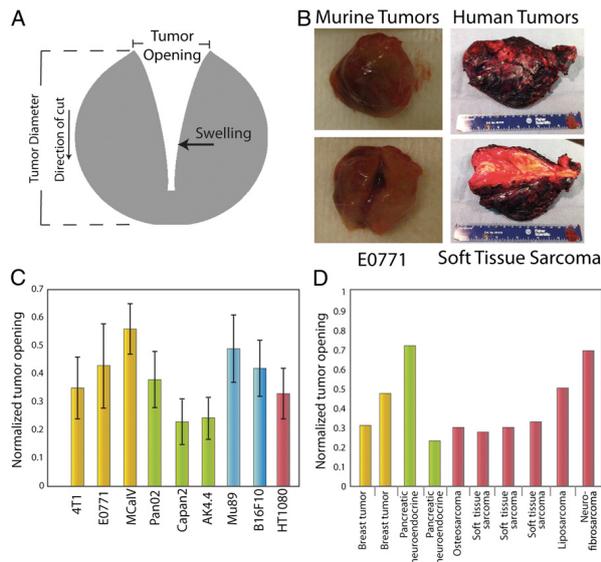


Figure 1.1. Relaxation de tumeurs excisées témoin d'un stress interne. (11)

Il existe 2 types de stress appliqués sur une tumeur en développement qui sont le stress dit « liquide » et le stress dit « solide ».

Le stress « liquide » est exercé par les différents fluides ou liquides et entraîne une augmentation de la pression interstitielle de façon isotropique au sein de la tumeur. Cette pression interstitielle est globalement uniforme au sein des tumeurs mais chute brutalement à leur périphérie créant un gradient de pression expliquant les échanges liquidiens entre la tumeur et son microenvironnement. (12,13)

Ceux-ci permettraient le transport de facteurs de croissance vers la tumeur nécessaire à sa croissance mais aussi, dans le sens inverse, à la dissémination de cellules tumorales vers des organes à distance via les vaisseaux sanguins et lymphatiques du stroma. Ces échanges de fluides se font majoritairement à la périphérie des tumeurs car au niveau de leur centre il existe une compression des vaisseaux sanguins et lymphatiques augmentant la pression interstitielle et réduisant les flux sanguins, ce qui entraîne une hypoxie favorisant la progression tumorale, l'immunosuppression, l'inflammation, la dissémination métastatique

par invasion et réduisant l'efficacité des différentes thérapeutiques (chimio-, radio- et immunothérapie). (14–22)

C'est pourquoi certaines chimiothérapies dites « anti-angiogéniques » s'attachent à normaliser les vaisseaux sanguins intra-tumoraux afin de diminuer la pression interstitielle et favoriser l'acheminement des drogues de chimiothérapie dans les tumeurs pour en améliorer l'efficacité. (23–25)

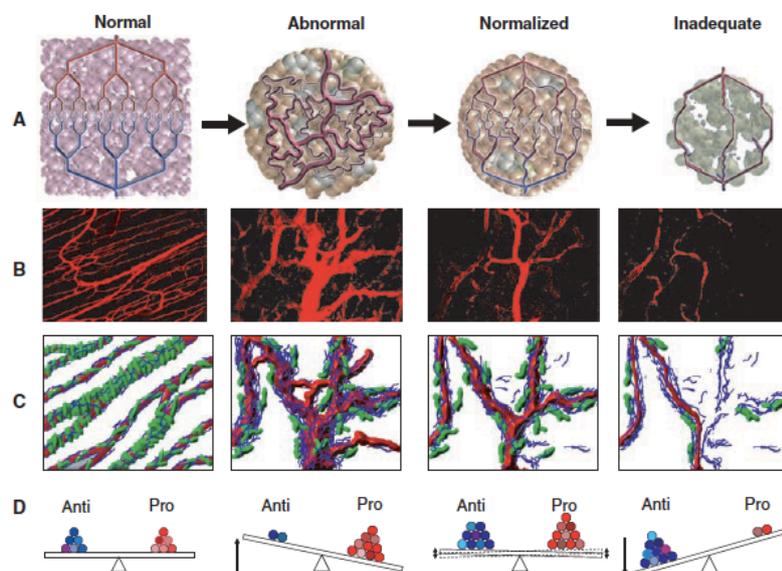


Figure 1.2. Normalisation des vaisseaux tumoraux avec anti-angiogéniques. (23)

Le stress « solide » est lié à la pression exercée par les tissus normaux avoisinants au cours du développement d'une tumeur. Une partie de ce stress solide est en lien direct avec les forces exercées sur la tumeur qui se développe au sein des tissus normaux avoisinants, mais une autre partie de ce stress solide est emmagasiné dans les cellules et la matrice extracellulaire de la tumeur et donc persiste mais après excision de celles-ci (supprimant ainsi les forces directes extérieures exercées par les tissus sains autour), c'est le stress dit « résiduel ». Il est responsable de la compression des vaisseaux sanguins et lymphatiques (structures les plus compliantes) amenant à l'hypoxie et à l'hyperpression interstitielle

favorisant la progression tumorale et la résistance aux différents traitement anti cancéreux comme évoqué auparavant.

La suppression des myofibroblastes, pour certains, diminuerait en partie ce stress résiduel supportant le fait qu'en plus du stress interne induit par le développement d'une tumeur au sein de tissus sains avoisinants se superposerait une contrainte exercée par les cellules activées du microenvironnement. (11)

La question est de savoir ainsi pourquoi une tumeur comprime ses vaisseaux sanguins et lymphatiques alors qu'elle en a besoin pour se développer ?

Peut-être parce qu'en faisant cela les tumeurs réduiraient l'accès aux cellules immunitaires, échappant ainsi à la réponse immunitaire de l'hôte; aussi cela sélectionnerait un phénotype de cellules cancéreuses plus agressives capables de survivre dans un environnement plus hostile. (26,27)

En effet même si encore quelques cellules immunitaires peuvent pénétrer la tumeur, les conditions d'hypoxie et d'acidité (secondaires à l'hypoperfusion particulièrement au centre de la tumeur) peuvent altérer leur potentiel de défense. (28)

L'hypoxie au centre de la tumeur a le potentiel de changer les macrophages résiduels dans la tumeur en cellules cancéreuses. Egalement, en réponse à l'hypoxie, il se produit une surexpression de facteurs de croissance (VEGF, TGF-béta) qui bloquent l'activité des macrophages et des lymphocytes et stoppent la maturation des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes. (29)

Enfin ces conditions d'hypoxie et d'acidité du stroma sélectionnent des cellules cancéreuses plus agressives résistantes à l'apoptose et à l'autophagie et ayant tendance à plus disséminer vers des organes distants. (30)

Ainsi il existe donc clairement en plus du dialogue biochimique entre les cellules et leur microenvironnement un dialogue mécanique ; la question subsidiaire est donc de savoir si dans un contexte tumoral ces forces mécaniques ont tendance à freiner l'évolution tumorale locale et générale ou au contraire à la favoriser ?

In vitro, certains ont montré que l'application d'une pression mécanique externe (à l'image d'un stress solide supplémentaire) sur des sphéroïdes tumoraux inhibait la croissance tumorale en diminuant la prolifération cellulaire et en augmentant l'apoptose. (31)

Mais pour d'autres ce stress mécanique pourrait augmenter l'invasion des cellules cancéreuses et donc favoriser la progression tumorale. (32)

D'ailleurs dans l'histoire au XVIIIème siècle la compression mécanique a été utilisée tout d'abord comme traitement des tumeurs avec des résultats contrastés et parfois opposés en fonction du type de tumeur et de compression. (33–37)

En effet la compression mécanique amplifie le phénomène qui se produit naturellement lors du développement tumoral en lien avec la pression effectuée par les tissus sains avoisinants. Il existe, comme nous l'avons évoqué précédemment, une compression des vaisseaux sanguins et lymphatiques réduisant l'apport d'oxygène aux cellules du centre de la tumeur entraînant une hypoxie et donc le déclenchement de l'apoptose. (38) Si la tumeur veut survivre et reprendre sa croissance elle doit donc activer, modifier son microenvironnement

afin de le rendre plus permissif. (39) Cela passe donc par la dégradation de la lame basale qui sépare la tumeur de son stroma autorisant ainsi un dialogue biochimique entre eux. Cela permet aussi le remodelage de la matrice extracellulaire avec le recrutement de macrophages, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et l'activation de fibroblastes. (40,41)

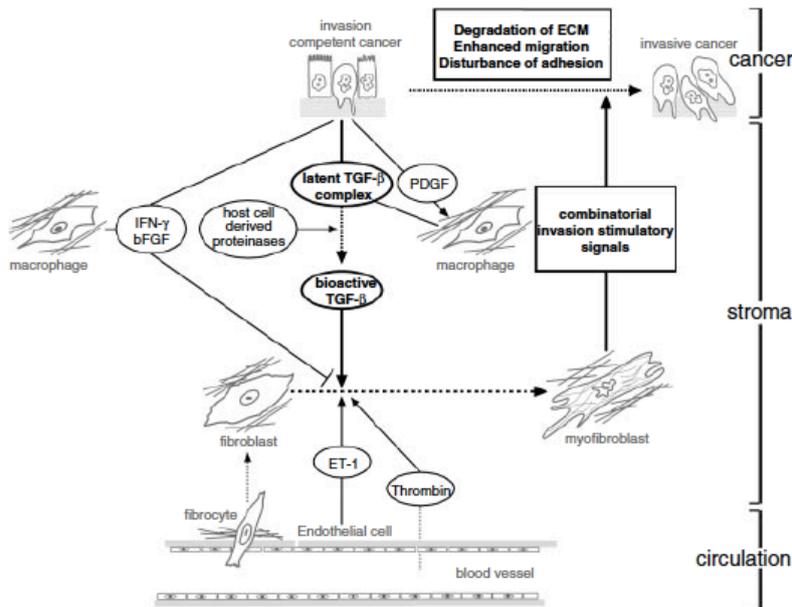


Figure 1.3. Dialogue moléculaire entre cellules cancéreuses et cellules du microenvironnement tumoral. (41)

Cette dégradation de la lame basale et la modification du stroma sont à l'origine du phénomène d'intravasation, préambule nécessaire à la dissémination métastatique par la migration de cellules tumorales dans la circulation sanguine grâce aux cellules du stroma modifié permettant la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales. (42,43) Une fois dans la circulation sanguine les cellules tumorales devront en sortir, et à nouveau activer le stroma d'organes à distance de la tumeur primitive selon un processus inverse de transition épithélio-mésenchymateuse pour s'y développer et donner naissance à des métastases. (44,45)

Il existe donc clairement en plus de l'altération génétique des cellules aboutissant à une hyperprolifération cellulaire et une modification du cycle cellulaire « physiologique » créant des tumeurs, une interaction biochimique mais aussi mécanique entre les cellules et leur stroma qui a un rôle dans l'évolution locale et générale des tumeurs.

Reste à savoir quel est le rôle précis de la contrainte mécanique sur le développement tumoral ?

Ainsi pour certains une contrainte mécanique pourrait être à l'origine de l'activation d'une voie de mécanotransduction (béta-caténine) aboutissant à la synthèse de gènes prolifératifs entraînant une hyperprolifération cellulaire et la formation de tumeurs. (46)

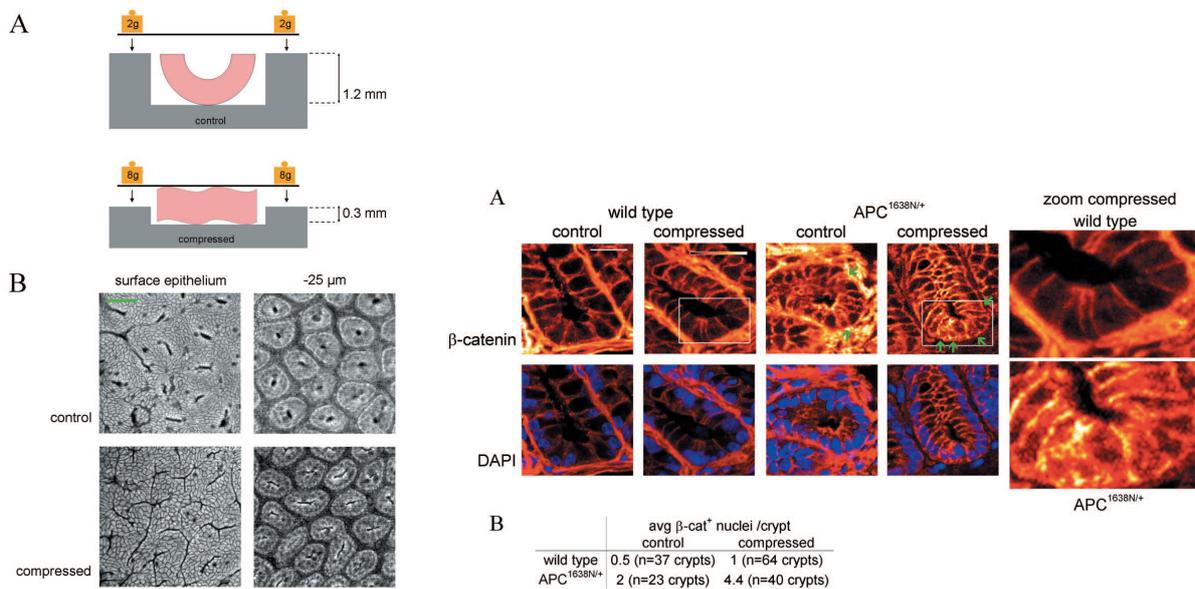


Figure 1.4. Activation d'une voie de mécanotransduction (béta-caténine) par compression mécanique de portions de côlons pré-cancéreux. (46)

En effet dans cette étude la compression mécanique de portions de colons de souris dans un état précancéreux entraînait une redistribution de la bêta-caténine vers le noyau des cellules et une surexpression des oncogènes Twist & et Myc supportant donc le fait que l'application d'une contrainte mécanique pouvait participer à l'initiation de la tumorigénèse, mais aussi lorsqu'une tumeur était formée à sa progression. (47,48)

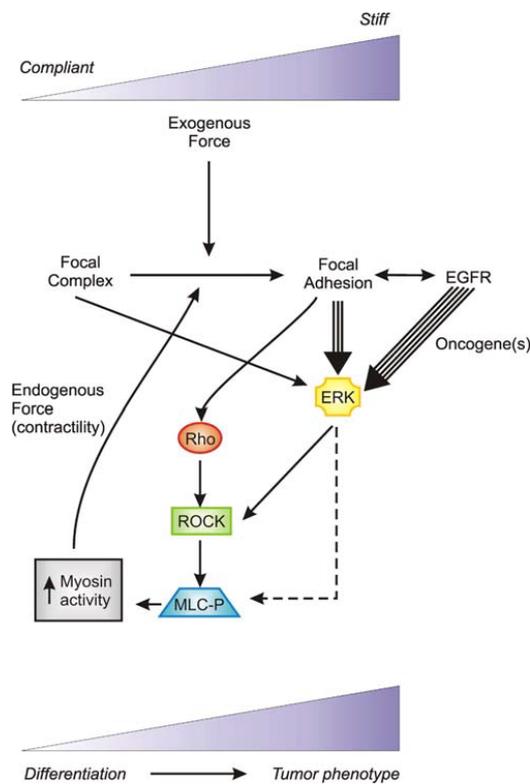


Figure 1.5. Modèle de transformation maligne selon la force. (48)

D'autres ont montré *in vitro* par contre que les contraintes mécaniques appliquées à un échelon cellulaire avaient tendance à diminuer la prolifération cellulaire en bloquant le cycle cellulaire (au point de restriction) par la surexpression de protéines inhibitrices de CDK. (49)

Aussi Jain et al. ont observé une réduction des taux de croissance de leurs agrégats en fonction de la rigidité du gel d'agarose dans lequel ils se développaient en attribuant cela à une baisse de la prolifération cellulaire et à une augmentation de l'apoptose. (50)

Enfin, certains ont montré *in vitro* sur des cellules de cancer du côlon une baisse de la prolifération cellulaire par dérégulation de la bêta-caténine et perte de l'expression de Myc en réponse à une pression mécanique ; cependant ces résultats étaient à nuancer car il s'agissait d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome de haut grade connue pour avoir une forte expression nucléaire de bêta-caténine. (51)

Sur ces premiers résultats de la littérature les effets d'une contrainte mécanique sur une cellule tumorale, une micro-tumeur (agrégats) voire un tissu précancéreux sont divergents avec pour certains une tendance à favoriser la progression tumorale (voire à l'initier) et pour d'autres au contraire un contrôle de celle-ci. Mais le processus tumoral est un phénomène complexe et les résultats peuvent donc être différents selon les mécanismes étudiés et le type de contrainte mécanique appliquée.

Ainsi d'autres ont mis en évidence des corrélations entre la dissémination métastatique et l'adhésion cellulaire. (52)

En effet la pression mécanique stimule, outre la prolifération cellulaire des cellules de cancer du côlon *in vitro*, l'adhésion des cellules cancéreuses. (53)

L'adhésion cellulaire représente une étape initiale importante dans le processus métastatique. Ainsi une proportion plus importante des capacités d'adhésion cellulaire ou de l'expression de récepteurs spécifiques de l'adhésion cellulaire comme les intégrines sont corrélées avec le pronostic et la dissémination métastatique de certains cancers. (54,55)

Les intégrines sont des protéines transmembranaires permettant l'adhésion des cellules à des protéines de la matrice extracellulaire. (56) Leur régulation est par certains aspects similaire à celle de la réponse aux stimuli mécaniques des cellules épithéliales bénignes de l'intestin par exemple (FAK, Src) avec une prévention par les manipulations pharmacologiques du cytosquelette jouant sûrement un rôle important dans ce phénomène (avec baisse de l'adhésion cellulaire en réponse à une pression mécanique augmentée). (57,58)

Ainsi des expériences in vivo dans des modèles murins ont montré que des cellules tumorales soumises à des pressions mécaniques avaient tendance à augmenter l'adhésion cellulaire particulièrement au niveau des cicatrices avec un impact pronostic négatif. (59,60) Cet effet était contrebalancé si un traitement agissant sur le cytosquelette (alpha actinin ou colchicine) était donné. (60,61)

D'autres expériences encore, en prenant comme modèle de tumeurs des sphéroïdes multicellulaires, ont montré que la compression des sphéroïdes (représentée par une contrainte mécano-osmotique appliquée par un milieu contenant du dextran) entraînait une réduction de leur taux de croissance due à une baisse de la prolifération cellulaire au sein du sphéroïde où la baisse de volume était la plus grande. (62,63)

Ils observaient également une répartition inhomogène de cette baisse de prolifération (mise en évidence par l'expression du Ki67) qui était plus importante au centre du sphéroïde là où la baisse du volume cellulaire était la plus importante, sans modification quantitative de l'apoptose. (64)

Il avait été également mis en évidence en parallèle une altération du cycle cellulaire avec blocage des cellules en fin de phase G1 témoignant d'une augmentation du nombre de cellules en quiescence.

Ces modifications observées étaient proportionnelles à l'intensité de la compression mais aussi réversibles à l'arrêt de la compression. (65)

La mise en compression des sphéroïdes multicellulaires a permis également de mettre en évidence des mouvements cellulaires au sein de ces sphéroïdes modulés par la division cellulaire et sensibles à la compression mécanique. Ces flux cellulaires pouvaient être convergents (dus à l'excès de division cellulaire à la périphérie du sphéroïde et de mort cellulaire au centre de celui-ci) ou divergents (se superposant au précédent lors de la croissance du sphéroïde).

Ainsi lorsque la contrainte mécanique augmente, la baisse de volume des cellules au centre du sphéroïde s'accompagne d'une diminution de la division cellulaire maximale au centre et diminuant peu à peu jusqu'au bord du sphéroïde créant un véritable front anti-prolifératif allant du centre de la tumeur vers la périphérie. Les cellules, en arrêtant de se diviser, ont une plus grande tendance à migrer vers le stroma par chimiotaxie et ce d'autant plus si une compression mécanique est présente. (66)

Cette contrainte mécanique a donc des répercussions différentes au sein des sphéroïdes mais aussi en fonction du temps d'application de celle-ci. En effet au début l'application d'une contrainte mécanique a pour effet de diminuer le taux de croissance des sphéroïdes avec

blochage du cycle cellulaire et entrée en quiescence des cellules sans modification de l'apoptose.

Il semble donc y avoir un contrôle du développement tumoral par limitation de sa croissance en bloquant la prolifération cellulaire. Mais au fur et à mesure de la durée de compression les cellules en quiescence vont évoluer vers l'apoptose particulièrement au centre des sphéroïdes. Il va donc se développer des flux cellulaires au sein du sphéroïde liés à la division cellulaire qui vont aboutir à un renouvellement continu des cellules en périphérie des sphéroïdes qui continuent à proliférer et secondairement à la pression liée à la division cellulaire vont avoir tendance à migrer hors du sphéroïde, alors que les cellules du centre disparaissent peu à peu par apoptose.

D'autre part au fur et à mesure du développement tumoral les cellules vont acquérir des mutations génétiques lui assurant de nouvelles propriétés (généralement plus invasives, agressives) comme celles de dégrader la lame basale, envahir le stroma (le rendant plus permissif) et migrer vers d'autres organes par intravasation.

Il semble donc qu'au cours du temps l'application d'une contrainte mécanique sélectionne des cellules avec un phénotype plus agressif capables de disséminer à distance et donner des métastases. (67)

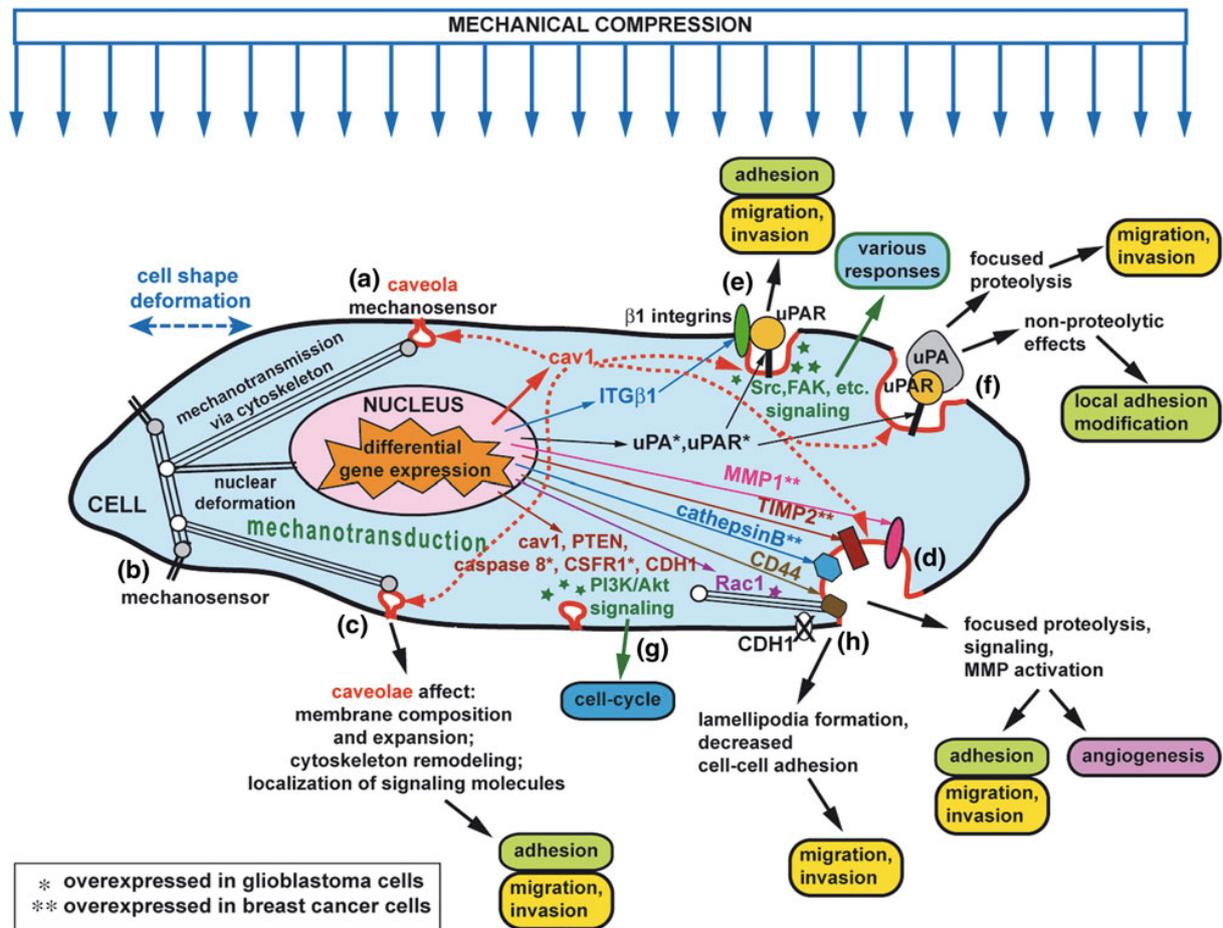


Figure 1.6. Modification du phénotype tumoral sous contrainte mécanique. (67)

Ces forces mécaniques exercées sur les tumeurs proviennent donc essentiellement du milieu environnant de la tumeur. La question que nous nous sommes posée était donc de savoir si ces forces mécaniques dites « physiologiques » pouvaient être modifiées par des agents extérieurs comme ceux en lien avec le traitement des tumeurs (endoprothèses digestives, chirurgie carcinologique, etc) et donc alors modifier leur comportement tumoral.

Ainsi il a été montré chez l'homme que la chirurgie carcinologique peut avoir dans certains cas un effet négatif sur l'évolution oncologique. (68)

Celui-ci peut être observé en per-opératoire (stress chirurgical, manipulations tumorales sources d'essaimage de cellules tumorales ou de relargage sanguin de cellules tumorales circulantes), mais aussi en post-opératoire (immunodépression, cicatrisation, complications chirurgicales). (69,70)

Des modèles animaux ont montré que plus le geste chirurgical était important et plus le risque de dissémination tumorale (local et à distance) était grand. (71–74) Dans ces modèles les facteurs de risque de dissémination tumorale étaient multiples (locaux, mais aussi généraux).

D'autres modèles animaux se sont plus spécifiquement focalisés sur la manipulation +/- traumatique de la tumeur primitive et ont montré que c'était aussi un facteur de dissémination tumorale (et pas uniquement par relargage de cellules tumorales circulantes ou essaimage de cellules tumorales). (75,76)

Chez l'homme l'impact de la manipulation tumorale a été étudié mais est toujours sujet à controverses quant à ses répercussions oncologiques. (77–79)

Ainsi au travers de ces différents exemples nous avons l'impression que l'application de contraintes chirurgicales (plutôt d'allure mécaniques) sur des cellules tumorales ou sur une tumeur pouvait favoriser la progression locale et la dissémination métastatique.

Mais l'impact spécifique du caractère mécanique de ces contraintes sur le pronostic oncologique n'était pas spécifiquement démontré dans ces modèles expérimentaux même s'il était suggéré.

Au travers de l'analyse des données de la littérature il existe clairement un retentissement des forces mécaniques sur le comportement cellulaire que ce soit au niveau physiologique ou pathologique.

Mais au niveau oncologique, le rôle de ces forces mécaniques apparaît plus flou, même si on a l'impression que l'application de contraintes mécaniques sur une cellule tumorale ou une tumeur a tendance à la rendre plus agressive localement et à distance.

Nous nous sommes donc attachés à rechercher une situation clinique pouvant répondre à cette problématique de force mécanique et dissémination tumorale et nous avons retenu celle de l'endoprothèse digestive.

Ainsi depuis les années 80, les endoprothèses (sortes de ressorts expansibles) ont été utilisées pour traiter les symptômes occlusifs (biliaires ou digestifs) liés à des tumeurs bilio-digestives. Leur efficacité clinique, mais aussi leurs effets oncologiques ont été sujets à de nombreuses controverses notamment pour les endoprothèses digestives. (80–84)

L'utilisation des endoprothèses digestives dans le traitement des cancers du côlon en occlusion a représenté à nos yeux un modèle certain de traumatisme mécanique sur une tumeur primitive du fait de la force nécessaire à ces dispositifs qui sont déployés au sein des tumeurs, les « écartant » afin de redonner un calibre normal à l'intestin pour recouvrer un transit intestinal.

N'ayant donc pas la preuve formelle dans les études cliniques et/ou expérimentales disponibles que les contraintes mécaniques appliquées sur une cellule tumorale ou une tumeur

peuvent altérer le pronostic oncologique, nous avons décidé de l'étudier au travers de plusieurs modèles expérimentaux.

Ainsi nous avons donc tout d'abord voulu étudier dans une première série d'expériences l'impact d'une force mécanique exercée sur une tumeur primitive en récréant la situation de l'endoprothèse digestive qui lève l'occlusion liée à une tumeur du côlon.

Nous avons donc mis en place un modèle murin de tumeur occlusive du côlon puis testé les répercussions de la mise en place d'une endoprothèse.

Dans une 2^{ème} série d'expériences nous avons voulu étudier cet impact mécanique plus au niveau cellulaire avec l'application de contraintes mécaniques sur les cellules tumorales utilisées dans notre premier modèle murin afin de voir si les résultats étaient concordants tant au niveau microscopique que macroscopique.

2. Matériel et méthodes

2.1. 1^{ère} série d'expériences

La première série d'expériences a consisté à mettre en place un modèle de tumeur occlusive du côlon chez la souris, puis de mettre en place une endoprothèse (ou stent) et d'évaluer ses effets sur le pronostic oncologique.

Schéma de l'étude

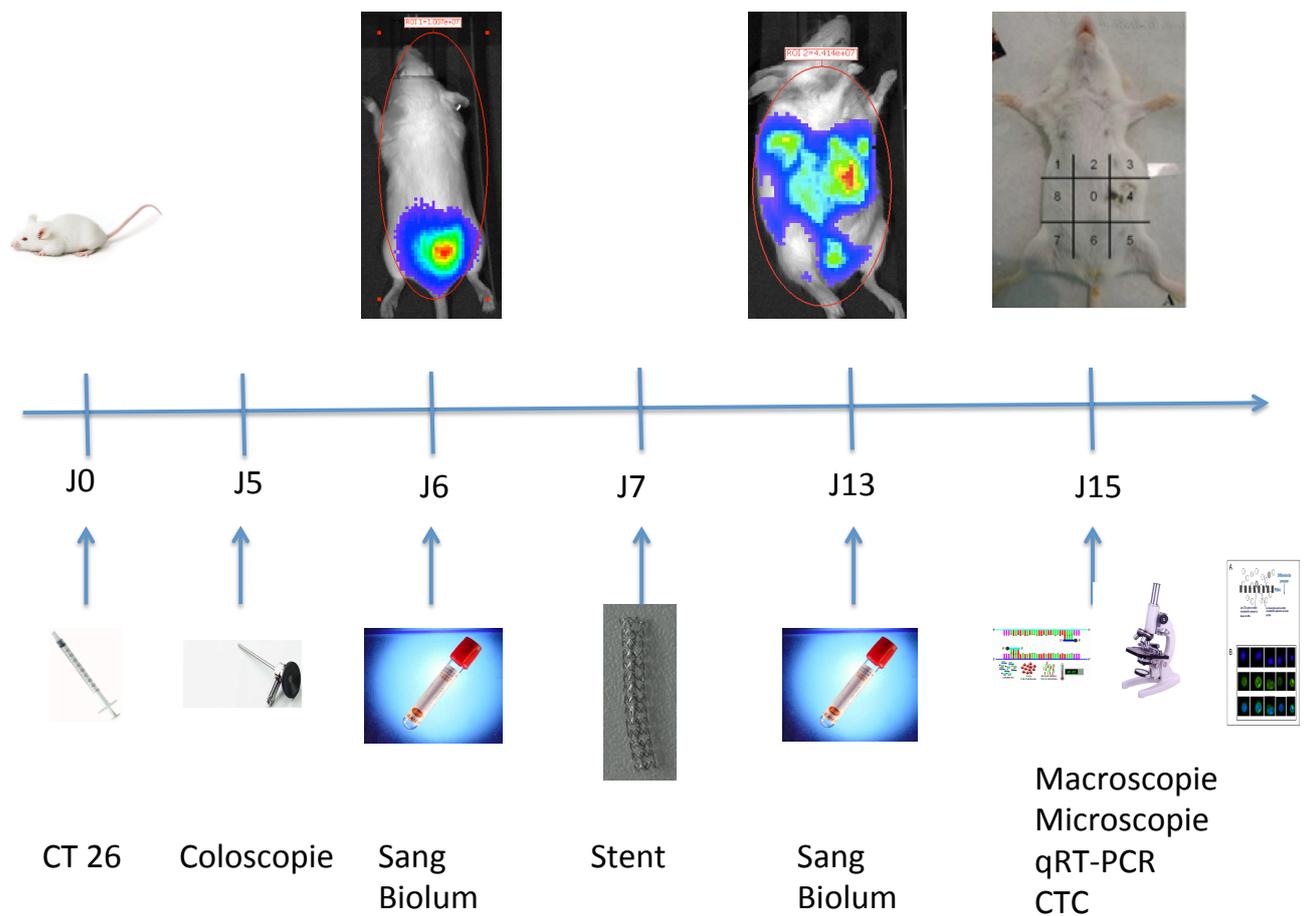


Figure 2.1. Schéma 1^{ère} série d'expérimentations.

2.1.1. Expérimentations in vitro

Préparation de la lignée cellulaire CT 26- GFP/ Luciférase

La lignée cellulaire CT-26 sauvage (CRL-2638; American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA) est issue d'un adénocarcinome colique de souris immunocompétentes BALB/C traitée par le N-nitroso-N-méthylurethane. Cette lignée cellulaire à fort potentiel métastatique est utilisée régulièrement dans le laboratoire. Il a été réalisé à partir d'une lignée classique CT 26 au passage P3 une infection par particules virales (GeneCopoeia™ LP-HLUC-LV201-0200) afin que les cellules expriment la GFP (protéine fluorescente verte) et la luciférase.

Mise en culture et passages

Les cellules initialement conservées dans un milieu de congélation (DMSO) ont été décongelées sous hôte puis lavées avec du milieu de culture DMEM + GlutaMAX (Gibco[®]) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) afin d'éliminer le DMSO pendant 24 heures. Les cellules étaient cultivées en monocouches dans des flasques, placées dans un incubateur à 37°C (10% CO₂ et 90% d'air) et à saturation en humidité. Le milieu était renouvelé tous les 3 jours et après 4 à 6 jours d'incubation les cellules étaient confluentes.

A confluence, les cellules étaient lavées une fois au PBS puis le milieu de culture était aspiré et les cellules placées au contact de 3 ml de trypsine (TrypLE™ Express, Gibco[®]) à 37°C pendant 5 minutes. La suspension cellulaire était ensuite remise en suspension dans 3 ml de milieu de culture afin d'arrêter l'action de digestion de la trypsine. En fonction de la

dilution voulue, un échantillon de suspension cellulaire allant de 100 μ l à 3ml était remis en suspension dans du milieu de culture.

Préparation de la solution cellulaire à injecter

Lorsque les cellules étaient arrivées à confluence, et après un minimum de 3 passages, elles étaient lavées puis dissociées par 2 ml de trypsine. Après avoir rajouté 8 ml de milieu de culture, la suspension cellulaire était recueillie dans un tube Falcon afin de procéder à leur comptage. Ainsi 10 μ l de cette suspension cellulaire étaient mélangés avec 10 μ l de bleu de trypan puis 10 μ l de ce mélange était déposé dans une des 2 chambres de la cassette (CountessTM) qui était alors introduite dans le compteur automatique de cellules et de viabilité cellulaire (invitrogenTM). Le nombre de cellules à injecter était de 10^5 dans 50 μ l, soit une solution avec une concentration cellulaire à 2×10^6 /ml. En fonction du nombre de cellules obtenu au comptage, la suspension cellulaire de 10 ml était centrifugée (1000 RPM, 3 minutes à 20°C) puis complétée avec du milieu de culture afin d'obtenir la concentration finale voulue. Les cellules étaient conservées dans de la glace avant leur injection.

Une première préparation cellulaire avait été réalisée au début du modèle mais arrêtée du fait du manque de résultats obtenus sur les premières injections in vivo. Il s'agissait de la réalisation de sphéroïdes contenant 2000 cellules regroupées dans des gouttes de 20 μ l gardées 3 jours en suspension dans du milieu de culture puis injectées dans une solution comprenant 10^5 cellules / 100 μ l et 100 μ l de matrigel.

Vérification de l'expression GFP et Luciférase des cellules

Le caractère GFP des cellules a été vérifié au microscope à fluorescence en examinant des flasques de cellules à confluence dont le milieu de culture était remplacé par du PBS. A peu près 90 % des cellules exprimaient bien la GFP cytoplasmique.

L'activité Luciférase a été évaluée en réalisant une plaque 24 puits comprenant 4 puits témoins et dans les autres puits des échantillons de 50000 cellules par puits avec 50 µl de luciférine à une concentration de 0,3 mg/ml puis passage au lumina 5 minutes après l'ajout de la luciférine.

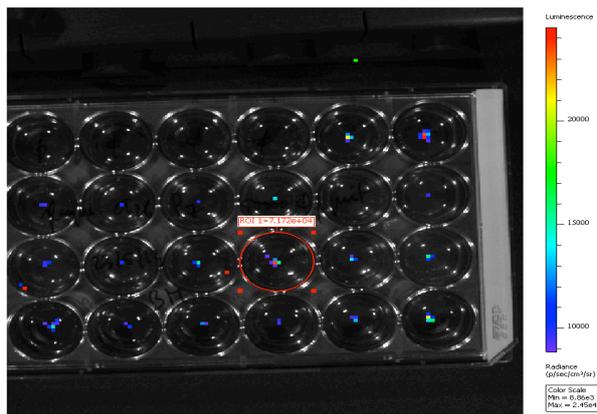


Figure 2.2. Activité luciférase des cellules GFP/Luc.

Devant la faible activité luciférase des cellules, d'autres cellules CT-26 Luciférase ont été utilisées ultérieurement.

Préparation de la lignée cellulaire CT 26 Luciférase

Cette lignée cellulaire CT-26 Luc nous a été fournie par le Professeur Lea Eisenbach (Weizmann Institute of Science Rehovot, Israël).

Les conditions de culture, de passage et d'injection étaient similaires aux cellules CT 26 GFP/Luc à par le milieu de culture qui était supplémenté en antibiotiques (1% Pénicilline et Streptomycine, PenStrep, Gibco^R).

L'activité luciférase a été testée de façon identique aux cellules CT 26 GFP/Luc.

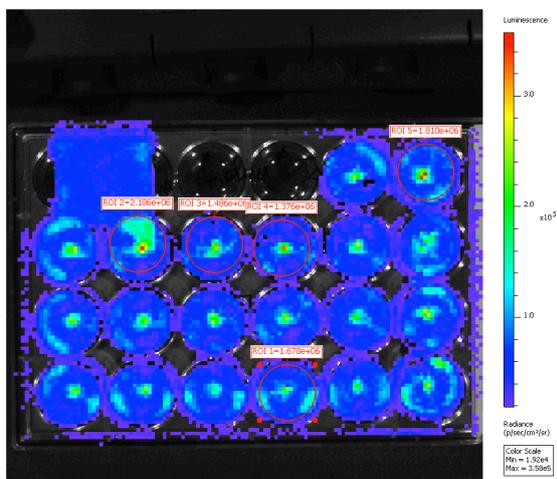


Figure 2.3. Activité luciférase des cellules Luc.

2.1.2. Expérimentations in vivo

Animaux utilisés

Toutes les expérimentations ont été réalisées selon le respect des règles éthiques en vigueur en Europe (décret n° 2001-131 du 6 février 2001, liées à la directive européenne 86-609-CEE de 1986) et à la charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale établie en 2008 (www.enseignementsup-recherche.gouv.fr).

Les animaux étaient des souris immunocompétentes BALB/C femelles âgées de 8 semaines d'origine contrôlée (laboratoires Charles River, BP 0109, 69592 L'Arbresie Cedex France). Elles étaient hébergées dans l'animalerie conventionnelle BDD, agréée sous le numéro C75-05-17, avec renouvellement de l'agrément le 27 novembre 2012 par arrêté préfectoral N° 2012-1397. Les animaux étaient acclimatés pendant 2 semaines avant toute expérimentation.

Anesthésie

L'induction de l'anesthésie était réalisée par une inhalation d'isoflurane (Baxter) à 4 % avec un débit d'air de 1,5 l / min. L'anesthésie était ensuite maintenue par une inhalation de 2 % d'isoflurane. L'efficacité de l'anesthésie était vérifiée avant le début de tout acte expérimental par un pincement interdigital de la patte arrière de la souris, et si elle tendait à se réveiller, la dose d'isoflurane était augmentée à 2,5 % pendant quelques minutes.

Coloscopie

L'exploration du côlon de la souris était réalisée par un endoscope haute résolution Storz rigide de 1,9 mm de diamètre et de 10 cm de long. Il fonctionne à l'aide d'une caméra et d'une source de lumière froide. Le tout est relié à un ordinateur permettant la visualisation et le traitement des images.

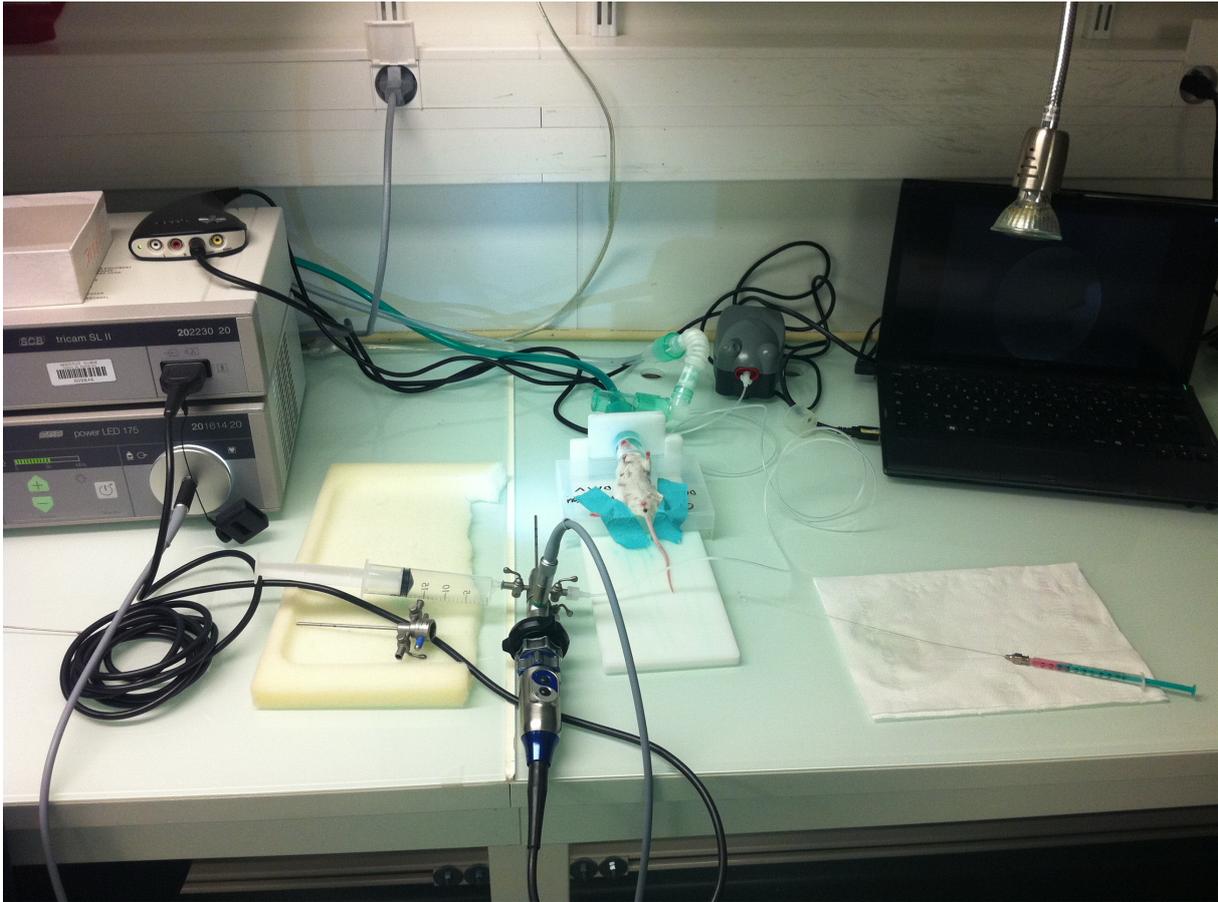


Figure 2.4. Paillasse d'expérimentation.

L'endoscope est introduit dans une chemise rigide adaptée avec deux entrées permettant l'insufflation d'air pour le diagnostic ou à trois entrées, ajoutant ainsi un canal opérateur autorisant l'introduction d'instruments.



Figure 2.5. Chemises de l'endoscope.

La bonne visualisation de la lumière colique impose son déplissement qui est réalisé à l'air soit à l'aide d'une seringue, soit grâce à une pompe à air branchée sur une entrée de la chemise de l'endoscope.

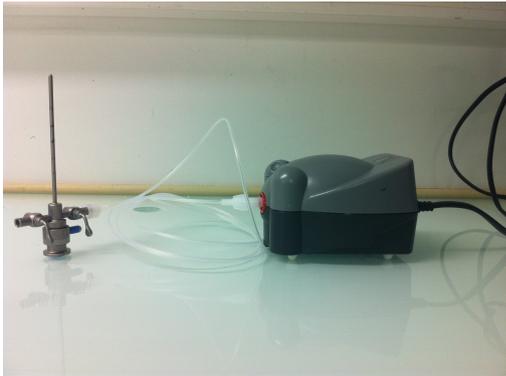


Figure 2.6. Insufflateur d'air branché sur la chemise de l'endoscope.

Les coloscopies étaient réalisées sous anesthésie générale, sans préparation colique préalable mais avec au besoin un lavement évacuateur à l'eau au moyen d'une petite seringue à gavage en cas de présence de matières fécales. La souris était maintenue en décubitus dorsal avec 2 rubans adhésifs afin de limiter ces mouvements pendant la coloscopie et permettre une progression de l'endoscope en toute sécurité, évitant ainsi les faux mouvements pourvoyeurs de perforations coliques.

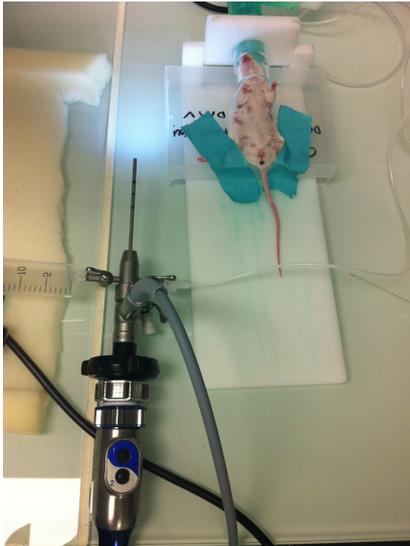


Figure 2.7. Positionnement des souris pour la coloscopie.

Injections orthotopiques

Le 2^{ème} modèle n'avait pas encore été testé au laboratoire mais décrit récemment par une équipe israélienne. (85) Celui-ci consistait à injecter 50 μ l d'une solution contenant 10^5 cellules dans la sous muqueuse du côlon, sous contrôle endoscopique, au moyen d'une seringue 30 gauges dont l'extrémité était biseautée à 45°.



Figure 2.8. Aiguille d'injection sous muqueuse.



Figure 2.9. Introduction de l'aiguille dans la sous-muqueuse du côlon de la souris.

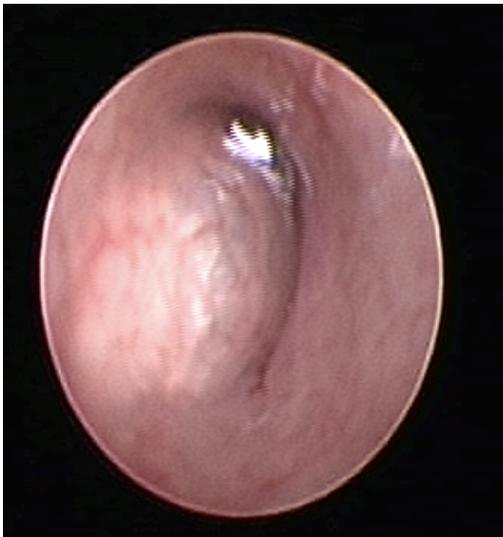


Figure 2.10. Aspect endoscopique après injection sous-muqueuse.

Mise en place du stent colique

Il s'agissait de stents cardiaques utilisés chez l'homme, car adaptés à la taille du côlon de la souris, qui ont été fournis gracieusement par les laboratoires Terumo^R et Abbot Vascular^R.

Leur déploiement nécessitait l'utilisation d'un dispositif de gonflage de type inflateur branché sur la partie proximale du stent, qui permettait de gonfler un ballonnet jusqu'à une

pression de 1000kPa entraînant par ce biais le déploiement du stent. Après dégonflage du ballonnet le guide était retiré et le stent largué avec sa forme définitive.



Figure 2.11. Système de déploiement du stent avec inflateur connecté au stent sur son guide.

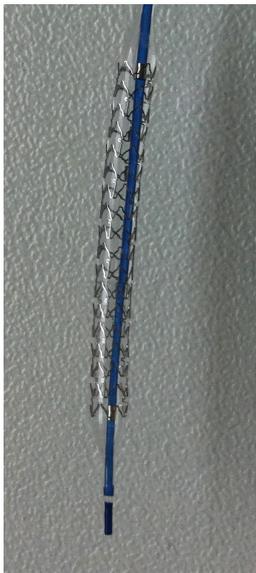


Figure 2.12. Stent déployé sur son guide



Figure 2.13. Aspect final après retrait du guide

Lorsque la tumeur était occlusive (c'est à dire occupant plus des 3 quarts de la lumière colique), celle-ci étant dépliée par inflation d'air, et un stent était mis en place.

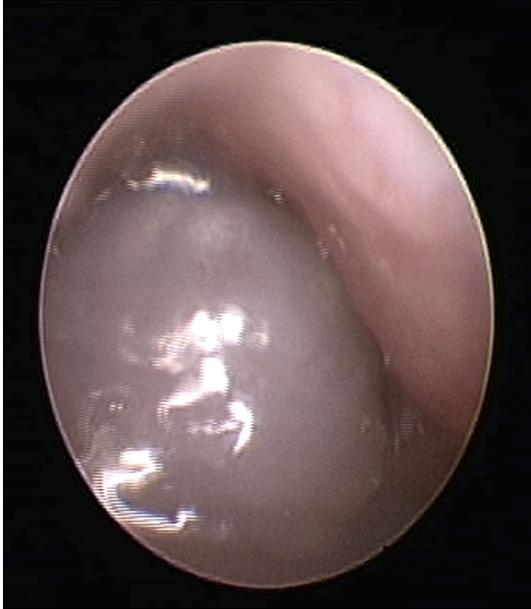


Figure 2.14. Aspect endoscopique d'une tumeur colique occlusive



Figure 2.15. Passage du guide avec le stent au-delà de la tumeur

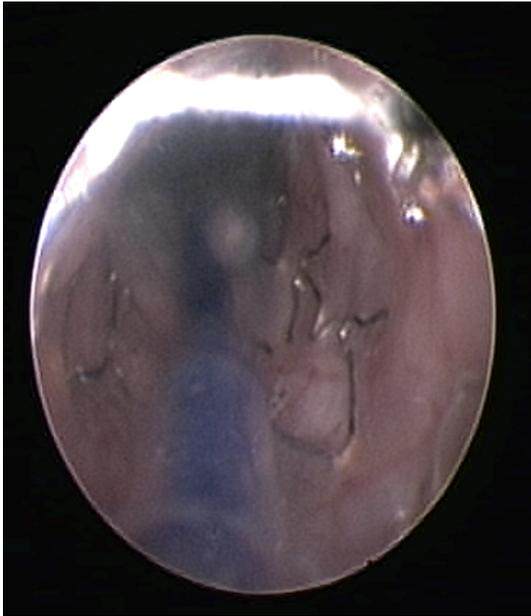


Figure 2.16. Gonflage du ballonnet et déploiement du stent.



Figure 2.17. Aspect endoscopique et macroscopique final du stent déployé après retrait du guide.

Bioluminescence

La bioluminescence est un moyen de suivre l'évolution tumorale de façon non invasive grâce à la mise en évidence des cellules bioluminescentes. L'activité bioluminescente in vivo des souris était évaluée par un appareil Ivis Lumina II et son logiciel d'analyse d'images Living Image.



Figure 2.18. Appareil Ivis Lumina II.

Une injection intra-péritonéale de 200 μ L de luciférine à la concentration de 10 ng/ml était réalisée puis après 2 minutes 30 les souris étaient placées dans la chambre d'anesthésie avant la mise en place dans le lumina. Les souris étaient placées 3 par 3 dans le lumina, séparés par des "lames plastiques", toujours sous anesthésie générale à l'isoflurane, et 5 minutes après l'injection de luciférine, 2 mesures étaient prises, la première avec la face dorsale vers le haut et la deuxième avec la face ventrale vers le haut. Les réglages du Lumina étaient constant (exposure=automatique, binning : medium (4x4), F/stop :1).

Afin de quantifier l'activité bioluminescente des souris, des régions d'intérêts étaient tracées (ROI) autour des images obtenues des animaux sur le software et une mesure des ROI a été réalisée en photons/seconde (p/s) grâce au logiciel de traitement d'image.

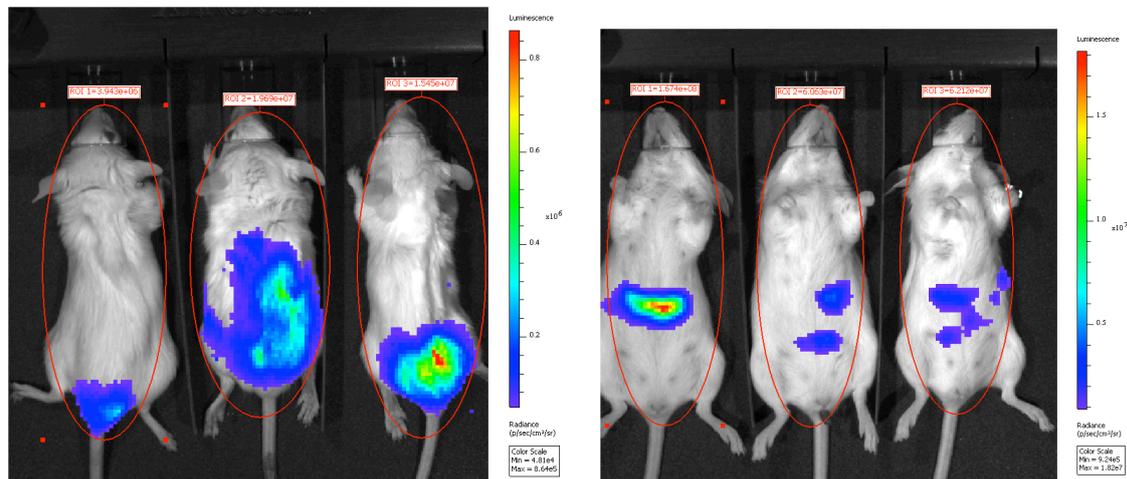


Figure 2.19. Exemples d'images de bioluminescence avec ROI (ellipse rouge).

Les analyses de bioluminescence ont été réalisées à 1 semaine d'intervalle à la fin de la 1^{ère} et de la 2^{ème} semaine afin de pouvoir comparer les valeurs de bioluminescence et de rechercher une progression de la maladie, et ce notamment avant et après la pose des stents coliques.

Prélèvements sanguins

Deux types de prélèvements sanguins étaient réalisés lors des expérimentations :

Prélèvements rétro-orbitaires

Ils ont été choisis pour réaliser les prélèvements de taux de LDH car ils fournissaient une quantité de sang suffisante et pouvaient être répétés dans le temps. Ils étaient réalisés sous

anesthésie générale à l'isoflurane 2 % avec une pipette pasteur introduite dans le sinus rétro-orbitaire. Une fois le prélèvement effectué par capillarité, une fermeture de la paupière avec une légère compression était réalisée. Le sang était ensuite soufflé dans un ependorf de 0,5 ml avec 200 µL d'héparine et conservé dans la glace. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 12000 x g, pendant 5 min à 4°C puis le sérum était récupéré (surnageant) et conservé à -80°C.

Le taux de LDH sérique a été dosé sur un automate Architect C8000 Abbott avec un réactif de souris 2P56-21 (valeur normale de LDH sérique chez la souris de 134 +/- 19 UI/l).

Les prélèvements étaient réalisés chacun 2 fois, à une semaine d'intervalle, de façon concomitante aux analyses de bioluminescence afin de pouvoir avoir une cinétique et de comparer ces valeurs avant et après la mise en place des stents.

Ponction sanguine intracardiaque

Juste avant le sacrifice et sous anesthésie générale était réalisée une ponction sanguine intracardiaque au moyen d'une seringue de 1 ml et un cathlon de 25 gauges en sous xiphoidien. Le prélèvement était ensuite mis dans un tube EDTA et conservé à air ambiant.

Sacrifice des souris

Le sacrifice des animaux était décidé devant :

- des signes extérieurs de souffrance (amaigrissement, poil ébouriffé, pâleur cutanée, cyanose extrémité/queue, tremblements)
- des signes de prostration.

-une augmentation du périmètre abdominal témoin d'une occlusion intestinale ou d'une carcinose péritonéale évoluée.

Le sacrifice était réalisé par dislocation cervicale puis une laparotomie était réalisée avec de manière systématique :

1. Prélèvement d'un fragment de lobe gauche hépatique sain pour analyse moléculaire (qRT-PCR) donc tout de suite plongé dans de l'azote liquide puis conservé à -80°C .

2. Prélèvement d'un autre fragment hépatique pour examen anatomopathologique et +/- immunohistochimie.

3. Caractérisation de la carcinose péritonéale (CP), si présente, avec un index de carcinose adapté à la souris (score de Sugarbaker, PCI ou IPC); la carcinose péritonéale était classée en carcinose péritonéale limitée en cas d'indice PCI ≤ 20 et en carcinose péritonéale importante en cas d'indice PCI ≥ 20 .

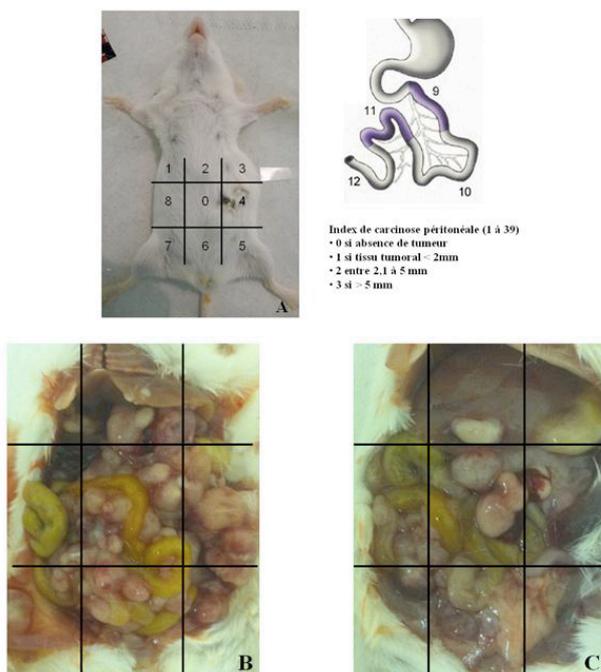


Figure 2.20. Index de carcinose péritonéale adapté à la souris.

4. Recherche de métastases hépatiques, pulmonaires, rétro péritonéales qui si elles étaient présentes, étaient prélevées pour examen anatomopathologique.

5. Mesure du volume de la tumeur primitive (grand axe X petit axe²) / 6, recherche d'une perforation / d'une occlusion, et vérification du stent.

Réalisation de qRT-PCR sur les foies de souris

La qRT-PCR a été réalisée afin de voir si dans des zones macroscopiquement saines de foie il y avait plus de cellules tumorales (marquées à la protéine GFP et donc détectables par qRT-PCR) dans les souris ayant eu un stent versus les souris non stentées.

1ère phase : extraction d'ARN à partir des échantillons de foie.

Les échantillons de foie étaient prélevés juste avant le sacrifice des animaux sous anesthésie générale et tout de suite conservés dans de l'azote liquide puis à -80°C. L'extraction d'ARN se faisait à partir de prélèvements de 30 mg (soit une sphère de 3 à 7 mm de diamètre pour le foie) en utilisant le kit d'extraction TRIZOL^R Reagent, InvitrogenTM. Cela se déroulait en 5 phases :

1. Homogénéisation des prélèvements avec 1mL de TRIZOL.
2. phase de séparation avec ajout de 0,2 ml de chloroforme (permettant de séparer les protéines et les acides nucléiques) puis centrifugation (12000 x g, 15 min, 4°C).
3. Phase de précipitation de l'ARN en récupérant la phase aqueuse des tubes centrifugés puis ajout de 0,5 ml d'isopropanol et centrifugation (12000 x g, 10 min, 4°C°).
4. Phase de purification de l'ARN en lavant le culot avec 1 ml d'éthanol à 75 % (élimination des résidus de phénol, de chloroforme et des sels en excès), puis à nouveau centrifugation (7500 x g, 5 min, 4°C) et enfin vidange de tout le surnageant.

5. Phase de redissolution de l'ARN en rajoutant 40 µl d'eau ultra pure (eau RNase free) au culot et conservation à -80°C.

2ème phase : quantification et vérification de la pureté de l'ARN extrait.

Après vérification de la bonne redissolution de l'ARN, avec si besoin rajout d'eau RNase free pour avoir une bonne homogénéisation, on quantifiait l'ARN à l'aide du spectrophotomètre NanoVue™ afin de pouvoir avoir des échantillons d'ARN à la concentration finale de 1 µg /1 µl. Le NanoVue™ permettait également de vérifier la pureté de l'ARN en calculant le rapport A260(ARN)/A280(ADN) qui devait se situer entre 1,8 et 2 (montrant l'absence de contamination par les protéines) tout comme le rapport A260/A230 évaluant la contamination par le phénol et le chloroforme.

La qualité de l'ARN était également vérifiée par l'étude de la migration des échantillons sur un gel d'agarose 1,2 % suivie d'une visualisation sous lumière UV en recherchant les bandes 28S et 18S.

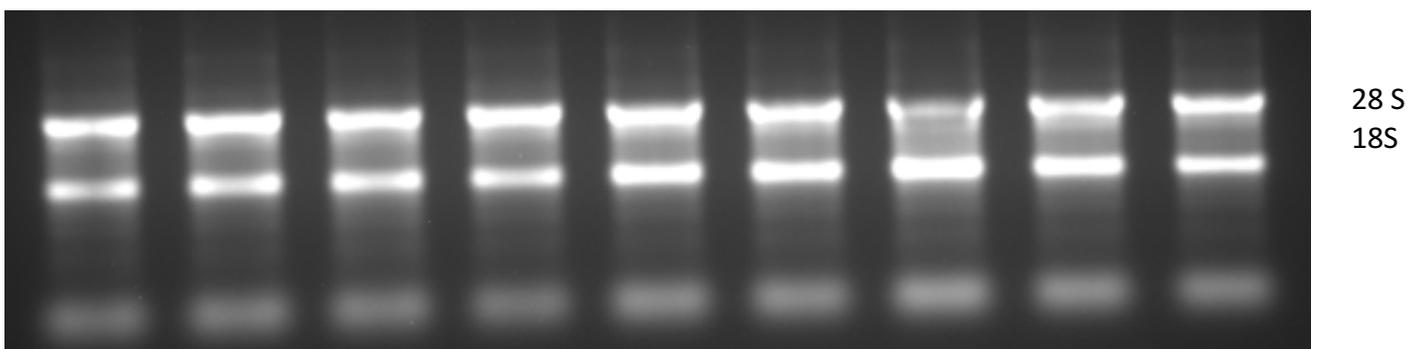


Figure 2.21. Vérification de la qualité de l'ARN

3ème phase : transcription inverse (reverse transcriptase ou RT)

Elle s'est déroulée en 3 parties :

1. Purification des échantillons d'ARN : 5 μ l d'ARN étaient mélangés avec 2 μ L de tampon de l'enzyme superscript III, 2 μ l d'eau et 1 μ l de DNase (mix 1); puis incubation à 37°C pendant 20 min

2. Préparation de la RT avec rajout dans le mix 1 de 3 μ l d'un 2^{ème} mix contenant 1 μ l des amorces à séquences aléatoires (random primer) à une concentration de 100 ng/ μ l, 1 μ l des 4 désoxyribonucléotides (dNTP) et 1 μ l d'eau; après une incubation à 65°C pendant 5 min les tubes étaient plongés dans de la glace pendant 1 à 2 minutes puis à nouveau centrifugés brièvement.

3. Phase de RT avec rajout dans le mix 2 d'un 3^{ème} mix comprenant 2 μ l de tampon, 1 μ l de DTT 0.1M, 3 μ l d'eau et 1 μ l d'enzyme RT-transcriptase. La réaction de reverse transcription était incubé à 50°C pendant 1 heure puis à 70°C pendant 15 minutes pour inactiver l'enzyme.

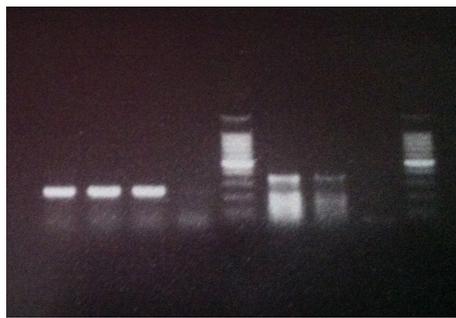
Les échantillons de RT étaient à l'issue conservés à -20°C.

4ème phase : qRT-PCR

1. Les amorces spécifiques de la GFP ont été testées sur de l'ADN génomique extrait à partir de cellules CT 26 GFP/Luc. En parallèle, pour vérifier la qualité de l'ADN génomique, des amorces utilisées au laboratoire pour amplifier le gène endogène Notch ont été utilisées. Pour préparer l'ADN génomique, on a utilisé une flasque de cellules à confluence : après aspiration du milieu de culture, on rajoutait 2 ml de trypsine puis après 5 min d'incubation à 37°C, 8 ml de milieu de culture. La solution cellulaire obtenue était centrifugée pendant 3 min, à 1000 RPM à 20°C. Le culot cellulaire était resuspendu dans 50 μ l de "lysis buffer", 25 μ l de Tween 20, 422,5 μ l d'eau et 2,5 μ l de protéinase K. Le tout était plongé au bain marie à

55°C pendant 5 heures puis à 95°C pendant 20 min. A partir de l'ADN extrait des cellules, une PCR a été réalisée avec les amorces GFP R / GFP F et les amorces Notch N5 et N3. Cette réaction de PCR contenait 0,1mM de dNTP, 1,25mM Mgcl2, et des amorces à 1µM en testant plusieurs volumes d'ADN génomique (1µl-5µl-10µl). La PCR a été réalisée avec un appareil TAKARA selon le programme CAT (1 cycle :95°C:5mn;35 cycles:94°C:45sec-55°C :45sec-72°C :45sec;1 cycle 72°C :5mn;1 cycle 4°C :60mn)

Puis les échantillons ont été déposés sur un gel d'agarose. On a obtenu une amplification d'une bande d'une taille de 235 paires de bases (pb) environ correspondant à celle attendue pour le gène endogène Notch et une bande de 320 pb correspondant au transgène GFP.



Notch

GFP

Figure 2.22. Amplification des gènes Notch et GFP.

Les amorces spécifiques du gène de la GFP et d'un gène endogène β 2Microglobuline ont ensuite été testées sur de l'ADN complémentaire extrait de la lignée cellulaire CT 26 GFP/Luc. On a utilisé le même kit d'extraction d'ARN que précédemment à savoir le TRIZOL pour extraire l'ARN à partir des cellules CT26. Les phases de séparation, de précipitation et de purification étaient identiques à celles utilisées pour l'extraction d'ARN des foies.

La migration sur gel d'agarose et le NanoVueTM ont permis de vérifier la bonne qualité de l'ADN extrait.



28 S
18 S

Figure 2.23. Vérification qualité de l'ADN extrait.

2. Nous avons testé l'efficacité de la PCR GFP (qui doit approcher les 100%) en faisant des dilutions en série : non dilué, 1/3, 1/9, 1/27 et 1/81 de l'ADNc des cellules CT26.

Pour réaliser une plaque de qPCR, les échantillons sont déposés en double. Dans chaque puits a été déposé un mix comprenant 9,5 μ l d'ADNC, 12,5 μ l de sybergreen et 3 μ l d'amorces à 5 μ molaires. Puis les différents échantillons d'ADNc de foie avec les amorces GFP puis β 2Microglobuline sont disposés en double.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	ND	ND	1/3	1/3	1/9	1/9	1/27	1/27	1/81	1/81			
B	1	1											GFP
C	7	7											GFP
D												18	
E	1	1											b2M
F	7	7											
G												18	
H	cellule	cellule	RT-	RT-	NTC	NTC	cellule	cellule	RT-	RT-	NTC	NTC	

Après centrifugation la plaque a été mise dans une machine LightCycler^R 480 avec un protocole Light Cycler^R 480 SYBR Green I Master à 4 phases :

1. Pré-incubation à 95°C pendant 5 min (activation Taq polymérase et dénaturation ADNc)

2. Amplification de l'ADN cible, 95°C pendant 10 sec puis 60°C pendant 15 sec puis 72°C pendant 5 sec

3. Melting Curve pour identification des produits de PCR (95°C pendant 5 sec, 65°C pendant 1 min puis 98°C continu)

4. Cooling 40°C 10 sec.

Recherche des CTC dans le sang périphérique.

La recherche de CTC dans le sang périphérique a été réalisée afin de voir si, comme chez l'homme, la mise en place d'un stent chez la souris pour une tumeur colique occlusive relargait des cellules tumorales dans la circulation sanguine. (82)

La présence d'un marqueur spécifique (GFP) dans les cellules tumorales de notre modèle nous a conduit à utiliser une technologie de filtration et de sélection des cellules selon la taille sans utiliser de marqueurs de sélection ou d'enrichissement des cellules d'intérêts. Par ailleurs, la technologie Cellsearch^R détectant exclusivement les cellules humaines, notre modèle constitué de cellules tumorales murines était totalement inadapté à l'utilisation de cet outil.

Comme le présente la figure 1 la technologie CANOPUS consiste à sélectionner les cellules en fonction de leur taille et de leur viscoélasticité. Pour notre étude, nous avons prélevé ≥ 300 μ l de sang par ponction intracardiaque lors du sacrifice de chaque souris et 3 filtres ont été réalisés pour chacun d'eux (100 μ l de sang total). Brièvement, pour la constitution d'un filtre 100 μ l de sang était mélangé à 900 μ l de tampon de fixation / lyse des cellules. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, l'ensemble était filtré, lavé au PBS, séché et stocké à -20°C jusqu'à utilisation. La détection de la GFP ou de la luciférase se faisait sous un microscope à fluorescence après marquages des cellules en

utilisant un anticorps dirigé contre la GFP ou la luciférase, lequel était révélé par un anticorps secondaire couplé à un alexa fluor (Life technologies).

Dans un premier temps nous avons validé la détection de cellules GFP+ par filtration direct de plusieurs milliers de cellules GFP positive en culture puis par ajout de 10 ou 4 cellules murines GFP+ dans 100 µl de sang de souris afin d'être dans les conditions expérimentales les plus proches possible de notre modèle expérimental. Ainsi nous avons pu valider la visualisation de ces cellules avec un taux de réussite de 50% à 100%.

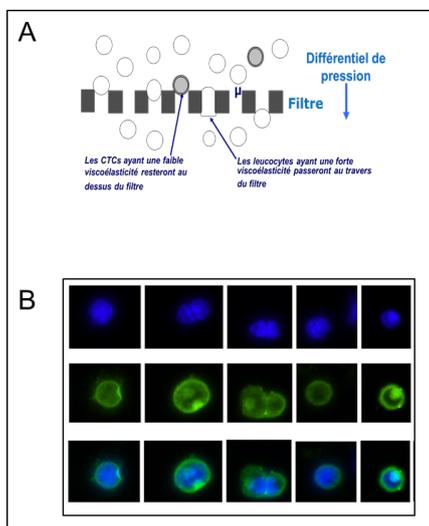


Figure 2.24. La technologie CANOPUS. (A) principe de sélection des cellules selon leur taille. Les cellules tumorales étant plus grosses et moins viscoélastiques que les cellules sanguines elles sont retenues sur le filtre. (B) Marquage des cellules après capture. Le DAPI (en bleu) marque le noyau des cellules, un anti GFP (en vert) identifie les cellules exprimant la GFP. La superposition des 2 identifie les cellules nucléées GFP positives.

Examen histologique

Les prélèvements à visée d'analyse histologique étaient plongés dans du PBS puis mis dans du PFA 4 % pendant 2 heures, ensuite étaient réalisés 3 lavages de 5 min au PBS et enfin les échantillons étaient conservés dans de l'éthanol à 70 % à 4°C.

Les prélèvements fixés étaient inclus en paraffine puis des coupes de 5 µm étaient réalisées au microtome et colorées de façon standard à l'hématoxyline-éosine-safran.

L'étude d'immunofluorescence a été faite sur des coupes tissulaires de 4 µm, après déparaffinage avec comme protocole :

Chauffage à 60°C des lames pendant 30 minutes puis déparaffinage des lames par des bains successifs de xylène (2 bains de 5 minutes), alcool 100° (2 bains de 2 minutes), puis des bains de 2 minutes d'alcool 90°-70°-50° puis 1 bain de 2 minutes dans l'eau courante. Le démasquage antigénique était réalisé avec une solution tampon de citrate de sodium pH 6, portée à ébullition et maintenue à ébullition pendant 20 minutes puis les lames étaient refroidies pendant 1 heure à air ambiant ou pendant 30 minutes dans de la glace. Après 3 rinçages de 5 minutes au PBS, le blocage des sites non spécifiques était réalisé au moyen de sérum de veau foetal à 5 % et de PBS pendant 1 heure à air ambiant. Ensuite les anticorps primaires été mis (anticorps anti-GFP chicken dilué au 1/300ème, anticorps Ki67 mouse dilué au 1/260ème et anticorps anti pan-cytokératine) et le tout restait en incubation une nuit à +4°C.

Après 3 nouveaux rinçages de 5 minutes au PBS, les anticorps secondaires anti chicken et anti mouse dilués au 1/500ème ainsi que le DAPI (1/1000ème) était mis avec une incubation d'une heure à air ambiant. Enfin 3 nouveaux rinçages de 5 minutes au PBS étaient réalisés avant un montage entre lames et lamelles à l'Aqua Polymount.

Statistiques

Les analyses ont été faites par type de cellules utilisées GFP/Luc et Luc et de façon combinée ou globale en regroupant les 2 types cellulaires car elles ne différaient que sur leur caractère luciférase et l'expression de GFP.

Les résultats sont exprimés, soit en pourcentage de la valeur contrôle, soit par la valeur obtenue pour les échantillons analysés +/- la dispersion des valeurs autour de la moyenne (écart-type). Les comparaisons entre les groupes étudiés, ont été réalisées par un test non paramétrique de Fisher pour les variables catégorielles et par un test de Mann-Whitney pour les variables continues. Le seuil de significativité retenu a été fixé à $p \leq 0,05$. Une régression linéaire a été réalisée au moyen du logiciel STAT A.

2.1.3. RESULTATS

Choix d'un modèle de greffe orthotopique

Devant le faible rendement d'incidence de développement des tumeurs, le sur risque de perforation de la première technique de greffe orthotopique (par lésion du côlon à la pince à biopsie), l'option d'injection sous muqueuse colique a été retenue comme décrit par Zigmond et al. car elle était plus simple et plus efficace. (85)

Grâce à ce modèle nous avons pu avoir un taux de prise de greffe orthotopique de 70 % dans les 2 premières séries d'injection puis rapidement ce taux est passé à 100 %.

La première partie du projet a consisté à essayer d'établir une cinétique de la croissance tumorale afin notamment de savoir quand la tumeur devenait occlusive et donc quand mettre en place le stent. Celui-ci ne devait pas être mis trop tôt car l'effet mécanique du

stent serait réduit et pas trop tard non plus pour avoir une durée de survie à peu près identique entre le groupe des souris stentées et le groupe des souris sans stent.

Les premières séries d'injection ont permis d'acquérir une bonne technique d'injection car au début les injections étaient soit trop intra-péritonéales et donnaient alors des carcinomes péritonéales importantes, soit trop intra-luminales et ne donnaient donc pas de tumeurs. Peu à peu on a pu mettre en évidence que les tumeurs étaient rarement occlusives avant le 7^{ème} jour après l'injection et que donc il suffisait de faire une coloscopie vers le 6^{ème}-7^{ème} jour afin de voir quelles souris avaient des lésions pré-occlusives et devaient donc être surveillées de façon plus rapprochée afin d'optimiser le moment de la pose du stent.

Aussi la distance du site d'injection a été évaluée afin de permettre une mise en place optimale du stent sur une portion de côlon accessible en coloscopie. En effet chez la souris la partie du côlon accessible est sa partie terminale qui s'étale sur à peu près 3 cm où le côlon est à peu près rectiligne; au-delà la progression du coloscope rigide est très difficile du fait des sinuosités et du caractère très mobile dans la cavité péritonéale du côlon, qui est donc alors à fort risque de perforation. Ainsi une distance de 2 cm à partir de la marge anale a été retenue afin que la tumeur ne soit pas trop proche de l'anus exposant donc à une issue de l'extrémité distale du stent hors de l'anus de la souris et pas au-delà de 2 cm afin que l'extrémité proximale du stent (rigide) ne soit pas responsable d'une perforation en amont du stent.

Mise en place des stents

Les stents ont été posés en moyenne au 10^{ème} jour après l'injection (extrêmes allant de 8 à 15 jours). Les complications liées à la pose des stents ont été observées dans 50 % des cas mais la plupart sont survenues en début d'expérience avec 1 hémorragie et 2 perforations per procédure et 3 obstructions de stents (liées à leur longueur trop importante (de 15 à 20 mm)).

Une fois l'utilisation de stents plus courts (de 8 à 12 mm) et la technique maîtrisée nous avons observé 2 obstructions (la 1^{ère} liée à une pose de stent tardive au-delà du 15^{ème} jour avec une tumeur très occlusive et une pose de stent difficile, et la 2^{ème} liée à une taille inadéquate de stent avec une longueur trop importante et un diamètre insuffisant), 2 migrations de stent (mis en évidence par l'absence de stent lors de l'examen macroscopique réalisé lors du sacrifice) et 2 perforations découvertes lors de l'autopsie de souris décédées précocement avec présence d'une péritonite stercorale et d'une perforation à l'extrémité proximale du stent. Ainsi le taux de complication une fois la technique maîtrisée était de 25%.

N'ont été retenues dans l'analyse de la dissémination métastatique que les souris ayant eu au moins 3 jours de stent soient 16 souris parmi lesquelles il y avait 2 perforations, 2 occlusions et 1 migration de stent, soit un taux de complication de la population de l'étude de 31 %.

Survie

L'analyse de la survie a retrouvé une survie significativement ($p = 0,02$ global, $p = 0,09$ GFP/Luc, $p = 0,48$ Luc) plus faible dans le groupe des souris stentées (moyenne de survie de $15,2 \pm 1$ jours global, $15,6 \pm 1$ jours GFP/Luc, $14,8 \pm 1$ jours Luc) que chez les souris non stentées (moyenne de $20,4 \pm 7$ jours global, $21,8 \pm 7,3$ jours GFP/Luc, $16,3 \pm 3$ jours Luc). Ainsi la durée de vie une fois le stent posé était de $5,2 \pm 1,7$ jours.

L'analyse de la survie en fonction de la présence ou non de métastases hépatiques n'était pas modifiée avec moyenne de survie de $17 \pm 2,8$ jours pour les souris ayant des métastases hépatiques et $19,1 \pm 6,6$ jours pour celles n'ayant pas de métastases hépatiques ($p = 0,93$). De même la présence d'une carcinose péritonéale à l'examen macroscopique final ne diminuait pas la survie, au contraire, avec une moyenne de survie de $19,6 \pm 7$ jours en cas de

CP+ et de 18 ± 5 jours sans CP ($p = 0,44$). Enfin, après avoir dichotomisé le volume tumoral autour de sa médiane (51 mm^3), nous avons remarqué que les souris avec une tumeur de plus de 51 mm^3 avaient une meilleure survie (moyenne de $21,7 \pm 6,5$ jours) que celles avec une tumeur de moins de 51 mm^3 (moyenne de $16,9 \pm 5,6$) et ce de façon significative, $p=0,0004$.

En ne prenant en compte que les souris ayant une carcinose péritonéale la survie était toujours significativement ($p = 0,009$) plus basse chez les souris stentées (moyenne de survie de $15,2 \pm 1$ jours) que chez les souris non stentées (moyenne de survie $21,8 \pm 7,7$ jours).

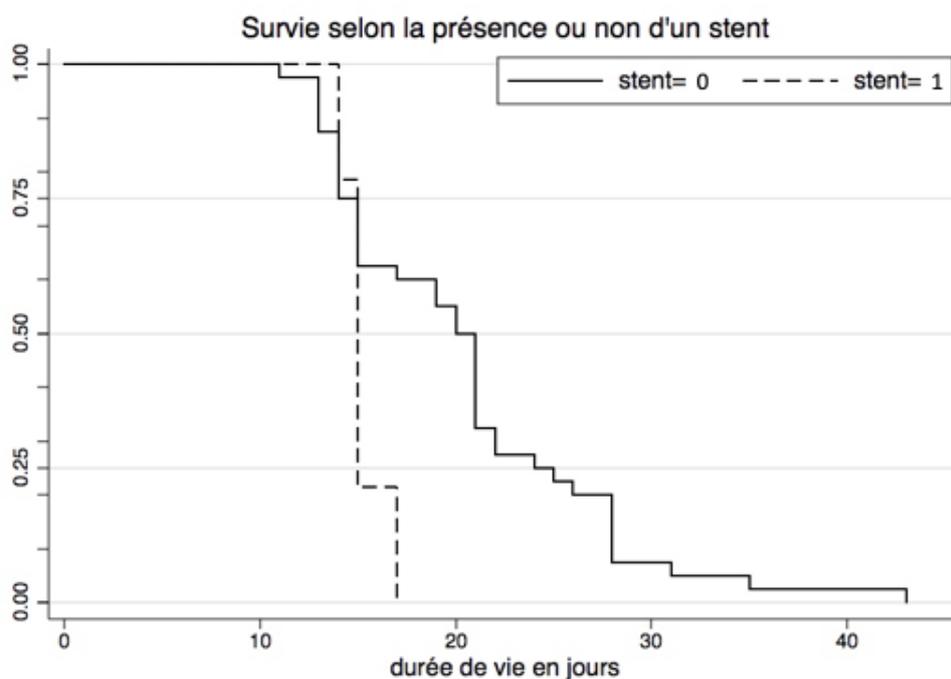


Figure 2.25. Courbes de survie en fonction de la pose d'un stent colique.

Analyse de survie en fonction de la présence d'un stent colique.

Une analyse multivariée a été réalisée avec une régression linéaire multiple après vérification de l'absence de colinéarité entre les variables et a retrouvé un coefficient béta = -5,45 avec un intervalle de confiance à 95 % de $[-9,36 ; -1,54]$. Cela signifie qu'après ajustement sur les variables carcinose péritonéale, métastases hépatiques et volume tumoral,

le stent est toujours associé à une diminution significative de la survie qui diminue en moyenne de 5,4 jours par rapport à une souris non stentée ($p = 0,008$).

Analyse macroscopique

Une carcinose péritonéale a été retrouvée plus fréquemment chez 75 % des souris stentées (87,5 % souris GFP/Luc, 62,5 % souris Luc) contre 54,7 % chez les souris non stentées (62,5 % souris GFP/Luc, 30 % des souris Luc), mais sans différence significative ($p = 0,23$ global, $p = 0,23$ souris GFP/Luc, $p = 0,34$ souris Luc).

On ne retrouvait également pas de différence significative entre les souris stentées et non stentées que la carcinose péritonéale soit limitée, $IPC < 20$ ($p = 0,11$ global, $p = 0,66$ GFP/Luc, $p = 0,34$ Luc) ou que la carcinose péritonéale soit importante, $IPC \geq 20$ ($p = 1$ global, $p = 0,69$ GFP/Luc, $p = 1$ Luc).

Des métastases hépatiques ont été retrouvées plus fréquemment chez les souris stentées dans 18,75 % des cas (25 % GFP/Luc, 12,5 % Luc) contre 2,38 % des cas chez les souris non stentées (3,1 % GFP/Luc, 0 % Luc) avec une différence à la limite de la significativité ($p = 0,059$ global, $p = 0,09$ GFP/Luc, $p = 0,44$ Luc).

De l'ascite était retrouvé chez 13,3 % des souris stentées (28,6 % GFP/Luc, 0 % Luc) et chez 14,3 % des souris non stentées (18,75 % GFP/Luc, 0 % Luc) sans différence significative entre les 2 groupes ($p = 1$ global, $p = 0,61$ GFP/Luc, $p = 1$ Luc).

Enfin les souris stentées avaient des tumeurs plus petites (volume moyen $46,8 \pm 49$ mm³ global, $56,7 \pm 58,9$ mm³ GFP/Luc, $39,3 \pm 43,3$ mm³ Luc) que les souris non stentées (volume moyen $257,6 \pm 478,2$ mm³ global, $320,3 \pm 532,5$ mm³ GFP/Luc, $54 \pm 58,5$ mm³ Luc) de façon significative ($p = 0,04$ global, $p = 0,2$ GFP/Luc, $p = 0,46$ Luc).

	Souris stentées (n=16)			Souris non stentées (n=42)			p
	Global	GFP/Luc	Luc	Global	GFP/Luc	Luc	
Carcinose péritonéale							
-globale	12	8	4	23	20	3	0,23
-IPC<20	8	3	5	11	8	3	0,11
-IPC≥20	4	4	0	12	12	0	1
Métastases hépatiques	3	2	1	1	1	0	0,059
Ascite	2	2	0	6	6	0	1
Volume tumoral (mm ³)	47±49	57±59	39±43	257±478	320±532	54±58	0,04

Tableau 2.1. Analyse macroscopique en fonction de la pose d'un stent.

Prélèvements sanguins

Dosages de LDH

Les dosages de LDH 1 (réalisés lors du 1^{er} prélèvement à J6/7) ne différaient pas significativement entre les souris stentées (moyennes de 174,8 ± 58,7 global, 134,6 ± 56 GFP/Luc, 189,9 ± 55 Luc) et les souris non stentées (moyennes de 162,5 ± 57,2 global, 147,5 ± 65 GFP/Luc, 170,1 ± 55 Luc) avec p = 0,68 global, p = 1 GFP/Luc, p = 0,63 Luc).

Les dosages de LDH 2, réalisés 1 semaine après et donc après la pose de stent colique chez les souris stentées, étaient significativement (p = 0,0005 global, p = 0,01 GFP/Luc, p = 0,03 Luc) plus élevés dans le groupe des souris stentées (moyennes de 506,1 ± 203,6 global, 344,8 ± 96,3 GFP/Luc, 627 ± 176,6 Luc) que chez les souris non stentées (moyennes de 250,4 ± 61,6 global, 268,2 ± 76,5 GFP/Luc, 239,3 ± 52,8 Luc)

La différence entre les 2 dosages LDH1 et LDH 2 (Δ LDH) était significativement plus élevée (p = 2,5x10⁻⁵ global, p = 0,03 GFP/Luc, p = 0,04 Luc) dans le groupe des souris stentées (moyennes de Δ LDH de 332,3 ± 161,6 global, 210,1 ± 48,1 GFP/Luc, 424 ± 156,7

Luc) que chez les souris non stentées (moyennes de Δ LDH de $91,4 \pm 38,6$ global, $120,7 \pm 28,6$ GFP/Luc, 73 ± 33 Luc).

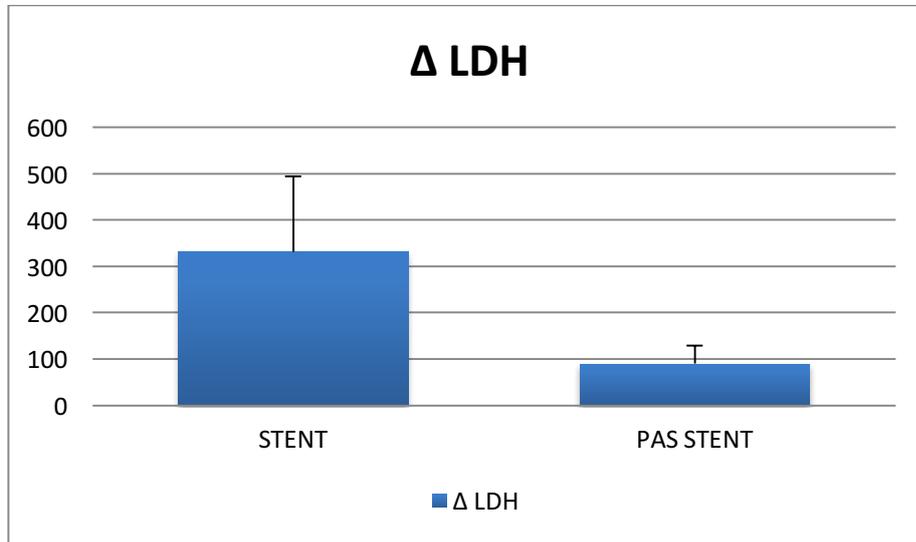


Figure 2.26. Dosages de LDH en fonction de la pose d'un stent.

Bioluminescence

Analyse quantitative

L'activité bioluminescente 1 mesurée à J6/7 était plus importante ($p = 0,0005$ global, $p = 0,01$ GFP/Luc, $p = 0,03$ Luc) dans le groupe des souris stentées (moyennes de $1,3 \times 10^8 \pm 2,3 \times 10^8$ global, $8,3 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^6$ GFP/Luc, $2,4 \times 10^8$ Luc) que chez les souris non stentées (moyennes de $1,9 \times 10^7 \pm 3,5 \times 10^7$ global, $2,4 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^6$ GFP/Luc, $5,5 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^7$ Luc).

L'activité bioluminescente 2, mesurée 1 semaine après, n'était pas différente ($p = 0,12$ global, $p = 0,46$ GFP/Luc, $p = 0,23$ Luc) entre les souris stentées (moyennes de $1,1 \times 10^8 \pm 2,4 \times 10^8$ global, $2,1 \times 10^7 \pm 2,2 \times 10^7$ GFP/Luc, $1,9 \times 10^8 \pm 3,3 \times 10^8$ Luc) et les souris non stentées (moyennes de $3,3 \times 10^7 \pm 9,7 \times 10^7$ global, $1,7 \times 10^7 \pm 2,7 \times 10^7$ GFP/Luc, $6,3 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^8$ Luc).

La différence d'activité bioluminescente entre bioluminescence 1 et 2 (Δ biolum) n'était pas différente ($p = 0,95$ global, $p = 0,08$ GFP/Luc, $p = 0,53$ Luc) entre les souris stentées (moyenne Δ bioluminescence de $-1,5 \times 10^7 \pm 9,6 \times 10^7$ global, $9,8 \times 10^6 \pm 2 \times 10^7$ GFP/Luc, $-3,7 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^8$ Luc) et les souris non stentées (moyenne Δ bioluminescence de $5,9 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^8$ global, $4,2 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^6$ GFP/Luc, $7,9 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^8$ Luc).

	Souris stentées (n=16)			Souris non stentées (n=42)			p
	Global	GFP/Luc	Luc	Global	GFP/Luc	Luc	
Analyse quantitative❖							
-biolum 1	$1,3 \times 10^8$	$8,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$5,5 \times 10^7$	0,0005
-biolum 2	$1,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	0,12
$-\Delta$ biolum*	$-1,5 \times 10^7$	$9,8 \times 10^6$	$-3,7 \times 10^7$	$5,9 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$7,9 \times 10^6$	0,9
Analyse qualitative (%)							
-CP							
-biolum 1	92	80	100	50	67	30	0,01
-biolum 2	90	80	100	55	53	67	0,1
-progression biolum 1 / 2	50	60	40	37,5	42	25	0,69
Analyse des données de la bioluminescence.							
biolum = bioluminescence; CP=carcinose péritonéale							
❖ exprimée en photons par seconde							
* Δ biolum : calculée exclusivement à partir des souris ayant eu des valeurs biolum 1 et 2.							

Tableau 2.2. Analyses des données de bioluminescence en fonction de la pose d'un stent.

Analyse qualitative

L'analyse des images de bioluminescence a permis de retrouver plus de carcinomes péritonéaux lors de la première acquisition (avant la pose du stent) dans le groupe des souris stentées (92,3 % global, 80 % GFP/Luc, 100 % Luc) que dans le groupe des souris non stentées (50 % global, 66,67 % GFP/Luc, 30 % Luc) et ce de façon significative ($p = 0,01$ global, $p = 1$ GFP/Luc, $p = 0,04$ Luc).

Lors de la deuxième acquisition il y avait une tendance à y avoir plus de carcinome péritonéal chez les souris stentées (90 % global, 80 % GFP/Luc, 100 % Luc) que chez les souris non stentées (55,55 % global, 53 % GFP/Luc, 66,67 % Luc) avec $p = 0,1$ global, $p = 0,6$ GFP/Luc et $p = 0,37$ Luc.

Aucune différence n'était notée que la carcinome soit limitée ou importante chez les souris stentées (55,56 % CP limitée que chez les souris Luc, 44,44 % CP importante que chez les souris GFP/Luc) ou chez les souris non stentées (50 % CP limitée se partageant équitablement entre les souris GFP/Luc et Luc et 50 % CP importante que chez les souris GFP/Luc).

La progression des images en bioluminescence entre les 2 acquisitions ne différait pas de façon significative ($p = 0,69$ global, $p = 0,62$ GFP/Luc, $p = 1$ Luc) entre les souris stentées (progression chez 50 % global, 60 % GFP/Luc, 40 % Luc) et les souris non stentées (progression chez 37,5 % global, 41,67 % GFP/Luc, 25 % Luc), mais avec toutefois plus de progressions retrouvées chez les souris stentées.

Nous avons pu observer 4 discordances entre les résultats de la bioluminescence et les examens macroscopiques réalisés après le sacrifice. Ainsi chez 3 souris stentées et 1 non stentée on n'avait pas retrouvé de carcinose péritonéale lors de l'examen macroscopique final, alors qu'une carcinose péritonéale limitée était décelée sur les images de bioluminescence 1 ou 2.

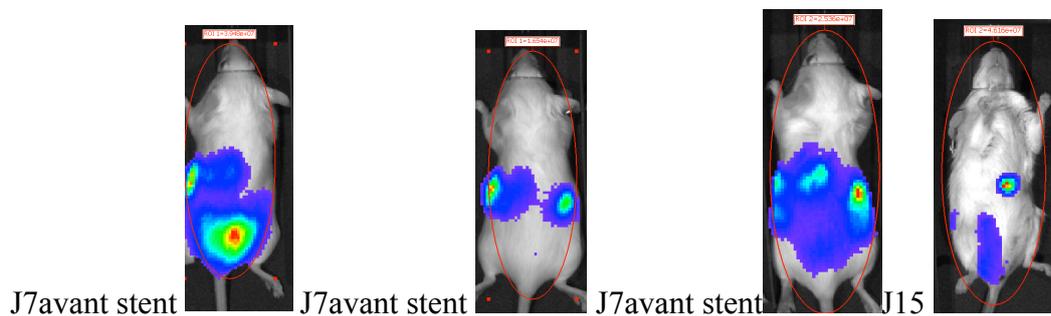


Figure 2.27. Images de bioluminescence discordantes avec analyse macroscopique.

Résultats de la qRT-PCR

Les différentes dilutions effectuées avec l'ADNc des cellules CT 26 ont permis de retrouver une efficacité proche de 100 % de la PCR GFP, autorisant la comparaison des différentes valeurs obtenues.

Les valeurs de qRT-PCR étaient légèrement supérieures dans le groupe des souris stentées (moyenne de $6,66 \pm 4$) par rapport aux souris non stentées (moyenne de $5,6 \pm 4,2$) mais sans différence significative ($p = 0,61$) tout comme dans l'analyse des souris ayant eu plus de 6 jours de stent (moyenne de $7,15 \pm 3,7$ souris stentées contre $5,37 \pm 4,3$ souris non stentées, $p = 0,31$).

Résultats de l'analyse des CTC

Dans le cadre de notre modèle, nous avons évalué la présence de CTC dans la circulation sanguine et le résultat c'est avéré être largement négatif pour les souris portant le marqueur GFP (1 résultat +). Pour les souris portant le marqueur luciférase (7 résultats +), il semblerait que l'identification de cellules DAPI + et luciférase + indique la présence de CTC dans la circulation sanguine de ces souris mais ce résultat doit être validé car la qualité du marquage luciférase n'était pas optimale et doit être encore améliorée afin de valider définitivement la présence ou non de CTC.

La présence de CTC dans le sang a été observée de façon légèrement plus fréquente ($p = 0,4$) chez les souris non stentées (35 %) que chez les souris stentées (16,7 %). Les souris CTC + ne présentaient pas de différence en termes de carcinose péritonéale, de volume tumoral ou de durée de vie par rapport aux souris CTC-.

Analyse histologique

L'analyse des prélèvements de foie a permis d'objectiver les métastases hépatiques observées macroscopiquement lors du sacrifice chez les souris stentées.

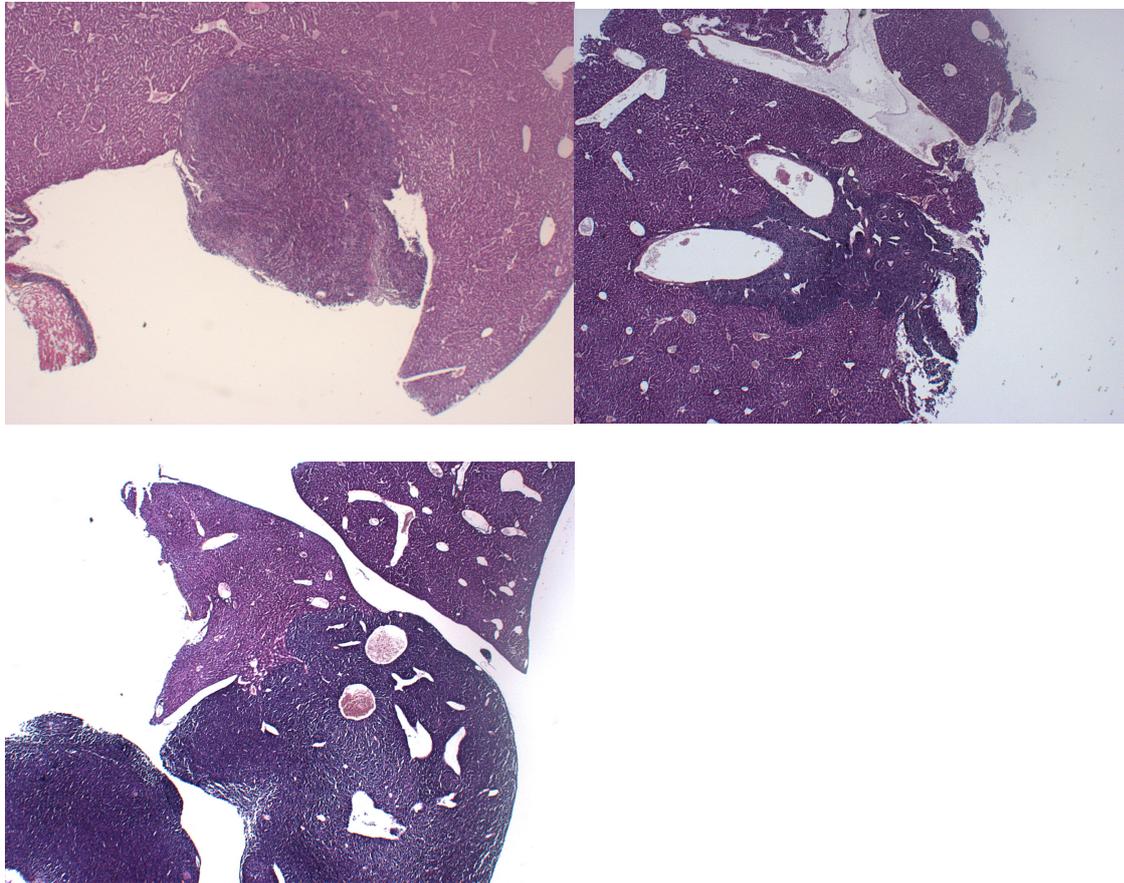


Figure 2.28. Métastases hépatiques chez des souris stentées, coloration HES, x2,5.

Cela a permis aussi dans 3 cas douteux en macroscopie lors du sacrifice, de redresser le diagnostic entre un nodule de carcinose posé sur le foie et une véritable métastase hépatique.

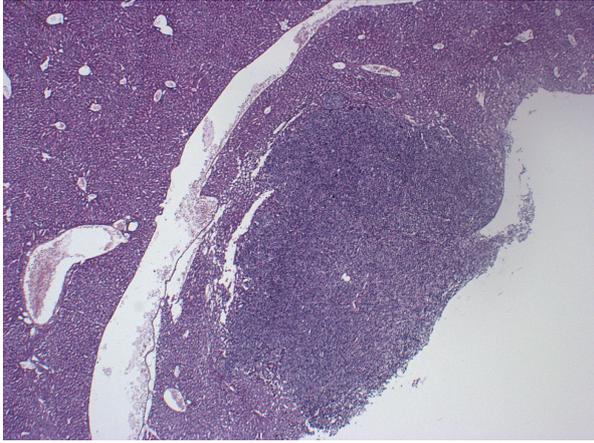


Figure 2.29. Cas d'une souris non stentée avec un doute sur une métastase hépatique en macroscopie qui a été confirmée par l'examen microscopique.

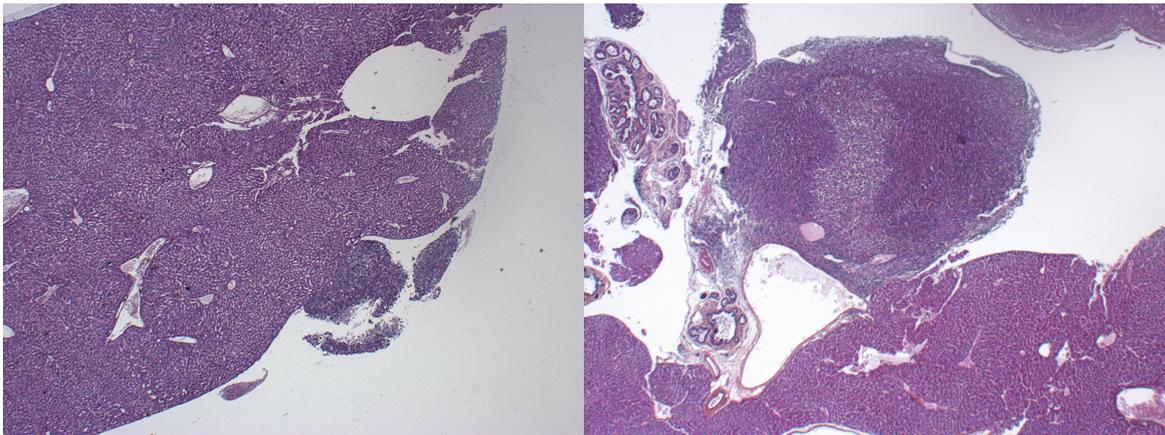


Figure 2.30. Cas de 2 souris stentées avec un doute sur des métastases hépatiques en macroscopie, qui se sont avérées être après examen microscopique des nodules de carcinose péritonéale.

Apport et limites de l'analyse qualitative en bioluminescence

Pour les métastases hépatiques et notamment pour voir si leur apparition était liée exclusivement au stent, on a pu évaluer la bioluminescence avant et après le stent.

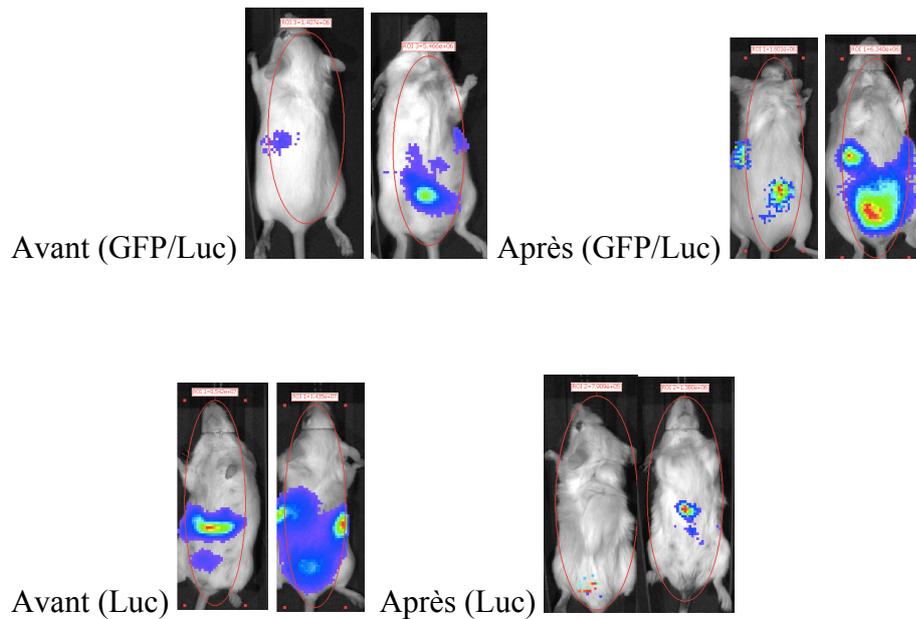


Figure 2.31. Comparaisons qualitatives de bioluminescence en fonction du stent (avant/après pose du stent).

Sur la première série (GFP/Luc) on a l'impression que la métastase hépatique est apparue après le stent alors que sur la deuxième série (Luc) on a l'impression qu'elle pourrait être déjà présente avant la pose du stent.

Cependant la distinction entre métastase hépatique et nodule de carcinose n'est pas toujours facile en bioluminescence.

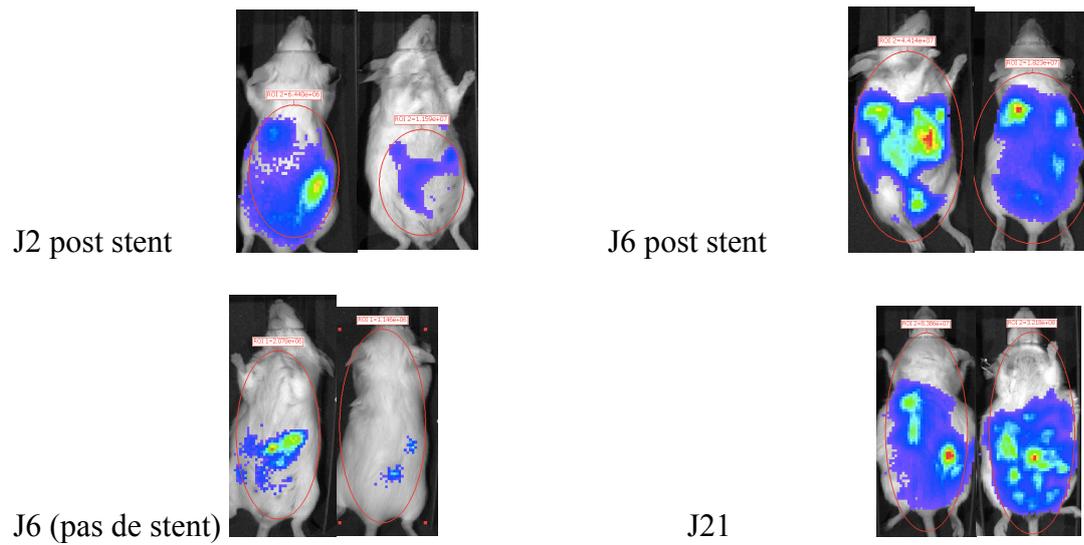


Figure 2.32. Images de bioluminescence chez des souris avec des métastases hépatiques.

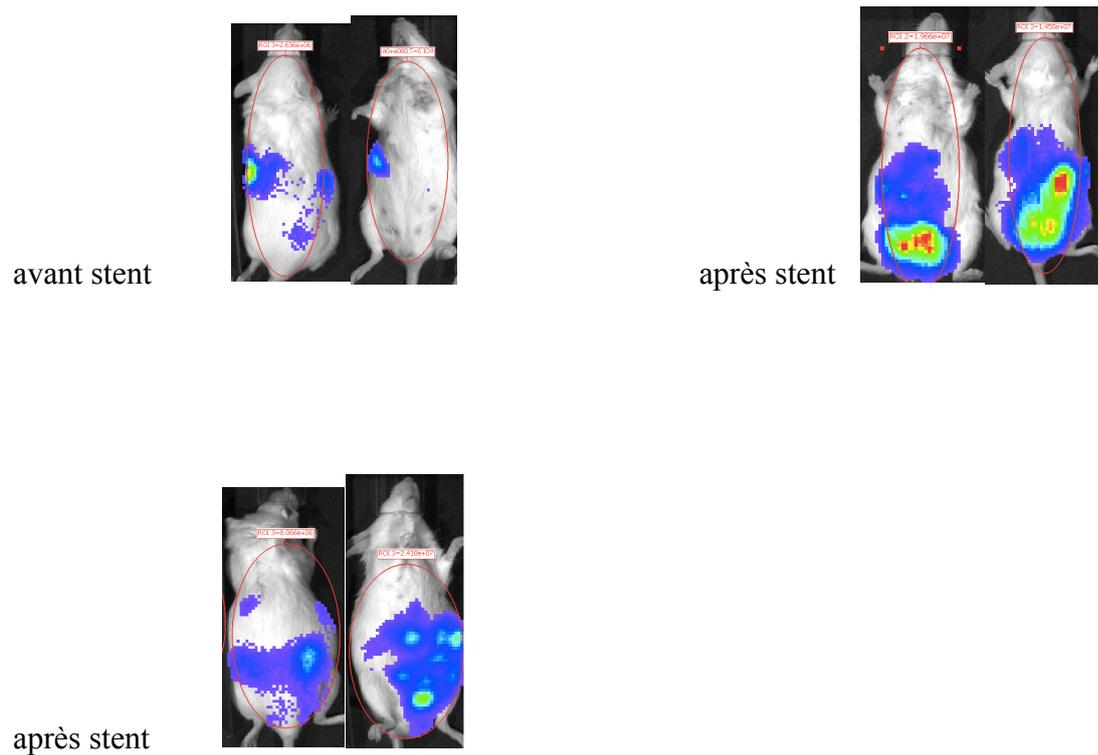


Figure 2.33. Images de bioluminescence de souris avec des images de nodules de carcinose péritonéale.

Afin de voir si on n'était pas passé à côté de métastases hépatiques devant des lésions fixant dans la région du foie en bioluminescence, on a réalisé de façon systématique un examen histologique des foies de souris ayant des fixations suspectes de métastases hépatiques comme ci-dessous.

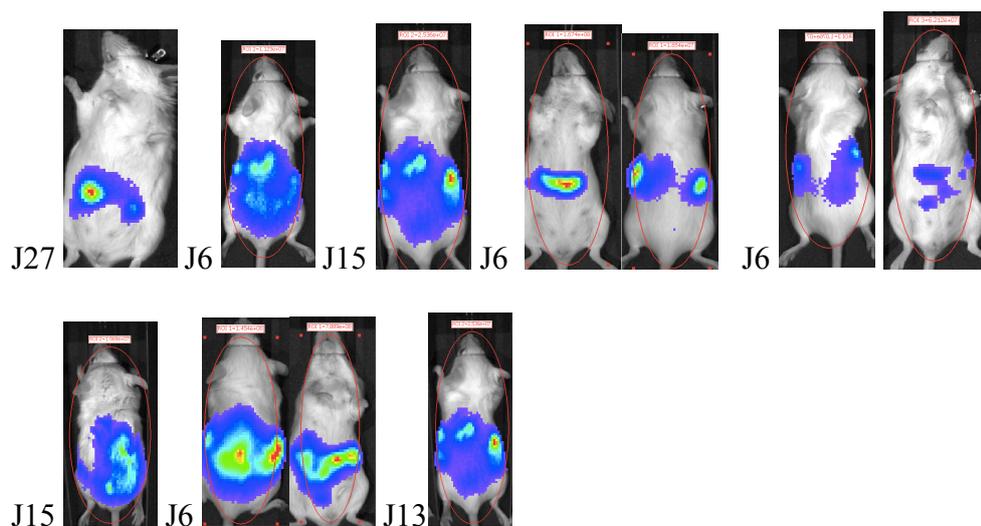


Figure 2.34. Images de fixations en bioluminescence dans la région hépatique.

Tous les examens histologiques à la recherche de métastases hépatiques chez ces souris se sont révélés négatifs indiquant que la différence est parfois difficile à faire entre un nodule de carcinose et une métastase hépatique rien qu'avec la bioluminescence, surtout que le foie occupe une grande partie de l'étage "sus-méso colique" chez la souris.

Immunofluorescence

Les résultats de l'immunofluorescence étaient négatifs, c'est à dire qu'on n'a pas retrouvé de marquage GFP/Ki67 ou panCK, malgré des contrôles positifs. Cela provient peut-être de la différence de traitement des tissus entre le laboratoire d'anatomopathologie où étaient techniquées les lames et le laboratoire dans lequel ont été réalisées les immunofluorescences.

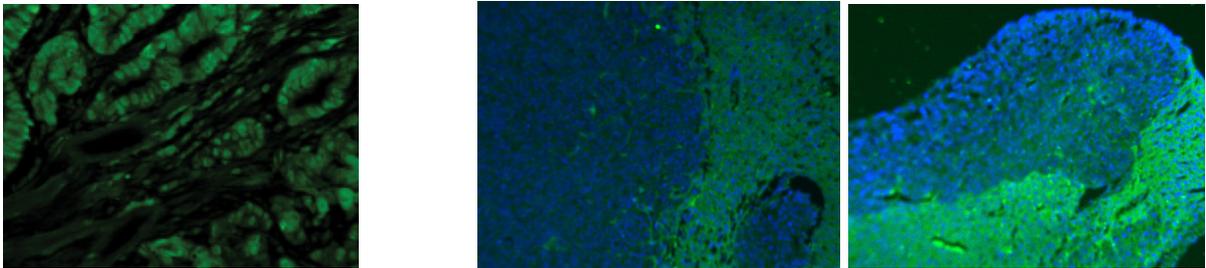


Figure 2.35. Contrôle positif GFP x40 ; **Figure 2.36.** Absence de marquage GFP x10

2.1.4. Conclusion de la 1^{ère} série d'expériences

Au terme de cette 1^{ère} série d'expériences, nous avons pu montrer que dans notre modèle murin la mise en place d'un stent en cas de tumeur colique occlusive diminuait de façon significative la survie.

La mise en place de ce stent était associée aussi à des facteurs de mauvais pronostic puisque les taux de LDH étaient significativement plus élevés et qu'il y avait une tendance à avoir plus de carcinose péritonéale et de métastases hépatiques chez les souris stentées.

Cela nous a donc confortés dans notre théorie que l'effet mécanique qu'exerçait le stent sur la tumeur colique pour lever l'occlusion avait tendance à être associé à un plus mauvais pronostic oncologique en favorisant la dissémination tumorale.

2.2. 2^{ème} série d'expériences

Dans cette 2^{ème} série d'expériences nous avons voulu étudier l'impact de contraintes mécaniques directement appliquées sur des cellules tumorales afin d'essayer de comprendre quel était le véritable impact de la compression mécanique au niveau microscopique sur les mécanismes de prolifération cellulaire et de dissémination métastatique (invasion...). Cette première partie des expérimentations in vitro a été réalisée par Gaëtan Mary du laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), université Paris-Diderot.

2.2.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire CT-26 sauvage (CRL-2638; American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA) est issue d'un adénocarcinome colique de souris immunocompétentes BALB/C traitée par le N-nitroso-N-méthylurethane.

Les cellules étaient cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) enrichi avec 1% d'antibiotiques (pénicilline+streptomycine) et 10% de sérum bovin fœtal (Gibco). Les flasques utilisées étaient des flasques de culture de 75cm² avec 15 mL de DMEM par flasque. Quand les cellules arrivaient à 90% de confluence, elles étaient détachées avec de la trypsine à 0,05% et 0,53 mM EDTA (Gibco).

2.2.2. Marquage magnétique des cellules

Le marquage magnétique des cellules a été réalisé avec des nanoparticules de maghémite (oxyde de fer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Ces nanoparticules ont un diamètre moyen de 9 nm (écart type 28%).

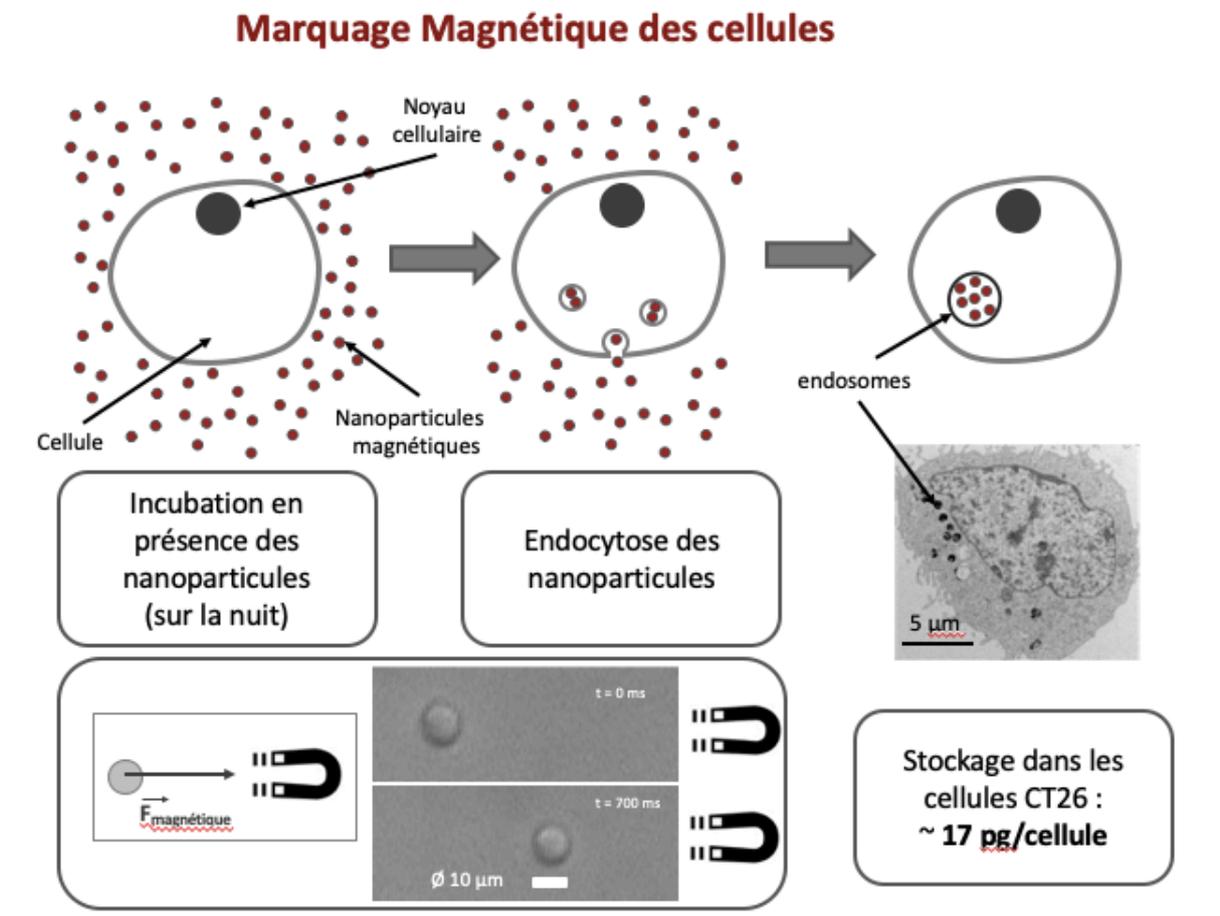


Figure 2.37. Marquage magnétique des cellules

Les nanoparticules sont conservées dans une solution aqueuse d'ions citrate à concentration molaire de 1,24M, afin d'éviter leur agrégation.

Pour s'assurer de la viabilité, mais aussi du bon marquage des cellules, le marquage est effectué pendant toute une nuit (17 heures de marquage) avec des nanoparticules diluées dans du milieu DMEM complétementé (i-e 10% SVF). Après le marquage les cellules sont rincées et laissées au repos pendant 1 heure dans du milieu DMEM complétementé. Les nanoparticules pénètrent dans les cellules par endocytose puis sont concentrées après quelques heures dans des vésicules intracellulaires appelées endosomes (limitant la toxicité du matériel introduit dans la cellule). Plusieurs concentrations ont été testées et une concentration de 0,50 mM de fer a été choisie, donnant une masse de fer de 10,69 +/- 3,78 pg par cellule. La quantité de fer par cellule a été évaluée par magnétophorèse.

2.2.3. Magnétophorèse et quantité de fer internalisée

Les cellules CT 26 ont été cultivées dans des flasques T75 et à 85% de confluence le milieu a été remplacé par une solution de nanoparticules supplémentée en DMEM avec différentes concentrations de fer. Après 17 heures de marquage, les flasques ont été lavées avec du DMEM complétementé « propre » et les cellules ont été laissées au repos pendant 1 heure afin de permettre l'endocytose des nanoparticules encore présentes à leur surface et baisser le stress. Les cellules ont été ensuite détachées puis suspendues dans du PBS (Phosphate Buffer Saline solution, Gibco) et mises devant un aimant ($B=135$ MT, $\text{grad}B=17$ T/m).

A une échelle de temps courte, 2 forces sont exercées sur les cellules : la force magnétique qui met les cellules en mouvement $f_v = M_{\text{cell}} * \text{grad}(B)$ (M_{cell} = moment magnétique d'une cellule), et la force de frottement (loi de Stokes) qui agit contre le mouvement $F_{\text{stokes}} = 6\pi\eta R_{\text{cell}} V_{\text{cell}}$ (R_{cell} = rayon de la cellule, V_{cell} = volume de la cellule et

$\eta=10^{-3}$ Poise, la viscosité du PBS). En supposant un équilibre entre les forces, la mesure de la vitesse des cellules donne le moment magnétique des cellules $M_{cell} = \frac{6R_{cell}V_{cell}}{grad(B)}$. Le moment moyen magnétique par masse de nanoparticule (M_{NPs} (135 mT)/pg = 6.5×10^{-14} A.m²/pg) donne la masse de fer par cellule. Trois séries d'expérimentations distinctes ont été réalisées avec les différentes conditions, avec approximativement une centaine de cellules par condition, donnant la répartition du marquage en fonction des différentes conditions de marquage. Pour la même durée, un marquage avec une solution à 0,6mM donne le même poids de fer par cellule que pour des solutions plus concentrées. Cette condition a été conservée pour toutes les expérimentations assurant un bon équilibre entre le marquage magnétique des cellules et leur viabilité.

2.2.4. Test de viabilité cellulaire

L'impact d'un marquage magnétique à 0,6mM sur la viabilité cellulaire a été testé en utilisant le test de viabilité au bleu alamar. Trois jours avant le marquage sur une nuit, les cellules CT 26 ont été passées à partir d'une flasque T75 avec une confluence à 85%. 18 puits d'une plaque de culture à 24 puits ont été remplis avec 5000 cellules. Après 2 jours, les puits avaient la même confluence (85-90%). Les puits ont été lavés avec du PBS. 9 puits contrôles ont été remplis avec 2 mL de DMEM complété puis avec de la solution de marquage (DMEM complété = nanoparticules, [Fe]=0,6mM). Après 17 heures de marquage, tous les puits ont été lavés puis remplis avec du milieu DMEM complété propre.

Immédiatement, 3 puits contrôles et 3 puits « marqués » ont été lavés avec du PBS et remplis avec 500 µl d'une solution de bleu alamar à 10% avec du DMEM blanc (i-e sans rouge de phénol, pas de FBS et 1% antibiotiques P/S). Pour montrer la cinétique de la

métabolisation de l'Alamar, 100 µl de la solution d'Alamar ont été retirés de chaque puit toutes les 20 minutes. La même procédure a été réalisée pour les 3 puits contrôles et les puits marqués 4 heures après le marquage magnétique. En raison de la confluence, les cellules dans les 6 puits restants ont été passées le lendemain dans 6 puits d'une plaque de culture en utilisant exactement le même protocole entre les 2 conditions. Le lendemain, soit 2 jours après le marquage, le même protocole du bleu alamar a été effectué. La cinétique du métabolisme de l'Alamar n'a montré aucune différence entre les cellules contrôles et les cellules marquées pour les 3 dates testées. Cela montre l'absence d'effet néfaste de la méthode de marquage magnétique des CT 26 sur leur viabilité.

2.2.5. Moulage magnétique des sphéroïdes de cellules CT 26

Le moulage des sphéroïdes a été basé sur des travaux antérieurs. (86)

Un gel d'agarose à 2% (Sigma-Aldrich, Type I-B, A 0576) a été préparé et chauffé jusqu'à ébullition et homogénéisation. 2,8 mL de solution ainsi chauffée ont été versés dans une boîte de Petri de 35 cm². Avant refroidissement, 5 billes d'acier inoxydables de 1 mm (CIMAP) ont été placées dans la solution. Les billes ont été maintenues par 5 aimants cylindriques de 6 x 2 mm (Supermagnete) placés en dessous de la boîte, et maintenus par un support particulier.

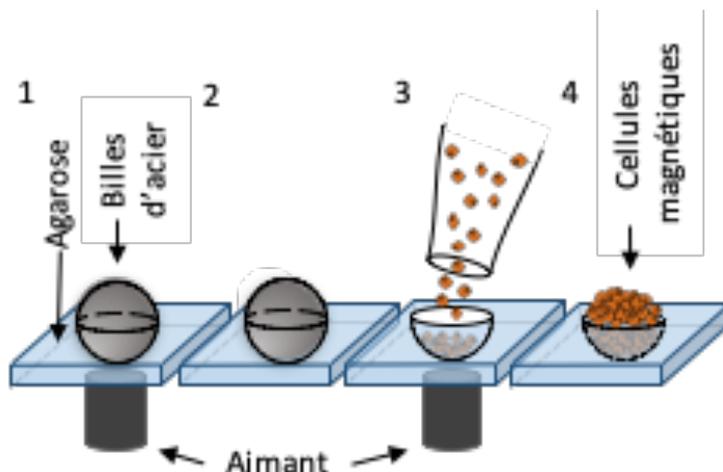


Figure 2.38. Moulage magnétique des sphéroïdes.

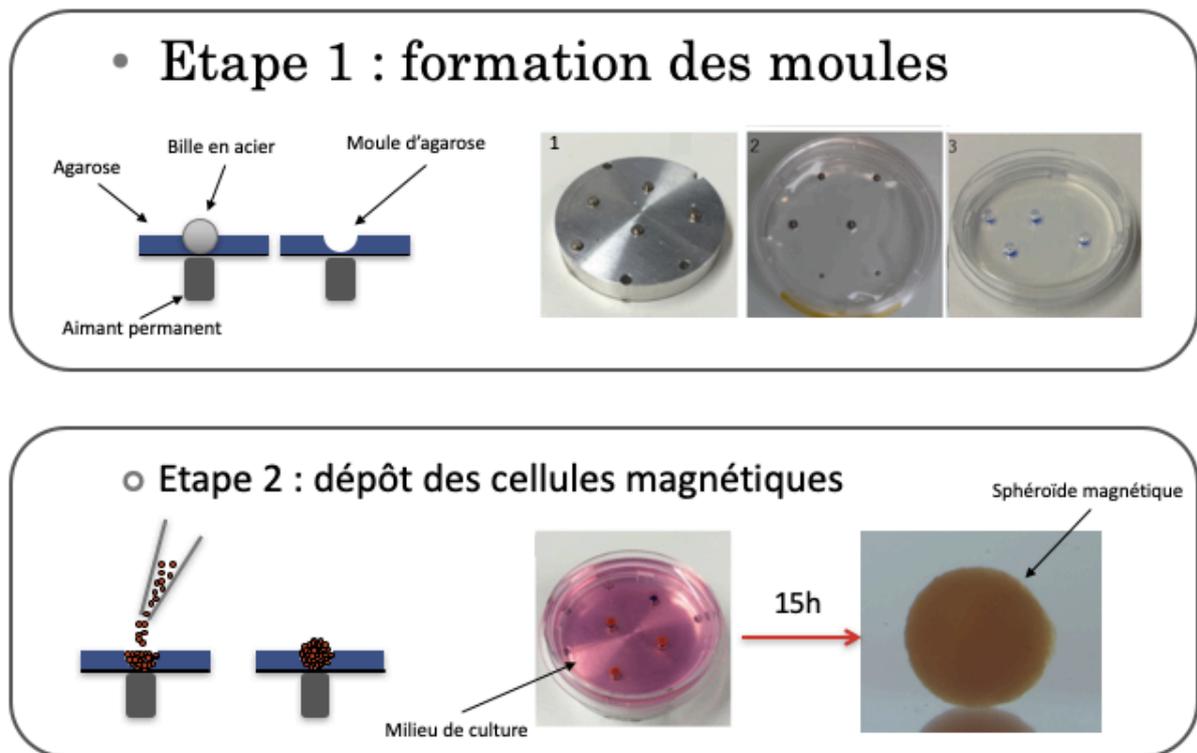


Figure 2.39. Formation des moules et dépôt des cellules.

Après refroidissement, les billes ont été enlevées donnant donc des moules semi-sphériques. Les boîtes de Petri ainsi formées ont été remplies avec 10 mL de DMEM supplémenté. Les cellules CT 26 marquées ont été détachées de la flasque T75, centrifugées et mises en suspension dans du milieu DMEM supplémenté. 250000 cellules magnétiques ont été introduites dans chaque puit. Le lendemain les agrégats ainsi formés étaient suffisamment cohésifs pour être retirés des puits.

Ainsi ont été obtenus des agrégats sphéroïdaux avec un diamètre de $878 \pm 54 \mu\text{m}$. En supposant que les sphéroïdes étaient « symétriques » le volume des sphéroïdes marqués (MAG+) et non marqués (MAG-) était calculé selon le théorème de Guldin : $V_{\text{spheroid}} =$

$2\pi S_{1/2}d$. $S_{1/2}$ est la surface de la demi-sphère écrasée, d est la distance entre le centre de masse de la demi-sphère (baricentre) et l'axe de rotation du sphéroïde (axe de symétrie).

Exemples de sphéroïdes obtenus par moulage magnétique

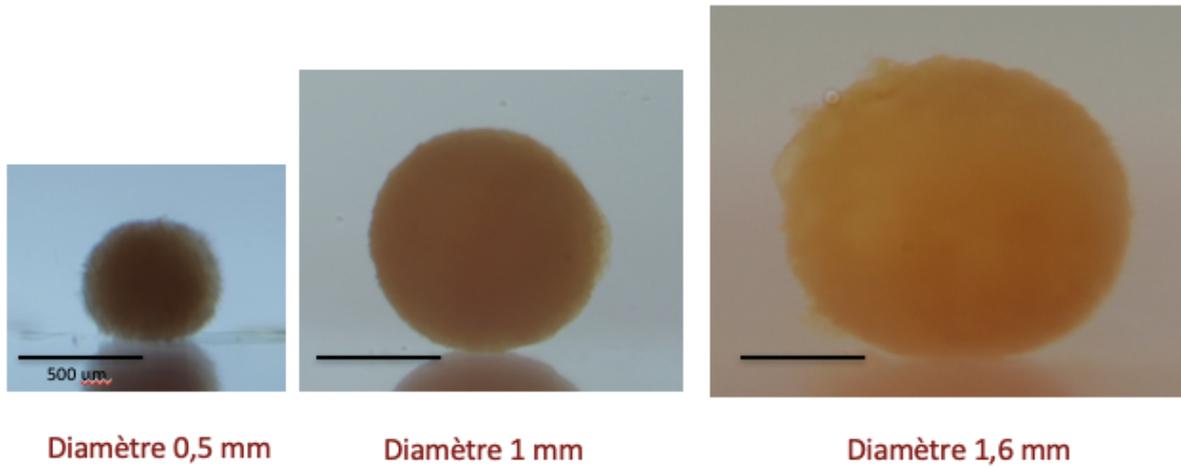


Figure 2.40. Sphéroïdes de tailles différentes.

2.2.6. Autre méthode de formation des sphéroïdes : goutte pendante

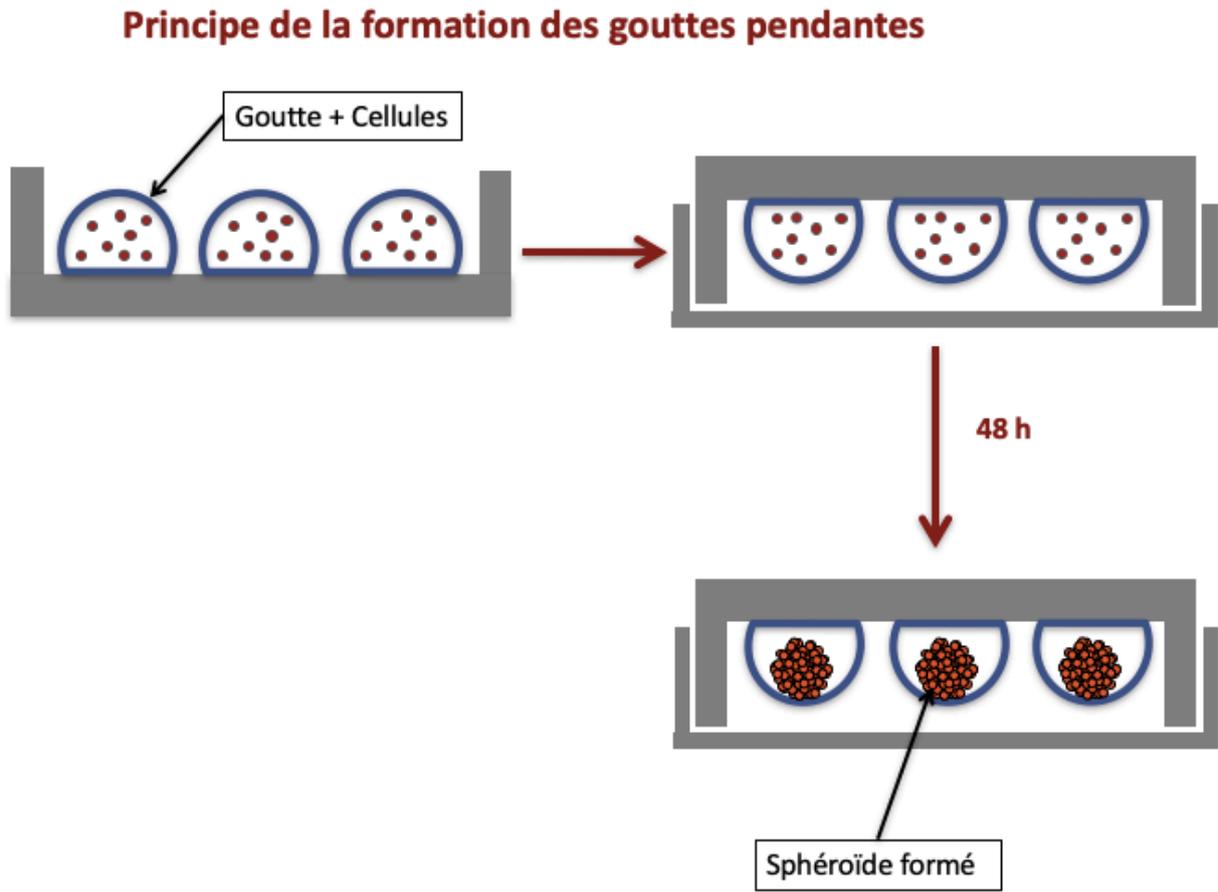
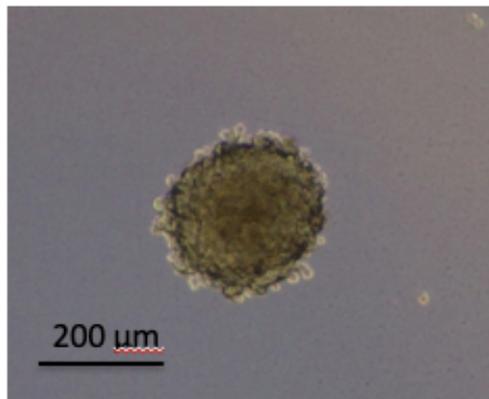
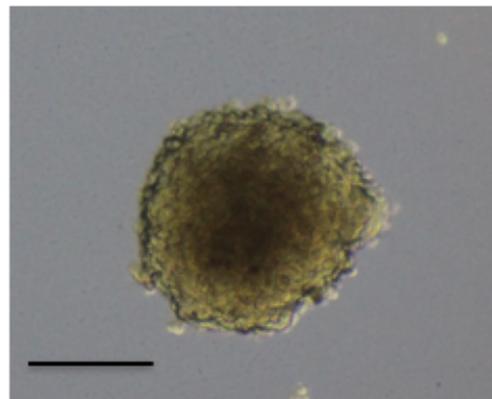


Figure 2.41. Méthode de formation des sphéroïdes par goutte pendante.

Exemple de sphéroïdes obtenus par goutte pendante



500 cellules



2000 cellules

Figure 2.42. Sphéroïdes de 500 et 2000 cellules

2.2.7. Dernière méthode de formation des sphéroïdes par pointe magnétique

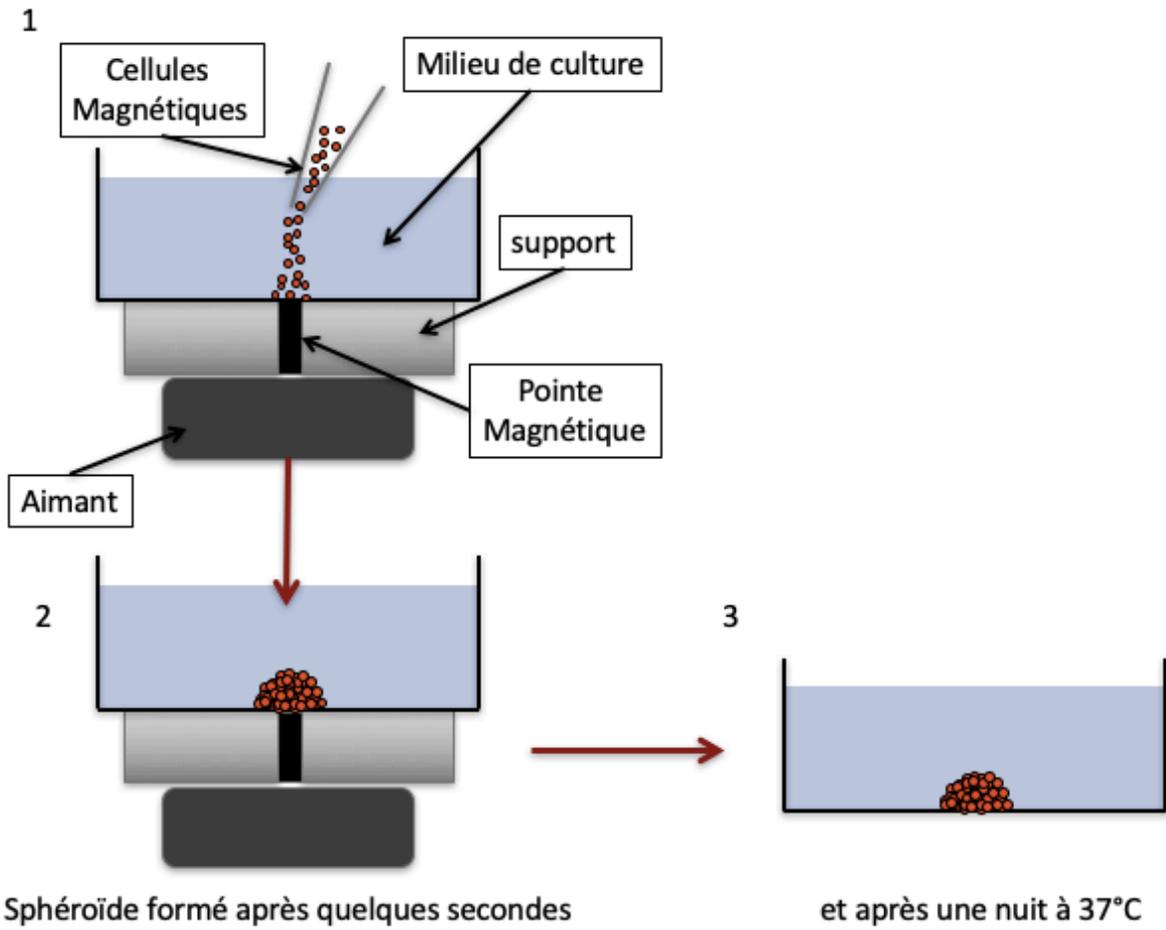


Figure 2.43. Formation des sphéroïdes par pointe magnétique.

2.2.8. Compression magnétique des sphéroïdes marqués

Des aimants cylindriques de 6 x 6 mm (Supermagnete) ont été collés (Colle Silicon, LOCTITE SI 5398) en dessous de boîtes de Petri stériles.

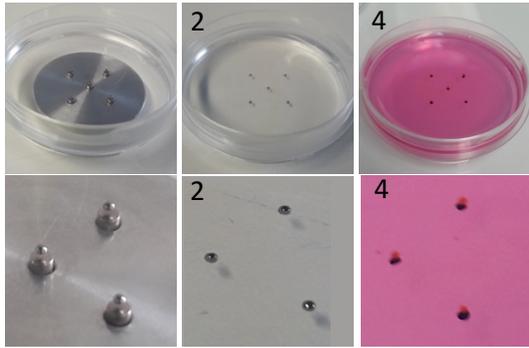


Figure 2.44. Aimants dans boîtes de Petri.

Ces boîtes sont moins adhérentes que des boîtes de cultures classiques. La colle est sèche après 24 heures, permettant de mobiliser plus facilement cette chambre de compression faite « maison ». En comparaison à des boîtes de Petri avec un fond en verre, l'épaisseur de « nos » boîtes (à peu près 1 mm) n'a pas d'impact sur la déformation magnétique des sphéroïdes (données non rapportées).

Après une nuit de culture, les sphéroïdes moulés magnétiquement ont été retirés des puits et mis en culture avec (sphéroïdes MAG+) ou sans (sphéroïdes MAG-) aimants.

Pour les 2 conditions d'expérimentation, les sphéroïdes étaient cultivés dans un incubateur (37°C, 5% de CO₂) avec 2 ml de milieu DMEM complété.

Pour quantifier la déformation des sphéroïdes MAG+, un aimant mobile était placé en dessous d'une chambre de culture faite au laboratoire. La chambre de culture possède une façade vitrée permettant de visualiser cette déformation. Le plancher de la chambre est percé, ici est utilisé le même matériel que pour les boîtes de Petri de culture.

La température de la chambre était contrôlée et maintenue à 37°C par 2 tuyaux à travers lesquels passait de l'eau contrôlée. La chambre était remplie avec du milieu complétement blanc DMEM et le pH était tamponné avec une solution d'HEPES.

Un sphéroïde était introduit dans la chambre, vers la partie non adhérente du plancher de celle-ci puis l'aimant était approché rapidement de la face externe du plancher.

La compression des sphéroïdes MAG+ a été mesurée en utilisant un appareil photo maintenu par un dispositif fait au laboratoire.

La déformation des sphéroïdes à une petite échelle de temps a été mesurée avec une photographie toutes les 5 secondes pendant les 10 premières minutes.

Puis à plus long terme, les sphéroïdes étaient photographiés toutes les heures. Les sphéroïdes MAG- ont été photographiés toutes les heures avec un microscope (LEYCA, objectif x4), puis remis dans l'incubateur après chaque prise.

2.2.9. Etablissement de la durée de compression pour les expérimentations

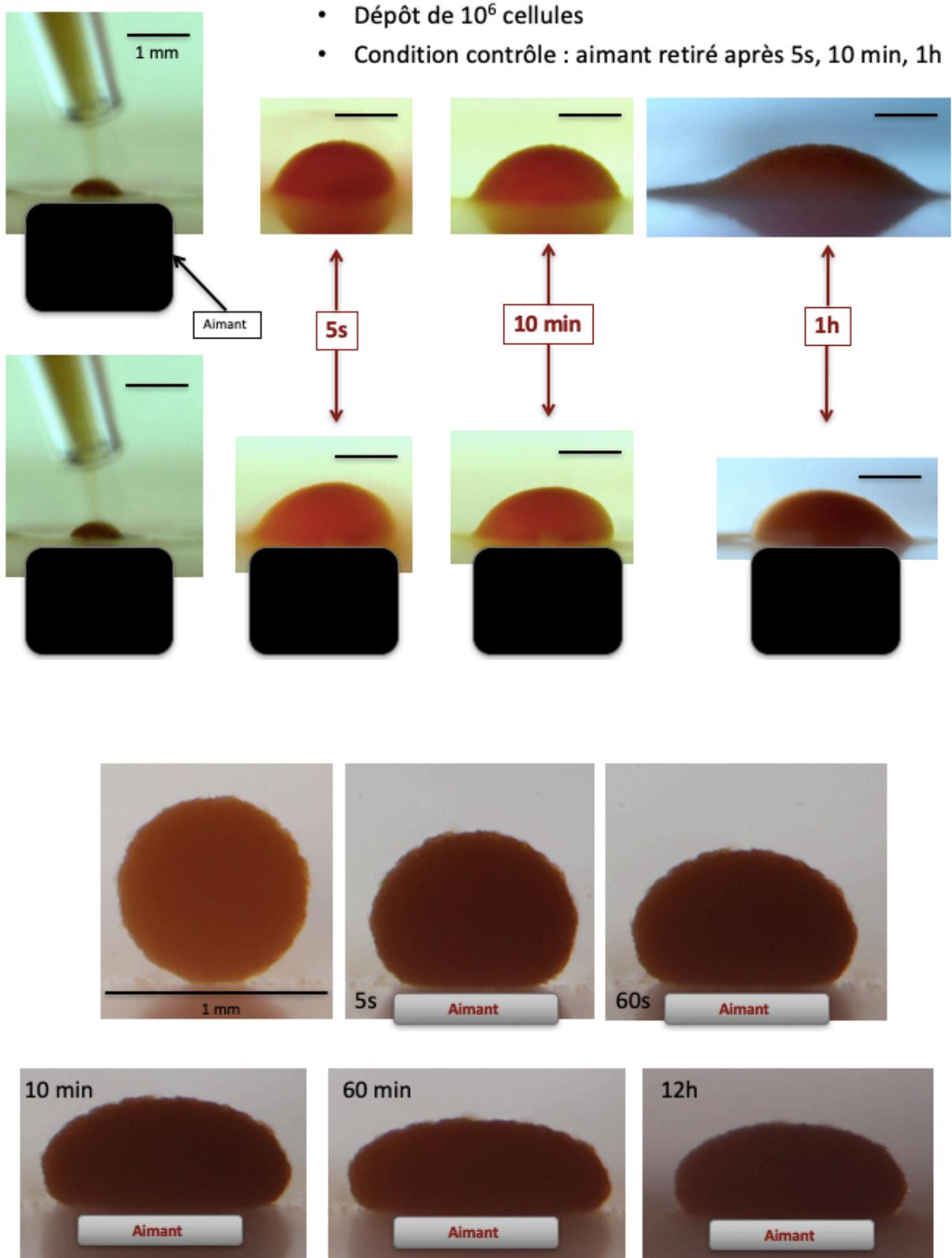
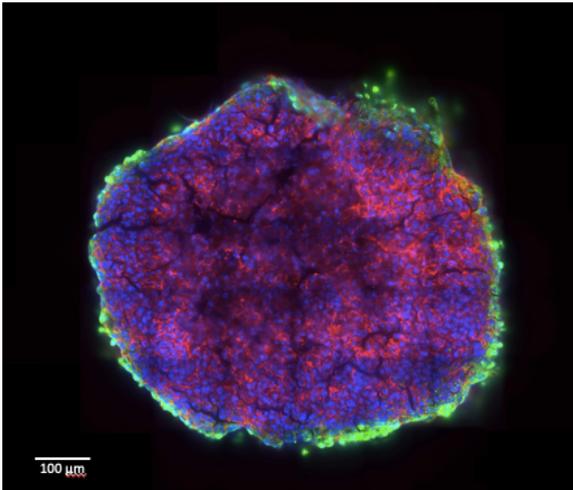


Figure 2.45. Différentes durées de compression des sphéroïdes par aimants.

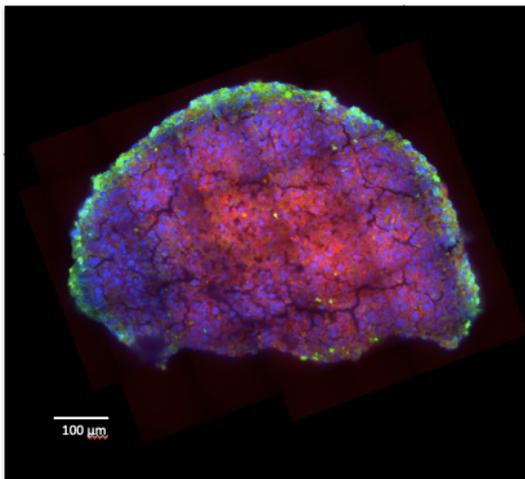
Ces premières séries de compression ont permis de montrer que la compression devait être prolongée dans le temps, au moins 12 heures afin d'avoir une déformation maximale des sphéroïdes.

Exemples de différentes durées de compression relaxations

- Agrégat laissé libre 24h



- Agrégat écrasé 24h



- Agrégat écrasé 24h puis laissé en relaxation 24h

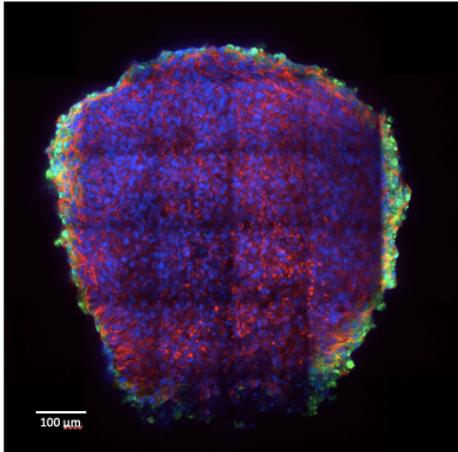


Figure 2.46. Exemples de sphéroïdes écrasés sous différentes conditions.

Le fait de relâcher la compression magnétique avait tendance à redonner au sphéroïde sa forme initiale, ainsi il avait été convenu qu'il fallait absolument diminuer au maximum le temps entre la fin de la compression et les expérimentations visant à étudier l'effet de celle-ci sur l'évolution tumorale (in vitro ou in vivo).

Choix entre les sphéroïdes de 0,5 mm et de 1 mm en fonction du changement de morphologie suite à la déformation magnétique.

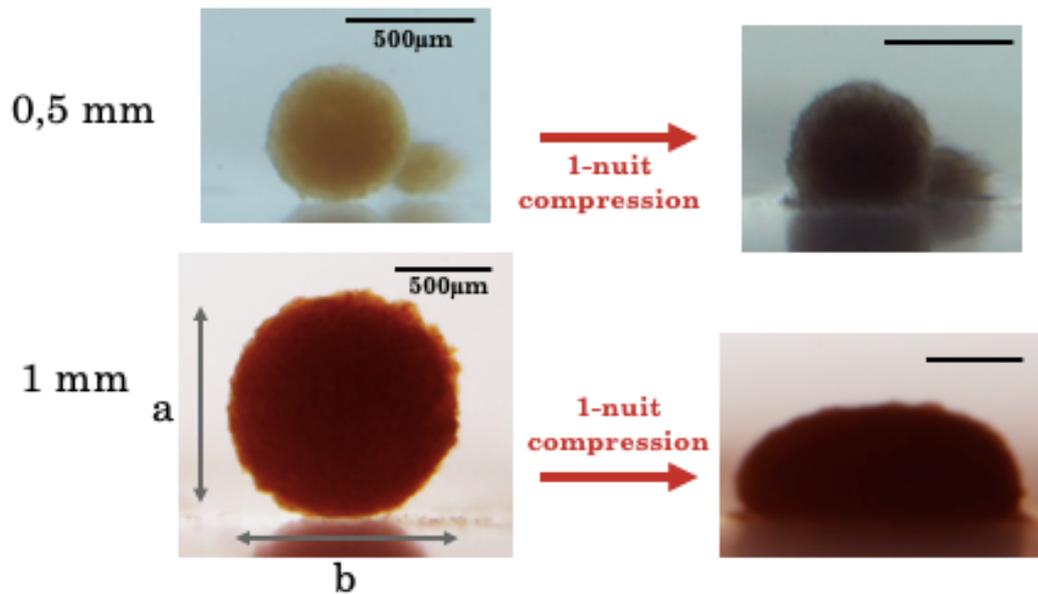


Figure 2.47. Sphéroïdes de 0,5 et 1 mm après une nuit de compression.

Sur des critères uniquement morphologiques, une nuit de compression avait tendance à engendrer une déformation plus importante sur des sphéroïdes de 1 mm versus de 0,5 mm.

	0,5 mm		1 mm	
	libre	comprimé	libre	comprimé
a (µm)	461	410	960	490
b (µm)	468	468	940	1024
Surface (mm ²)	0,18	0,17	0,74	0,57

Déformation après une nuit de compression magnétique

	0,5 mm	1 mm
hauteur	~ 10 %	~ 50 %
surface	~ 5 %	~ 20 %

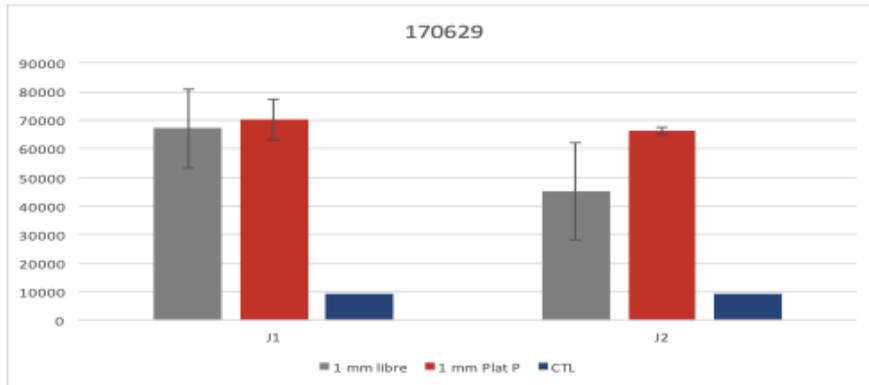
Tableau 2.3. Caractéristiques morphologiques des sphéroïdes de 0,5 et 1 mm après 1 nuit de compression.

Cette tendance était confirmée lorsque les dimensions et la surface des sphéroïdes étaient mesurées après une nuit de compression.

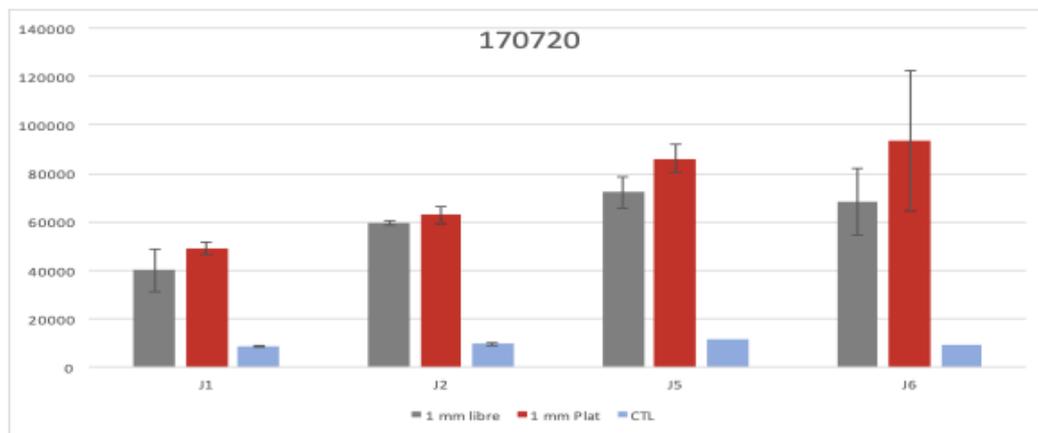
Ainsi les sphéroïdes de 1 mm paraissent subir les déformations morphologiques les plus importantes suite à une compression magnétique.

2.2.10. Mesure de l'effet de la compression grâce au test bleu alamar avec les différentes méthodes de formation des agrégats

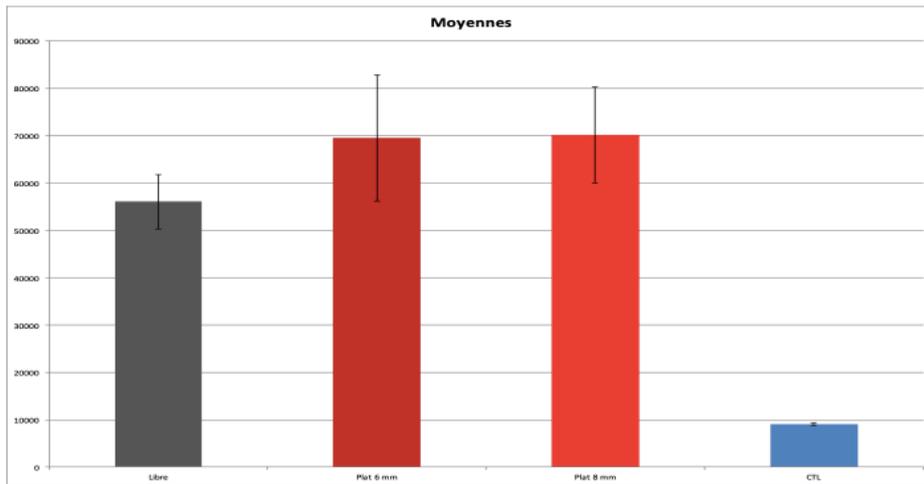
-Tests avec des sphéroïdes de 1mm (moulage magnétique)



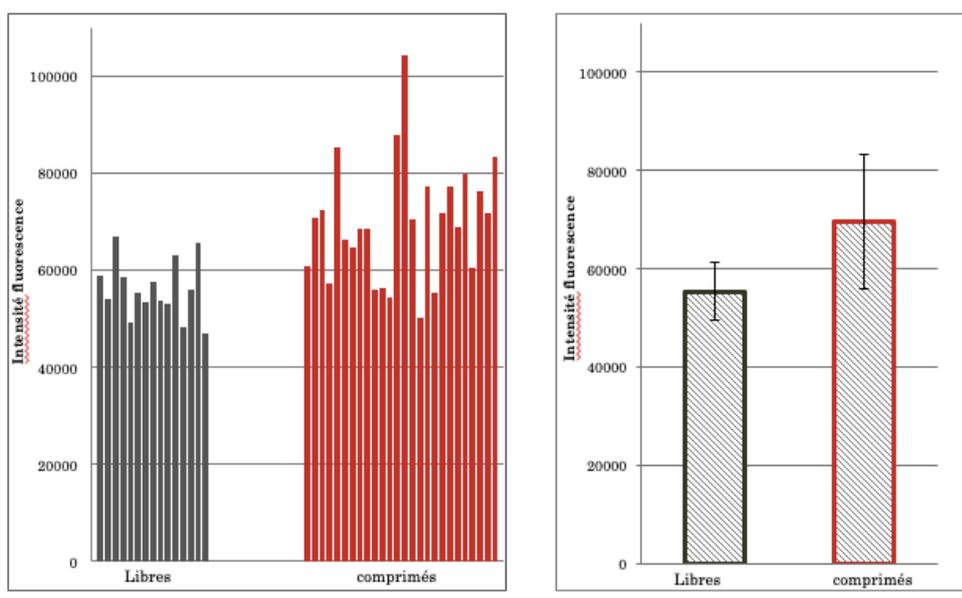
Sphéroïdes de 1mm (2 agrégats par condition), écrasement avec aimant de 6 mm, sur substrat plastique (Plat P).



Sphéroïdes de 1 mm, écrasement avec aimant de 6 mm, sur substrat plastique (Plat P)



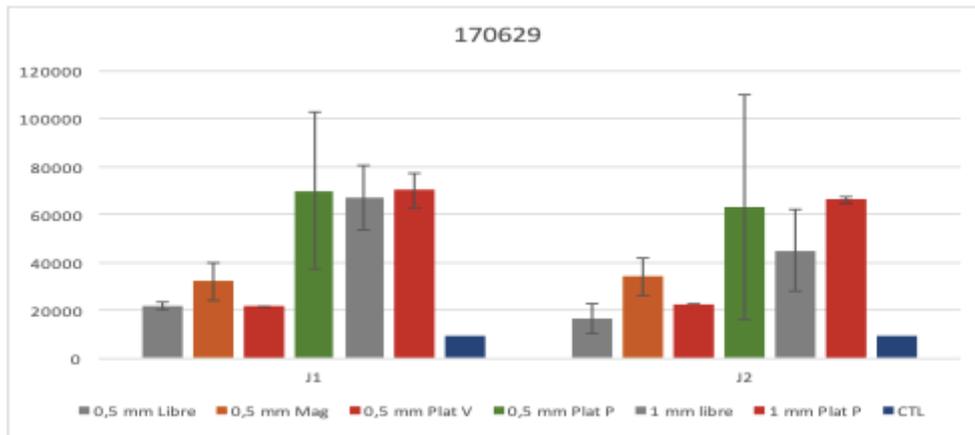
Sphéroïdes de 1 mm (15 par conditions) sur fond plastique avec aimants de 6 et 8 mm et écrasement 48 heures.



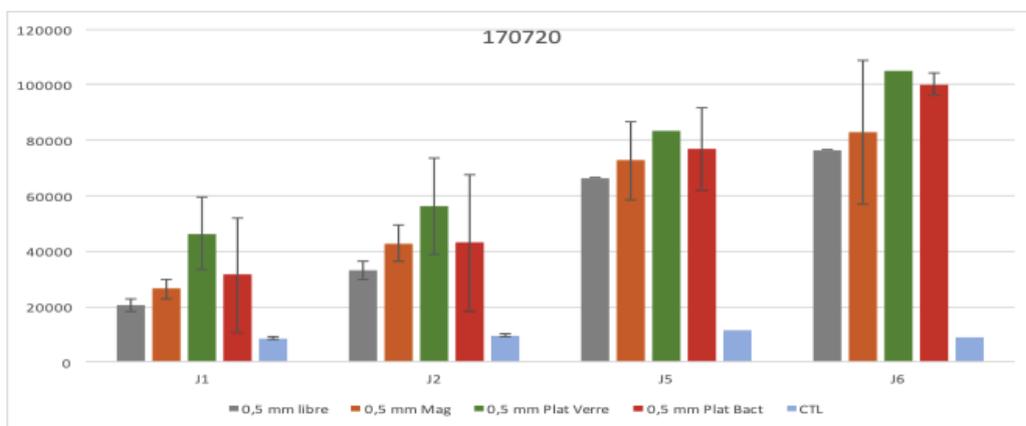
Sphéroïdes de 1 mm à J3 libres et comprimés, test bleu alamar (prolifération).

La prolifération cellulaire, évaluée par le test bleu alamar, a tendance à augmenter avec la durée de compression des sphéroïdes de 1 mm.

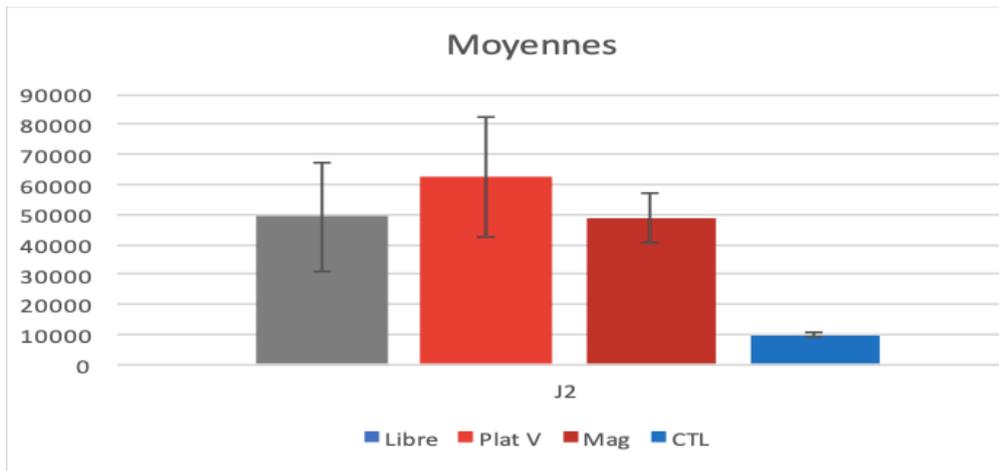
-Tests avec des sphéroïdes de 0,5 mm (moulage magnétique)



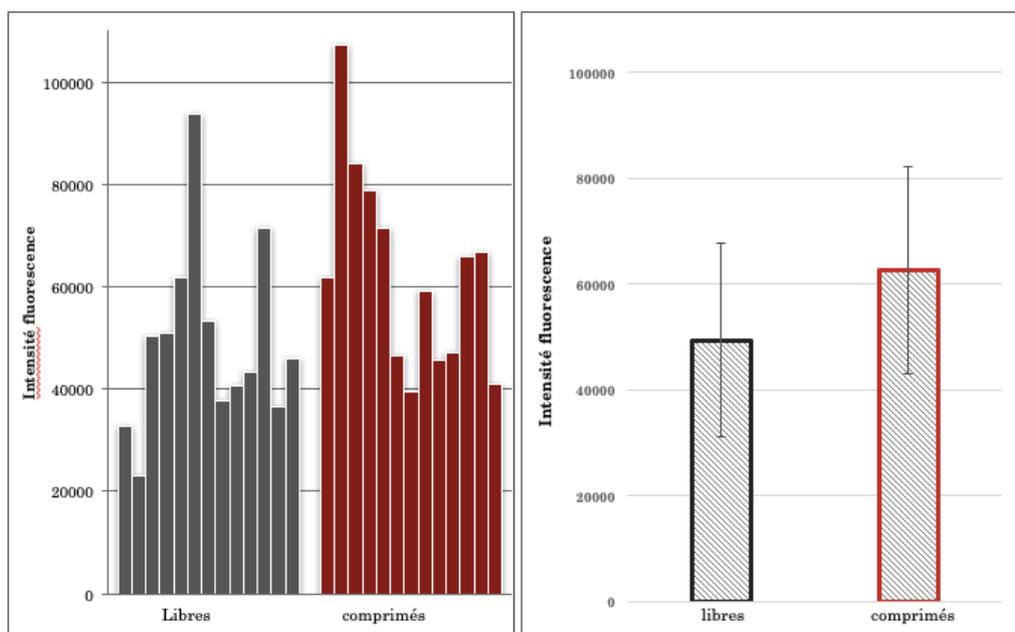
Sphéroïdes de 0,5 mm et 1 mm (2 agrégats par condition), écrasement par pointe magnétique (Mag), aimant de 6 mm sur verre (Plat V) ou boîte bactériologique (PlatP).



Sphéroïdes de 0,5 mm, écrasement par pointe magnétique (Mag), aimant de 6 mm sur verre (Plat Verre) ou boîte bactériologique (Plat Bact).



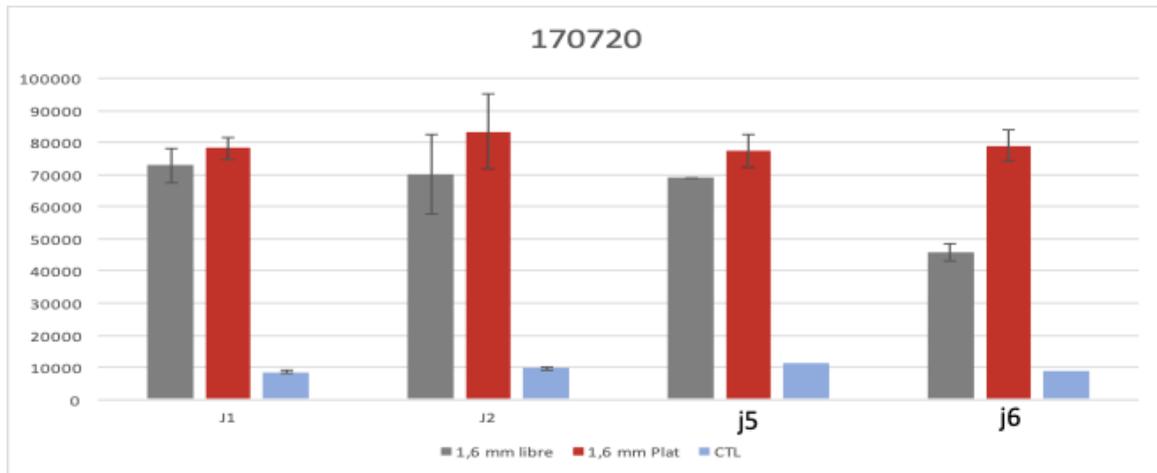
Sphéroïdes de 0,5 mm (13 agrégats par condition), écrasés pendant 48 heures avec aimants de 6 mm sur fond verre (Plat V) ou fond verre avec pointes magnétiques (Mag)



Sphéroïdes de 0,5 mm libres et comprimés à J3, test bleu alamar (prolifération)

Comme pour les sphéroïdes de 1 mm, l'augmentation de la durée de compression magnétique a tendance aussi à augmenter le caractère prolifératif (test bleu alamar) des sphéroïdes de 0,5 mm.

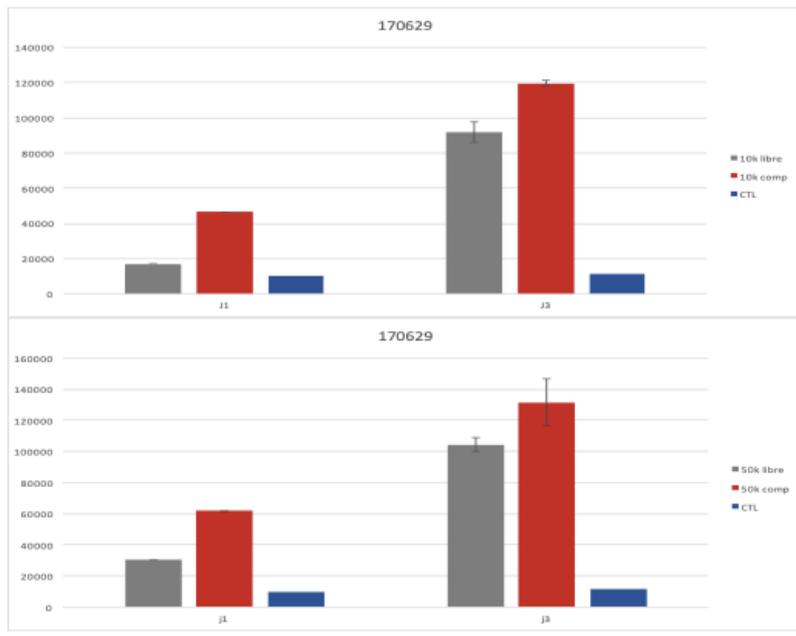
Tests avec des sphéroïdes de 1,6 mm (moulage magnétique)



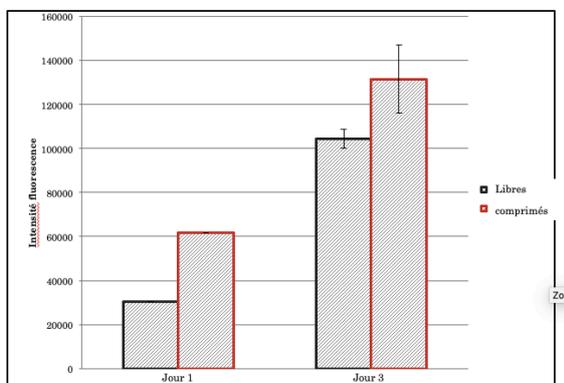
Sphéroïdes de 1,6 mm, écrasement avec aimant 6 mm, sur substrat plastique (Plat P)

Les expérimentations réalisées avec les sphéroïdes de 1,6 mm n'ont pas montré de franche augmentation de la prolifération cellulaire en fonction de la durée de compression magnétique.

-Tests avec dépôt de 10000 et 50000 cellules sur pointe magnétique



Dépôt de 10000 et 50000 cellules sur pointes magnétiques (6 agrégats par puit) avec écrasement de quelques minutes puis retrait des aimants (libres) et écrasement constant (Comp ou Mag).



Dépôt de 50000 cellules sur pointe magnétique avec agrégats libres et comprimés à 24 et 48 heures.

Ces expériences ont confirmé les résultats observés avec les sphéroïdes précédents (obtenus par moulage magnétique) avec une augmentation de la prolifération cellulaire selon la durée de compression magnétique.

2.2.11. Test de prolifération cellulaire avec le Ki67

-tests avec dépôts de 50000 cellules sur pointes magnétiques

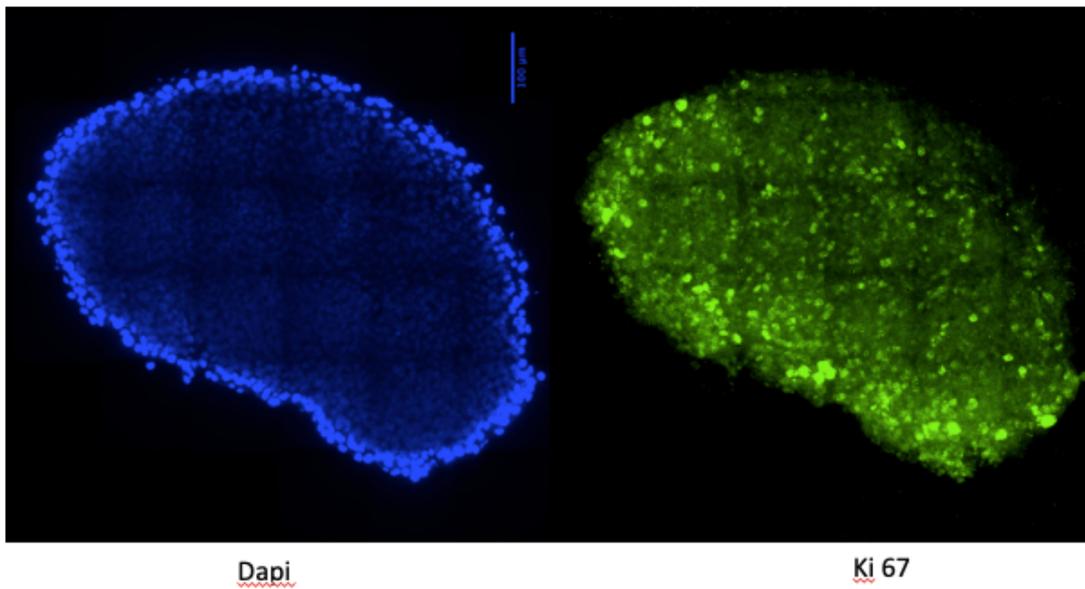


Figure 2.48. Images DAPI et Ki67 sphéroïdes à J3 sans compression.

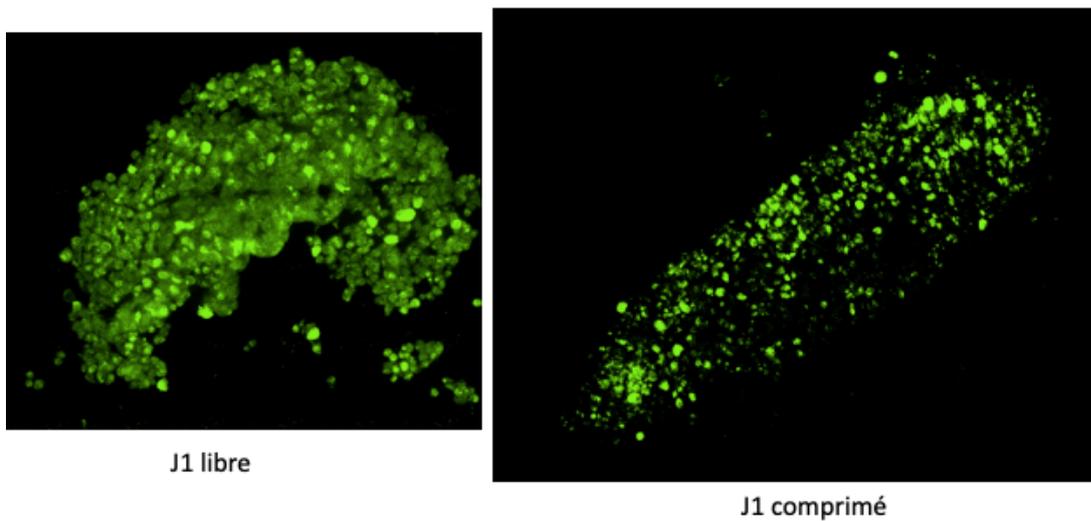


Figure 2.49. Images Ki 67 sphéroïdes à J1 avec et sans compression.

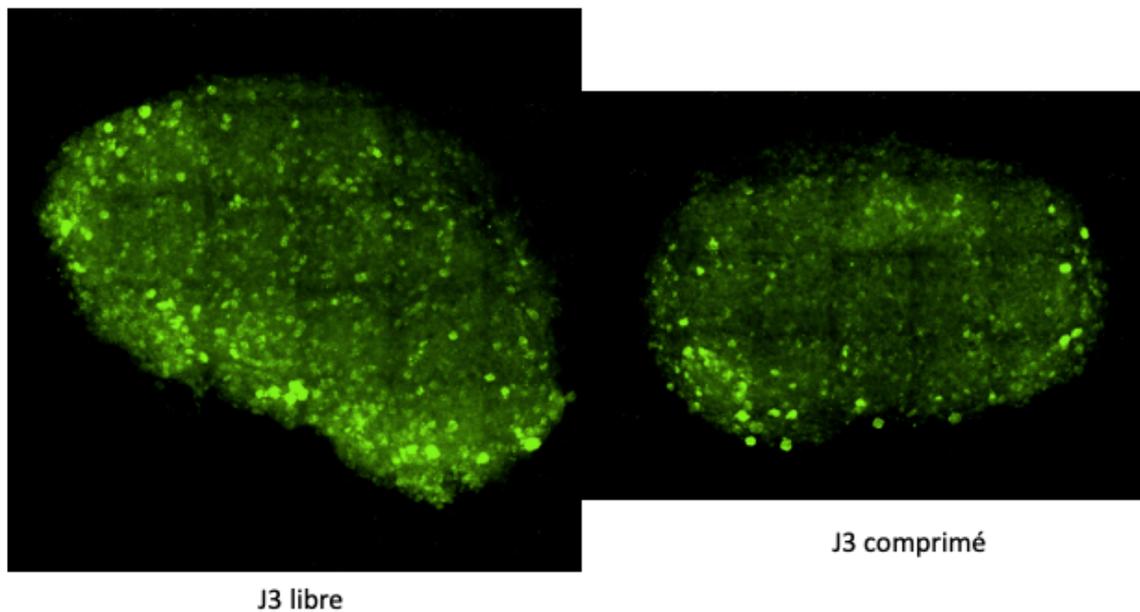


Figure 2.50. Images Ki 67 sphéroïdes à J3 avec et sans compression.

Ces images d'expression nucléaire du Ki 67 (marqueur de la prolifération cellulaire, visible en vert) n'ont pas permis d'observer de différence visuelle en fonction de la compression magnétique ou non à J1 et J3 de sphéroïdes obtenus par dépôt de 50000 cellules sur pointe magnétique.

Tests avec des sphéroïdes de 0,5 mm

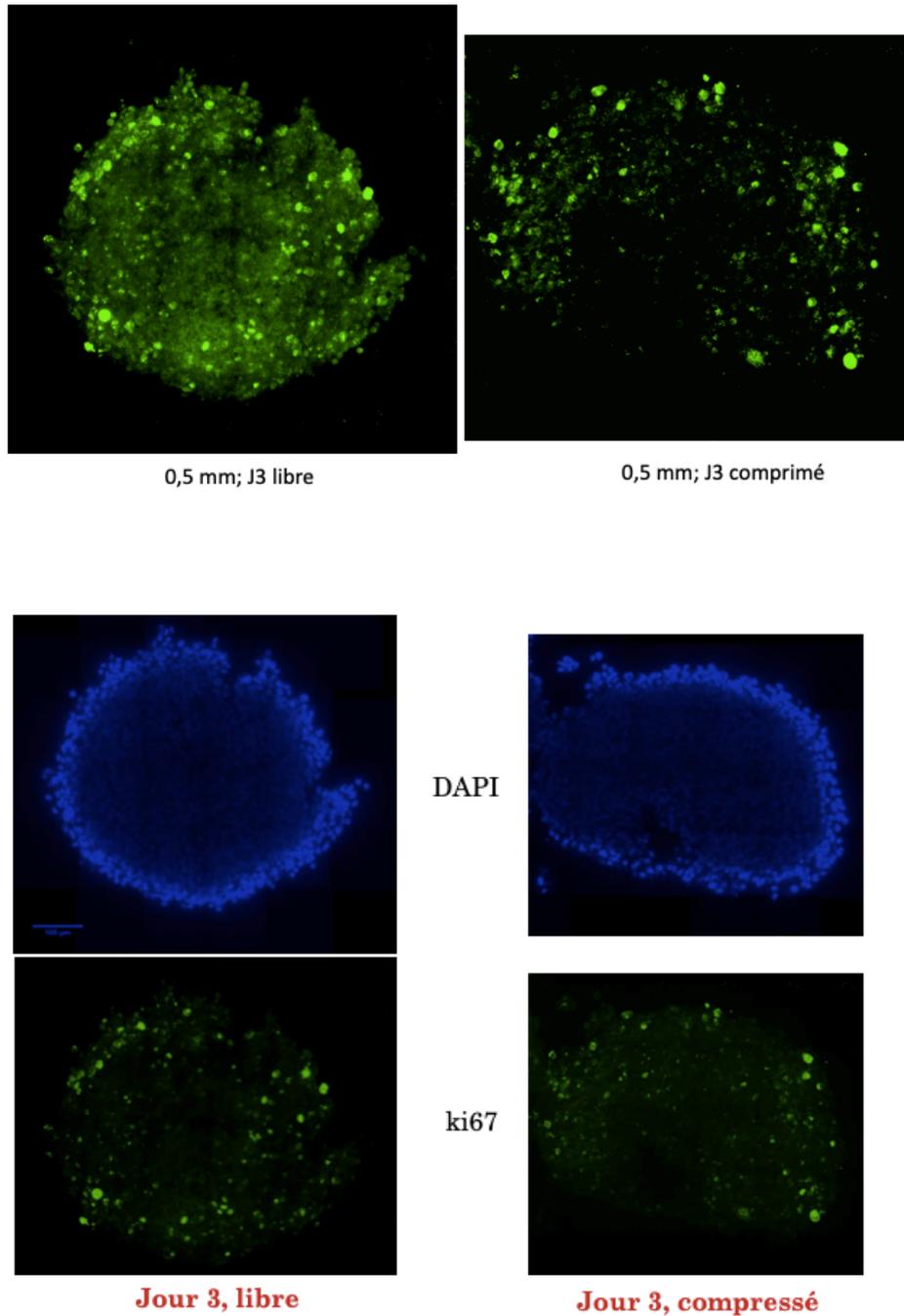


Figure 2.51. Images Ki 67 (vert) et DAPI (bleu) sphéroïdes 0,5 mm à J3 avec et sans compression.

De même, aucune différence d'expression du Ki67 n'a été observée sur ces sphéroïdes de 0,5 mm obtenus par moulage magnétique qu'ils étaient comprimés ou non pendant 3 jours.

Tests avec des sphéroïdes de 1 mm

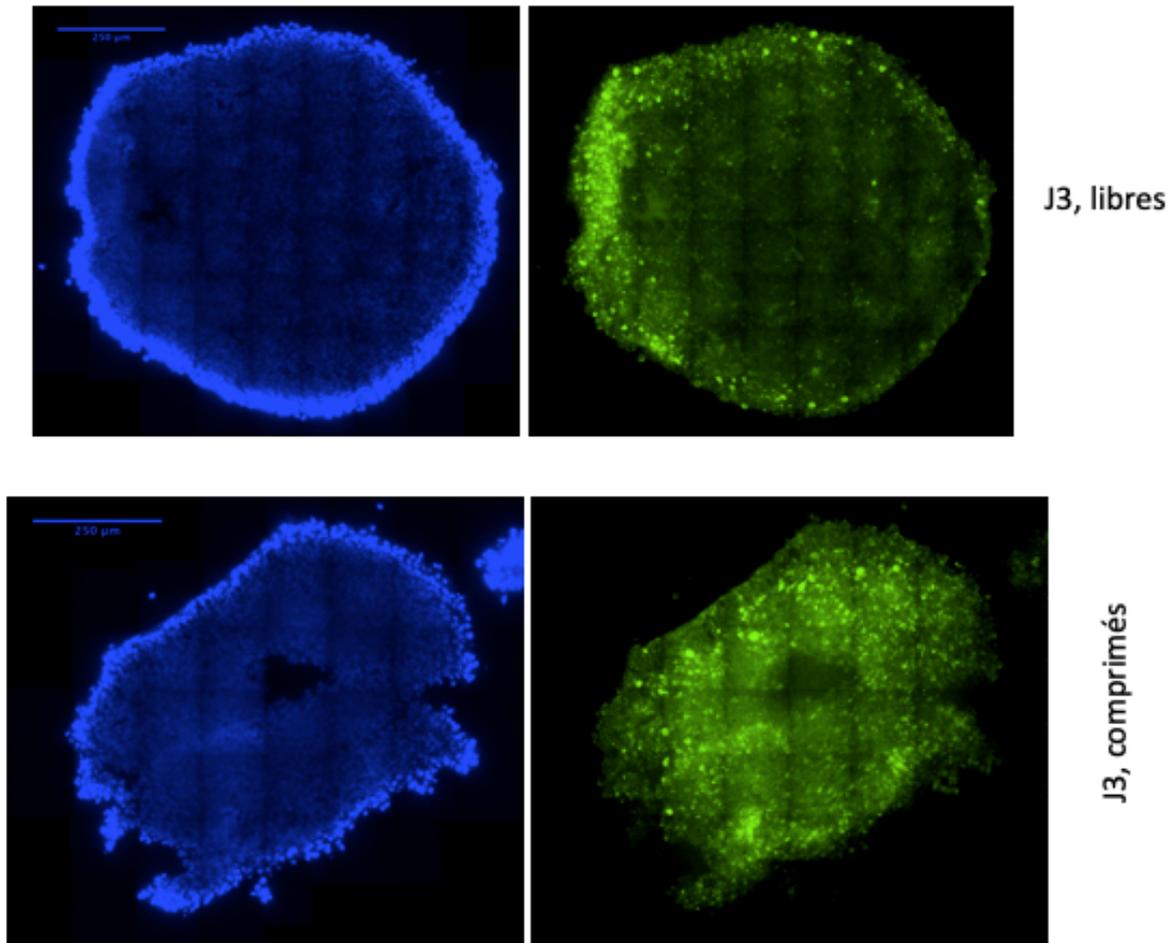


Figure 2.52. Images DAPI (bleu) et Ki67 (vert) de sphéroïdes de 1 mm à J3 avec et sans compression.

Sur ces images, on note une augmentation nette de l'expression du Ki 67 et donc de la prolifération cellulaire sur des sphéroïdes de 1 mm à J3 d'une compression magnétique par rapport à des sphéroïdes non comprimés.

2.2.12. Localisation des noyaux Ki67 +

Sphéroïdes de 0,5 mm

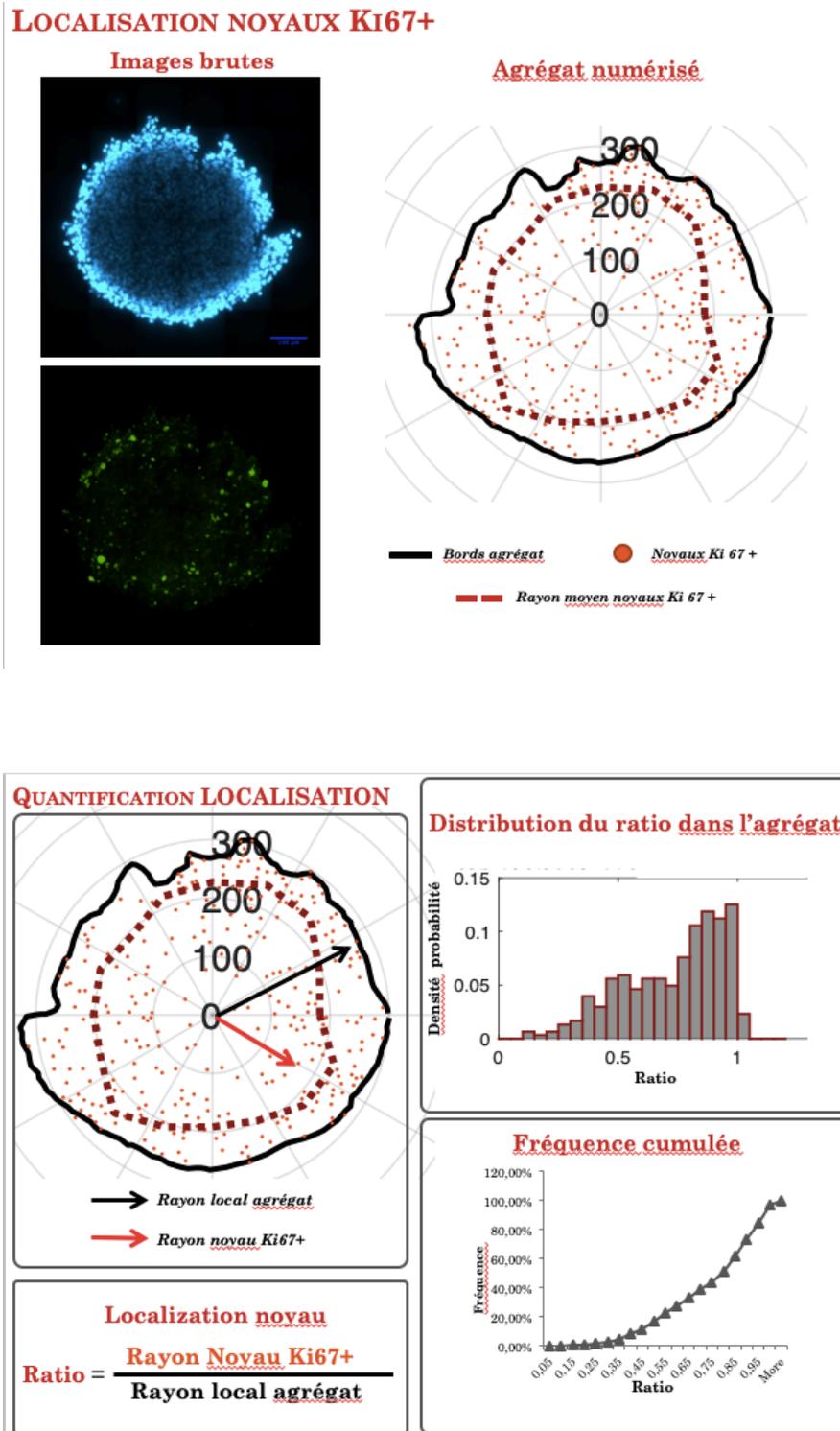


Figure 2.53. Localisation noyaux Ki67 dans des sphéroïdes de 0,5 mm.

Sphéroïdes de 1 mm

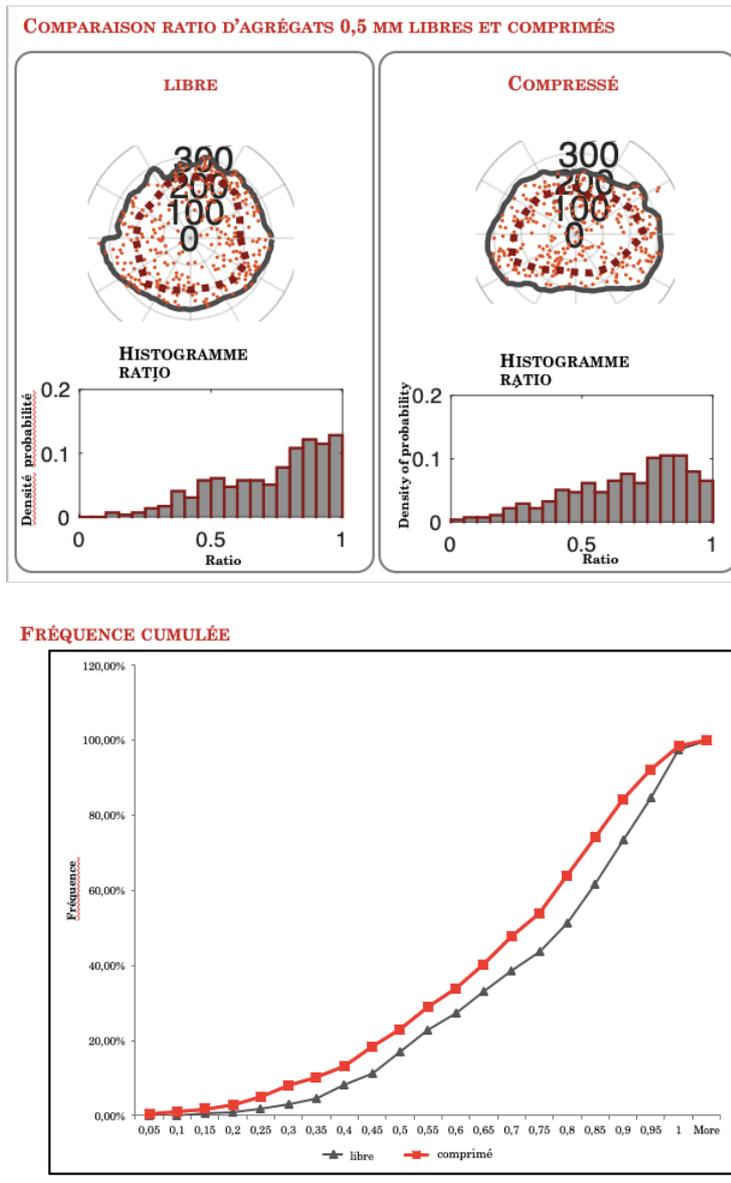
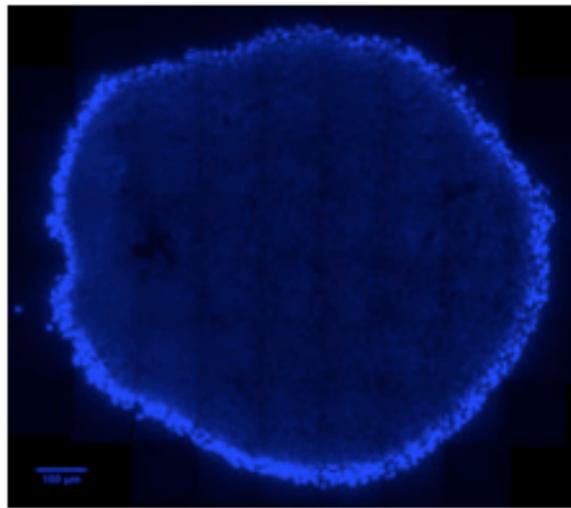


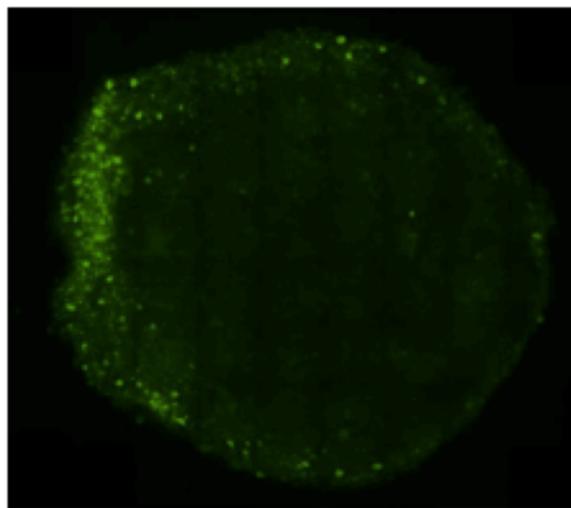
Figure 2.54. Localisation noyaux Ki67 dans des sphéroïdes de 1 mm avec et sans compression.

La compression magnétique des sphéroïdes de 1 mm redistribue la localisation des noyaux prolifératifs (Ki 67+) vers les couches plus internes de ces sphéroïdes, là où la compression est maximale par rapport aux sphéroïdes non comprimés dont les noyaux prolifératifs sont localisés en périphérie de ceux-ci.

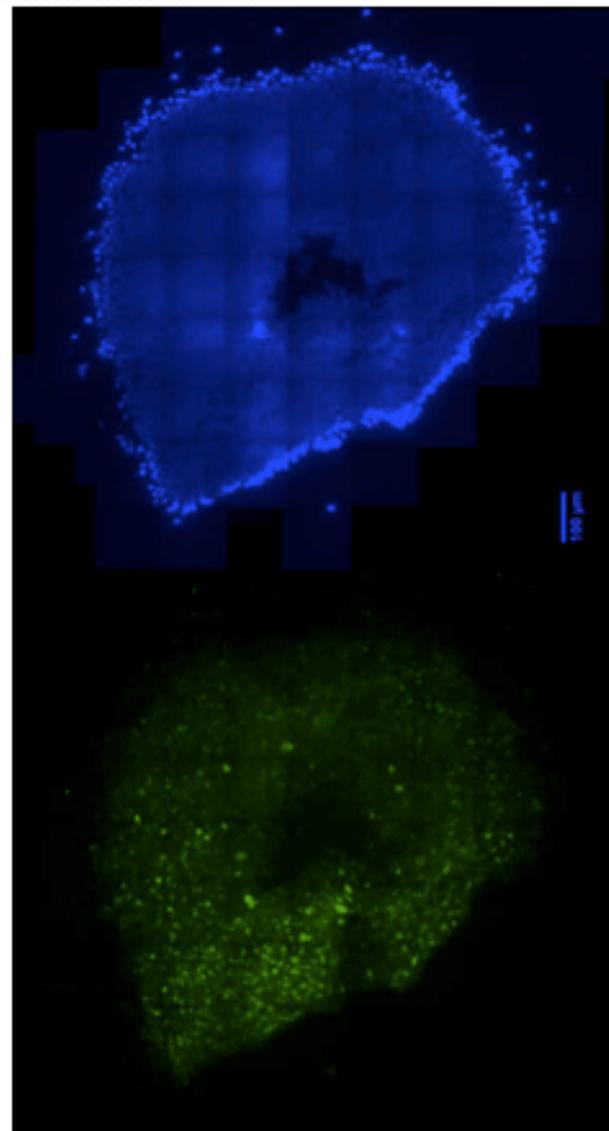
Sphéroïde 1



DAPI



libre

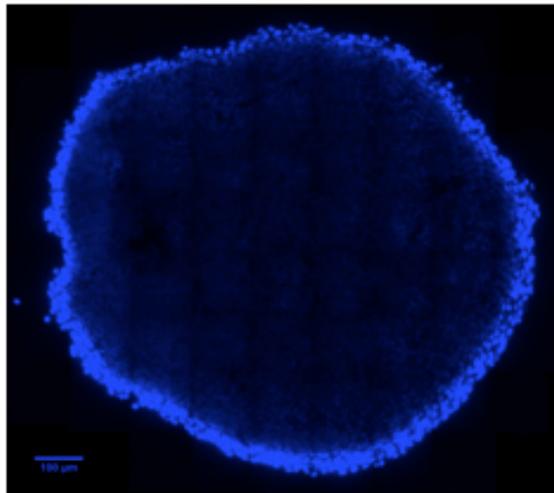


ki67

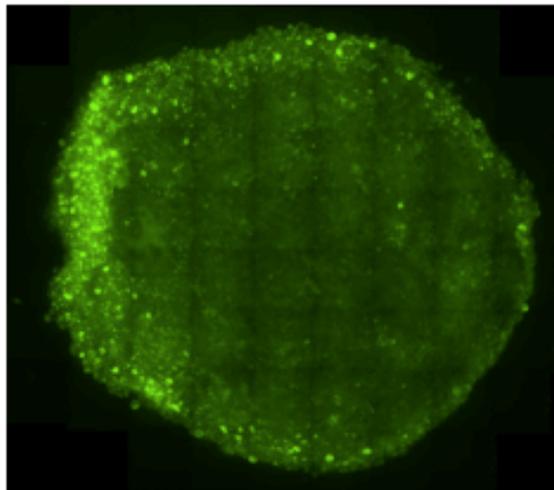
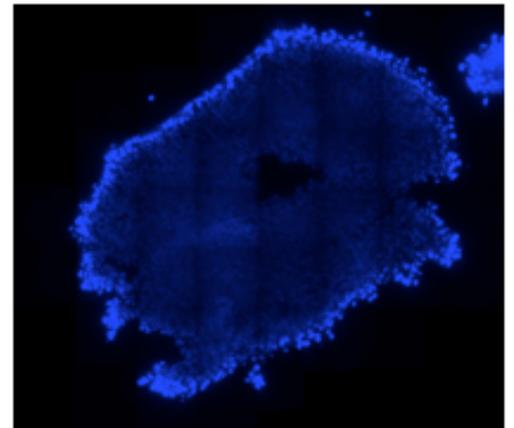
Comprimé

Figure 2.55. Images DAPI et Ki67 du sphéroïde 1 de 1 mm avec et sans compression.

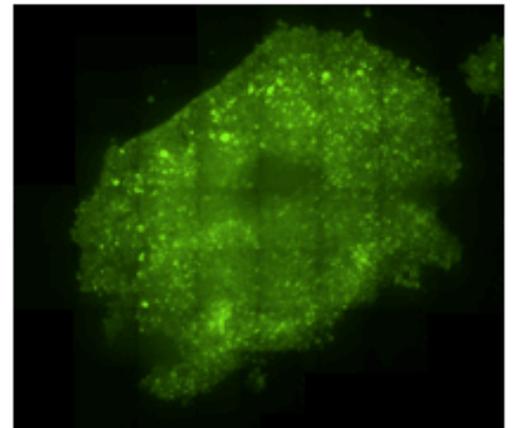
Sphéroïde 2



DAPI



ki67

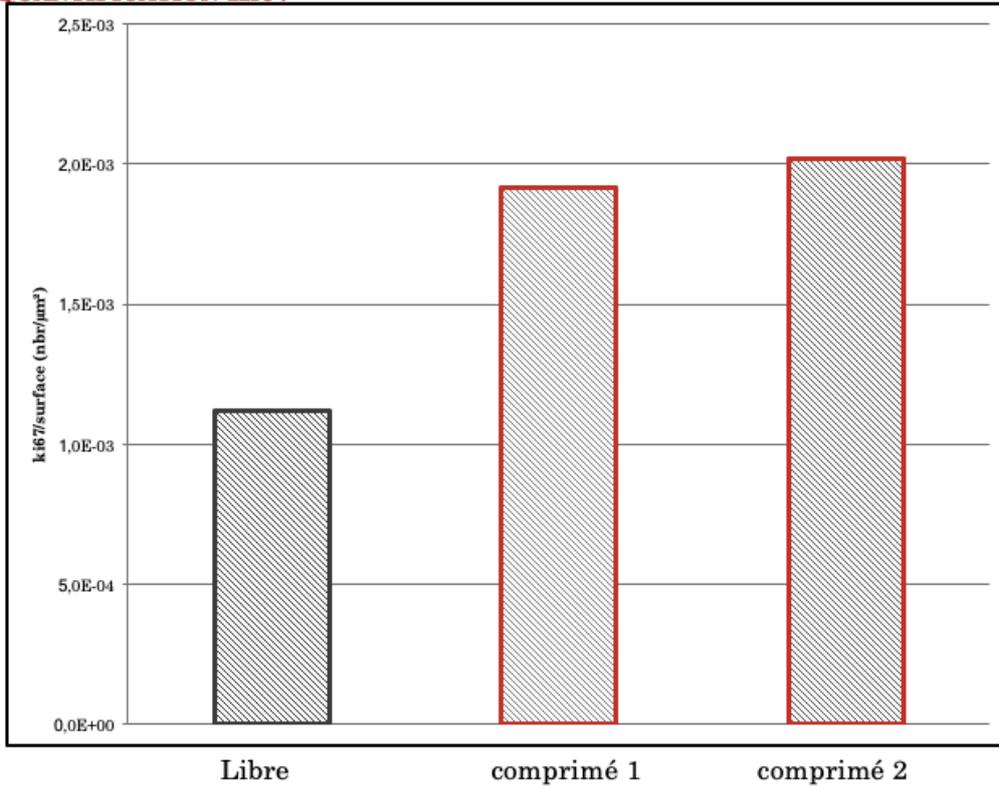


libre

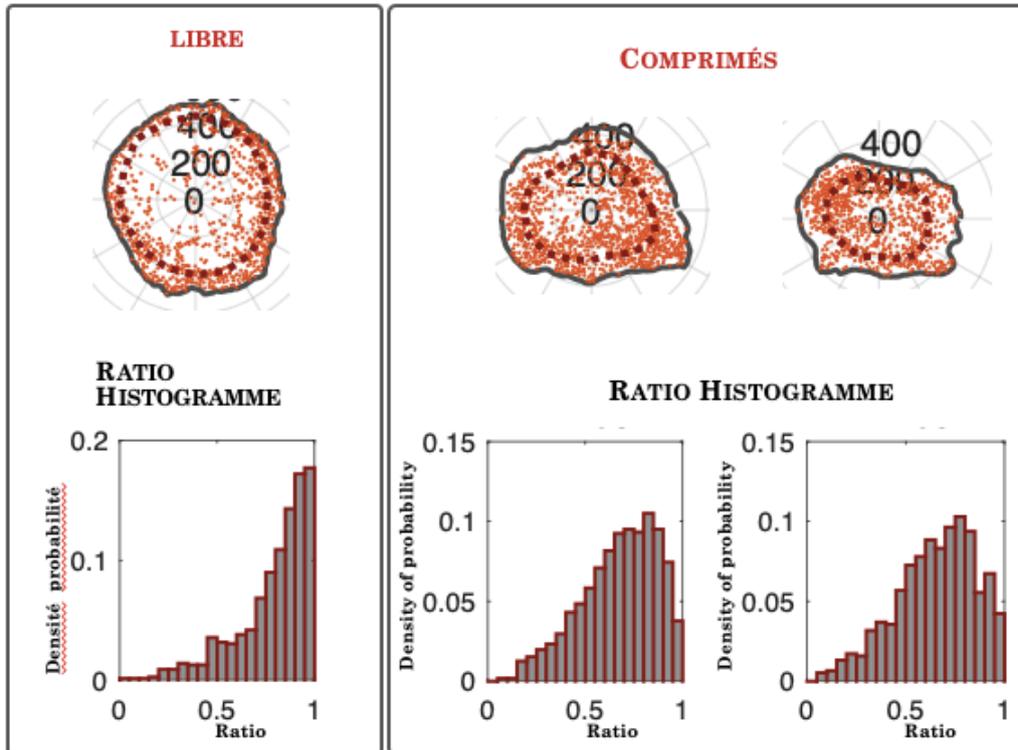
Comprimé

Figure 2.56. Images DAPI et Ki67 du sphéroïde 2 de 1 mm avec et sans compression.

QUANTIFICATION KI67



COMPARAISON RATIO



FRÉQUENCE CUMULÉE

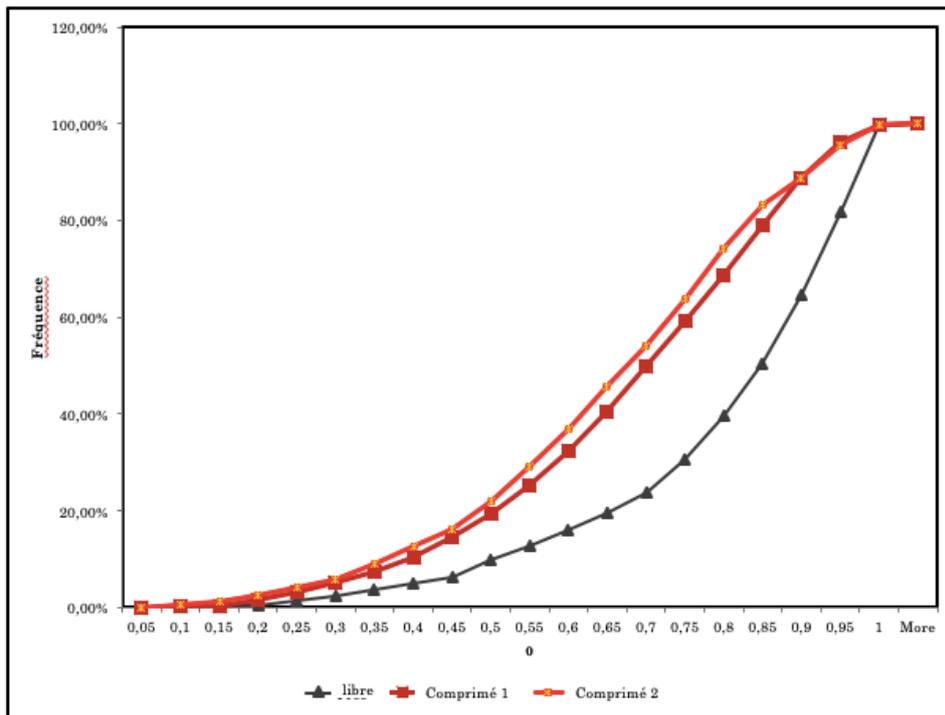
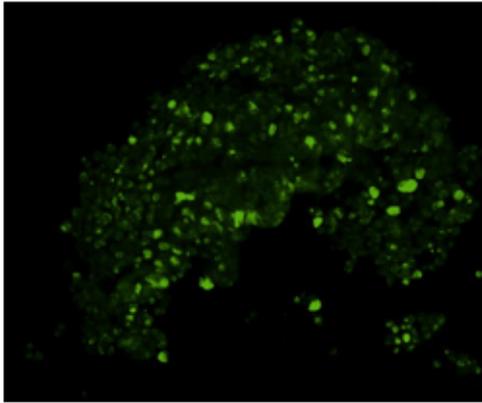


Figure 2.57. Quantification noyaux Ki67 de sphéroïdes de 1 mm avec et sans compression.

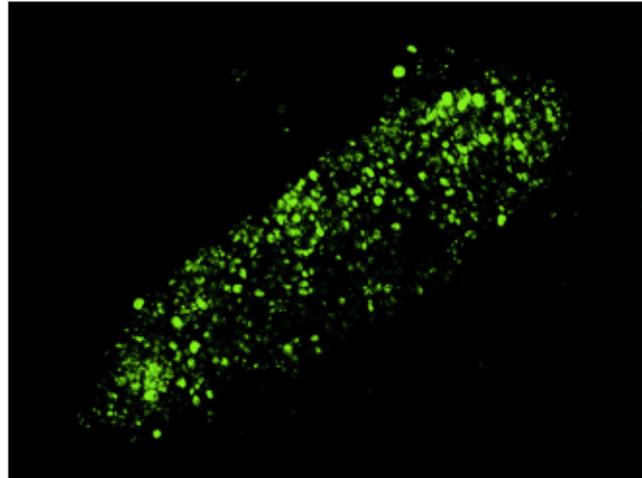
La répétition des expériences de compression magnétique des sphéroïdes de 1 mm a confirmé les résultats retrouvés plus haut à savoir une augmentation de la prolifération cellulaire dans les couches internes des sphéroïdes où la compression était maximale.

Dépôt de 50000 cellules sur pointe magnétique

Compression pendant 24 heures



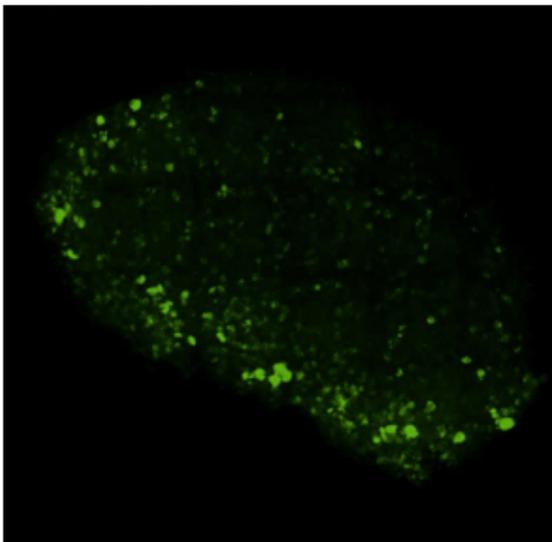
libre



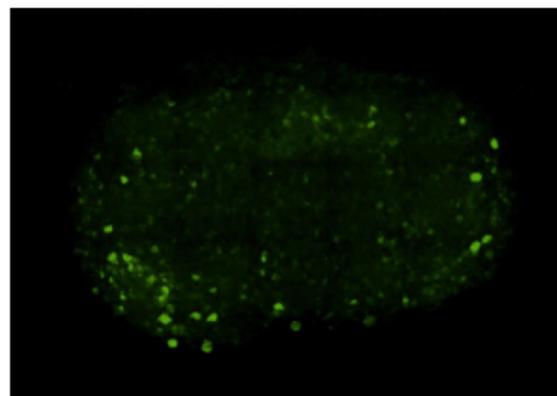
Comprimé

Figure 2.58. Sphéroïde 50000 cellules à J1 avec et sans compression.

Compression pendant 72 heures



libre



Comprimé

Figure 2.59. Sphéroïde 50000 cellules à J3 avec et sans compression.

QUANTIFICATION Ki67

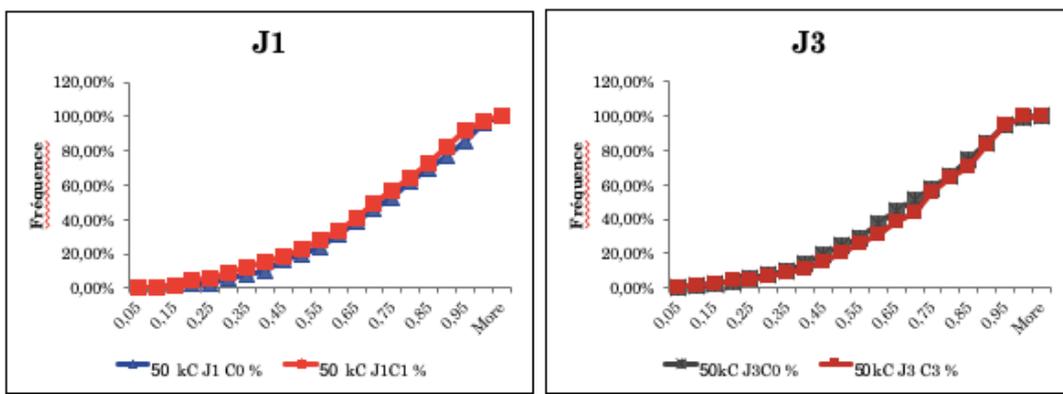
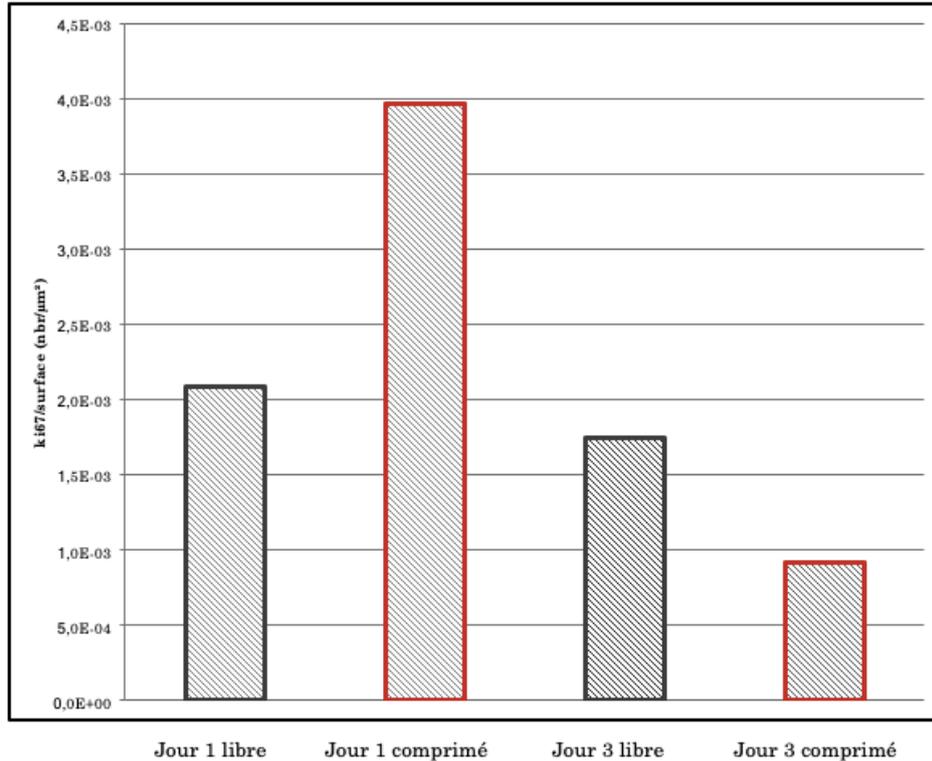


Figure 2.60. Quantification noyaux Ki67 de sphéroïdes 50000 cellules à J1 et J3 avec et sans compression.

Aucune différence de prolifération cellulaire n'a été observé suite à la compression magnétique de sphéroïdes formés par dépôt de 50000 cellules sur pointe magnétique.

2.2.13. Cryosection et immunofluorescence

Les sphéroïdes ont été fixés avec du paraformaldéhyde (PFA 4%, dans du PBS, Alfa Aesar, référence J61899) pendant 1 heure à la température ambiante de la pièce (RT), puis conservés dans du PBS à 4°C. Les sphéroïdes MAG+ ont été fixés en présence de l'aimant.

Afin de réaliser la cryosection (section à froid) des sphéroïdes, ils ont été inclus dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature compound, VWR chemicals, référence 361603E) pendant 1 heure à température ambiante de la pièce. Ensuite ils ont été congelés dans de l'isopentane (GPR Rectapur, VWR référence 24872.260) puis plongés dans de l'azote liquide et conservés à -20°C pendant toute une nuit.

Le lendemain, les agrégats étaient coupés en tranches de 20 µm avec un cryostat. Les tranches étaient déposées sur des lames adhérentes en verre (Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific, référence J3800AMNZ) et conservés à -20°C.

Les échantillons étaient ensuite préparés pour l'immunofluorescence. Les échantillons de cryosections étaient perméabilisés avec du Triton (Sigma-Aldrich, Triton X-100, dilution 1/1000 dans du PBS) pendant 15 minutes à température ambiante de la pièce. Les interactions non spécifiques étaient bloquées par une solution d'albumine de sérum bovin à 5% (BSA, Sigma Life Science, référence 05479) avec du PBS pendant 1 heure à température ambiante.

La protéine MMP9 était marquée en utilisant un anticorps primaire de lapin anti-MMP-9 (Abcam, référence ab38898, dilution 1/200 avec 0,5% BSA pendant toute une nuit à 4°C) couplé avec un anticorps secondaire anti-lapin (Molecular Probe, Alexa Fluor 488 de chèvre anti-lapin IgH (H+L), référence A11008, dilution 1/200 avec 0,5% BSA dans du PBS, pendant 2 heures à température ambiante).

Le marquage de la protéine Ki67 a été réalisé à la plateforme HistIM (Histologie, Immunomarquage, Microdissection laser, Institut Cochin, Paris). La protéine Ki67 a été marquée avec des anticorps anti-Ki67 (Ab 15580, lapin polyclonal, Abcam) couplé avec un système de détection de polymère anti-lapin (Novolink™ DAB (polymer) kit, Levca).

Les noyaux ont été marqués au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Aldrich, référence D95564, solution de 1 µg/ml dans du PBS, pendant 30 minutes à température ambiante). Enfin, les échantillons sont montés (Fluoromount Aqueous Mounting Medium, Sigma, référence F4680) et conservés à -4°C après congélation du système de montage.

2.2.14. Analyse microscopique et des images

Les échantillons ont été visionnés avec un microscope confocal « REFF » et le logiciel IQ 3.

La plupart des images affichées ont été prises avec un grossissement x60, utilisant une reconstruction multiplans pour couvrir la totalité de la surface des lames de cryosection.

Les images ont été obtenues avec le logiciel ImageJ (version 2.0.0-rc-68/1.52i). L'assemblage des images a été réalisé avec le module « Grid/Collection Stitching ». (87)

La détection et la localisation des noyaux exprimant le Ki67 ont été réalisées avec le module « TrackMate v.3.8.0'' », (Gaussian Log detection). (88) La localisation et la quantification des rayons a été fait avec un module crée au laboratoire (MATLAB_R2016a (9.0.0.341360), numéro de licence : 830200).

2.2.15. Expérimentations in vivo

Les expérimentations animales ont été réalisées dans le strict respect des recommandations européennes en vigueur. Les animaux utilisés étaient des souris Balb/c de 6 semaines, acclimatées pendant 2 semaines au laboratoire avant les expérimentations.

Les sphéroïdes MAG- et MAG+ étaient enlevés de leur moule et cultivés pendant 2 jours en conditions stériles. Pour s'assurer de l'intégrité des sphéroïdes des embouts de pipette de grande taille étaient utilisées afin de pouvoir les manipuler sans les abîmer. 10 sphéroïdes dans 200 µl de milieu DMEM supplémenté étaient utilisés à chaque injection.

Pour l'injection intrapéritonéale, sous anesthésie générale (isoflurane), une petite laparotomie médiane (0,5 à 1 cm de longueur) était réalisée puis 10 sphéroïdes étaient injectés par souris directement dans la cavité abdominale vers le haut sous contrôle de la vue afin d'éviter leur issue par la laparotomie. Après injection le péritoine était refermé au fil (prolène 5/0) par des points séparés puis la peau fermée avec des agrafes.

Les souris étaient surveillées chaque jour avec acquisitions de bioluminescence toutes les semaines. Les souris étaient sacrifiées à J13 (conformément à des modèles déjà connus du laboratoire). (89)

Après le sacrifice, une inspection complète de la cavité abdominale était réalisée et un score de PCI adapté à la souris déterminé. Afin de le déterminer la cavité abdominale est divisée en 9 cadrans notés de 0 à 8 et l'intestin grêle en 4 régions égales depuis son origine jusqu'au côlon. Un score de 0 à 3 est attribué à chaque région en fonction de la présence ou non de nodules de carcinose et leur taille (0 = absence de nodule, 1 = nodule entre 1 et 2 mm, 2 = nodule entre 2 et 4 mm et 3 = nodules de plus 4 mm ou nodules confluents). Le score PCI varie

donc de 0 à 39 avec une carcinose péritonéale limitée si $PCI < 10$, intermédiaire si $11 < PCI < 20$, et carcinose importante si $PCI > 20$.

A chaque fois des nodules de carcinose étaient prélevés pour analyse histologique et directement mis dans du formol puis transmis au laboratoire d'anatomopathologie.

Egalement lors de la présence de lésions hépatiques celles-ci étaient systématiquement prélevées afin d'avoir la confirmation histologique et de faire la différence entre un nodule de carcinose et une métastase hépatique.

Des analyses de Ki67, de coloration de Pearls (pour rechercher la présence de fer dans les échantillons prélevés), et la recherche de la bêta-caténine étaient systématiquement réalisés sur les nodules de carcinose péritonéales et les métastases hépatiques prélevés.

2.2.16. Résultats

Marquage magnétique et moulage des sphéroïdes

Les sphéroïdes moulés sont composés de cellules magnétiques et donc stimulables par des champs magnétiques.

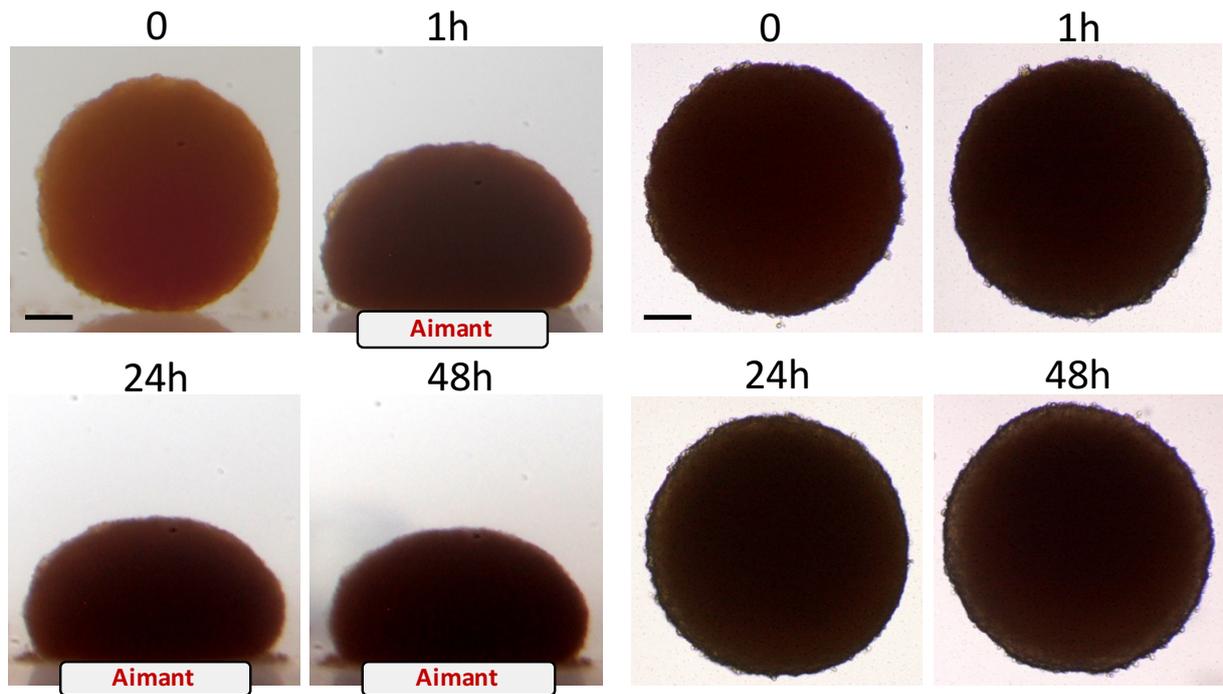
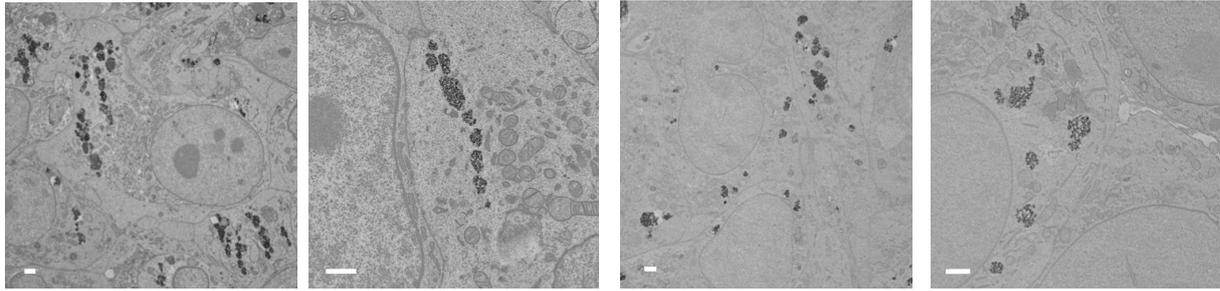


Figure 2.61. Sphéroïdes avec ou sans déformation par aimant.

La figure ci-dessus montre 2 sphéroïdes placés sur une plaque de culture non adhérente. Un aimant est placé en dessous du sphéroïde de gauche (MAG+) pendant 2 jours et montre une déformation rapide. L'autre sphéroïde (MAG-) est laissé libre.

C



D

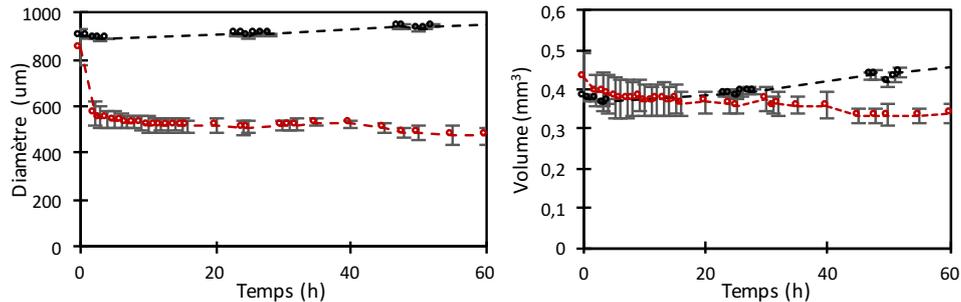


Figure 2.62. C : répartition des endosomes avec ou sans compression au microscope électronique. D : mesure de la déformation des sphéroïdes.

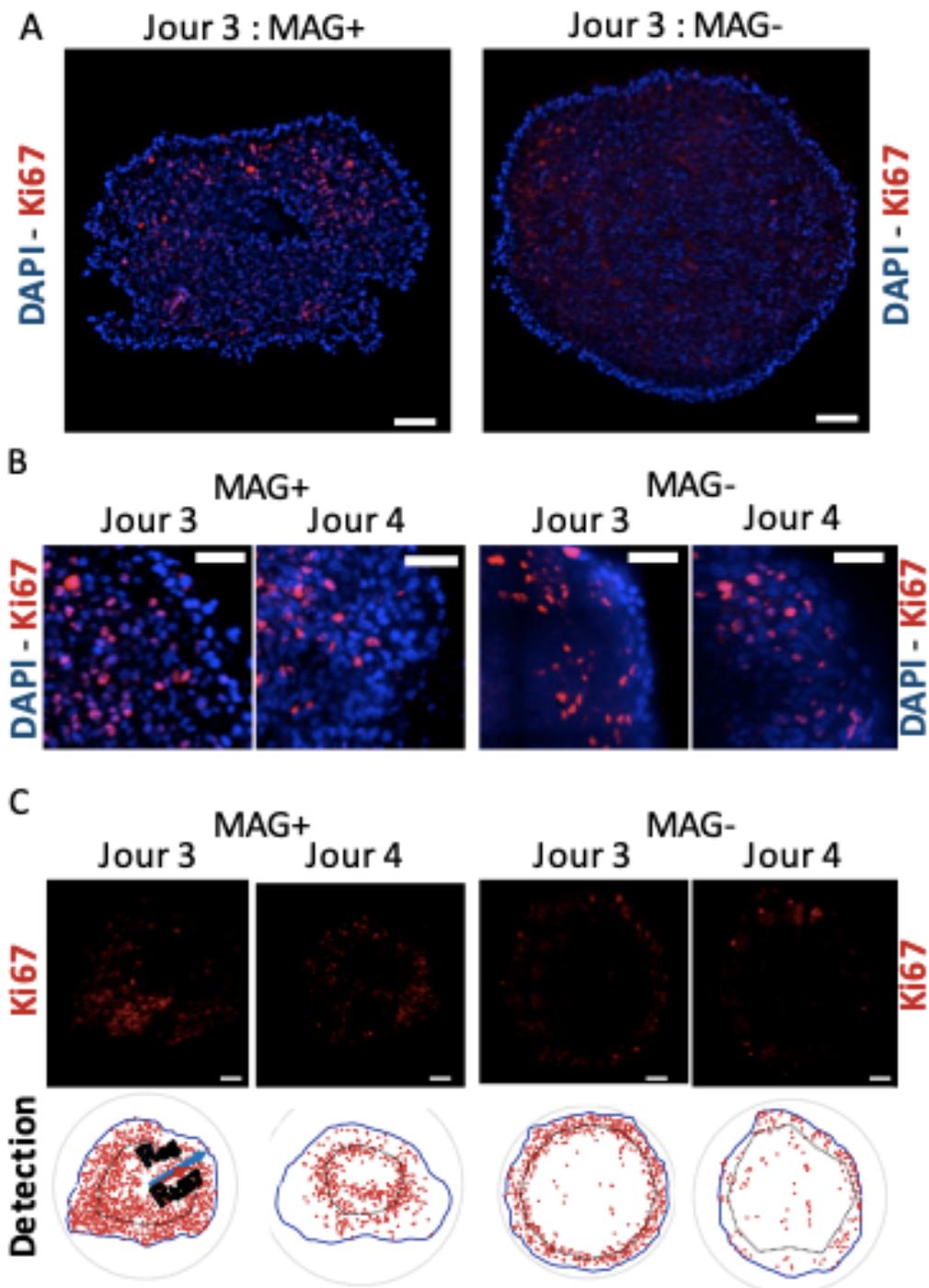
La mesure de la déformation du sphéroïde est rapportée dans la figure D. Après 1 minute de déformation magnétique il existait une réduction du diamètre initial de 16%, puis de 25% après 10 minutes et enfin 51% après quelques heures. Concernant le volume total du sphéroïde, il existait une baisse d'environ 10% de celui-ci après compression magnétique sans augmentation au fil du temps témoignant d'une déformation maximale du sphéroïde.

Les sphéroïdes contrôles non comprimés magnétiquement (MAG-) montraient après 3 jours une augmentation légère de leur diamètre (de 900 à 950 µm) et un volume quasi stable. Une analyse de microscopie électronique à transmission des sphéroïdes comprimés ou non a été réalisée au 3^{ème} jour (Figure C).

Sans compression magnétique, les endosomes contenant les nanoparticules étaient répartis de façon homogène dans les cellules, alors qu'avec une compression magnétique les endosomes étaient alignés selon un gradient de champ.

Quantification de la prolifération cellulaire

Les sphéroïdes MAG- et MAG+ étaient conservés 48 et 72 heures après le moulage (respectivement des sphéroïdes de 3 et 4 jours). Le marqueur de prolifération Ki67 et les noyaux de cellules étaient marqués sur des cryosections de 20 μm faites au centre des sphéroïdes MAG- et MAG+ de 3 et 4 jours.



Echelle 50 μ M

Figure 2.63. A : cryosection complète sphéroïdes MAG+/- à J3 ; B : cryosection sur les bords sphéroïdes MAG+/- à J3-4 ; C : marquage noyaux Ki67.

La figure ci-dessus représente les cryosections des sphéroïdes MAG+ et MAG- à différentes dates. La figure A montre une cryosection complète des sphéroïdes MAG+ et MAG- à 3 jours et la figure B uniquement les cryosections sur les bords (en périphérie) des sphéroïdes MAG+ et MAG- aux 2 dates (J3/J4). Les noyaux « normaux » et noyaux Ki67+ ont été marqués sur chaque cryosection (Figure C).

Comme la forme des sphéroïdes MAG+ n'est plus sphérique, nous avons normalisé la distance entre le centre du sphéroïde et les noyaux Ki67+. Nous avons introduit le ratio de distance R/R_0 (Figure C). R représente la distance entre le centre du sphéroïde et un noyau Ki67+, et R_0 représente la distance entre le centre du sphéroïde et le bord du sphéroïde (rayon du sphéroïde) sur la même ligne que celle passant par R.

Afin d'évaluer la différence de prolifération entre les sphéroïdes MAG+ et MAG-, le rapport entre les noyaux Ki67+ et le nombre total de noyaux a été calculé (Figure A ci-dessous).

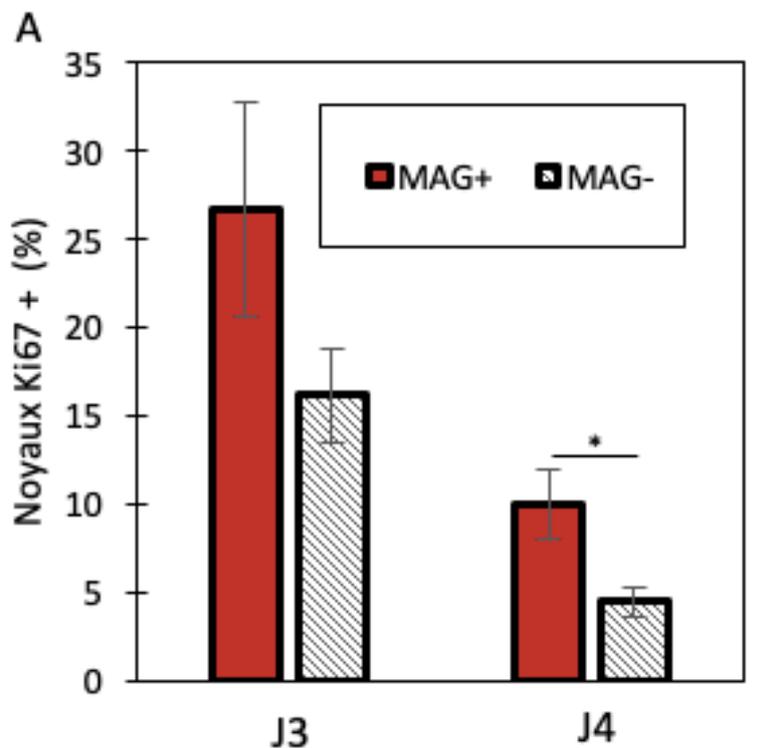


Figure 2.64. % de noyaux Ki67+ de sphéroïdes MAG+/- à J3-4.

Au 3^{ème} jour les sphéroïdes MAG- et MAG+ avaient un pourcentage de noyaux Ki67+ de 16,11 +/- 4,66% et 26,27 +/- 6% respectivement (n=3 pour chaque condition) montrant donc une prolifération plus importante sous compression magnétique. Au 4^{ème} jour, les sphéroïdes MAG- et MAG+ avaient un pourcentage de noyaux Ki67+ respectivement de 4,46 +/- 1,39 % et 9,95 +/- 4,34 % (n = 3 MAG-, n = 5 MAG+, p < 0,05, T-Test).

Aussi, comme le montre la 1^{ère} figure, la localisation des noyaux Ki67+ semble être différente entre les sphéroïdes MAG+ et MAG-. Afin de les contrôler correctement, les rapports R/R0 de tous les noyaux Ki67+ de toutes les cryosections d'une même condition d'expérimentation ont été inclus ensemble.

Quantitativement, au 2^{ème} jour, (figure B ci-dessous) la distribution des noyaux Ki67+ (représentée par le rapport R/R0 des noyaux Ki67+) montrait respectivement pour les sphéroïdes MAG- et MAG+, une moyenne du rapport R/R0 de 0,86 +/- 0,15 et de 0,75 +/- 0,20 (respectivement n = 1915 noyaux Ki67+ et n = 2653 noyaux Ki67+, p < 0,005, T-Test).

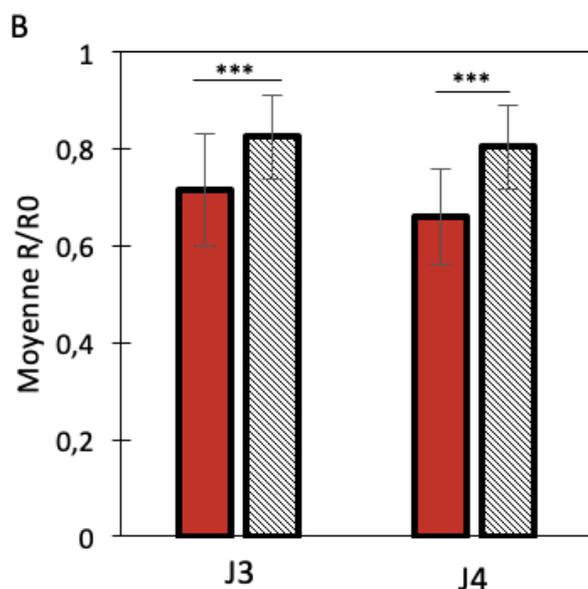


Figure 2.65. Distribution noyaux Ki67+ de sphéroïdes MAG+ (rouges) et MAG- (gris) à J3-4.

Au 3^{ème} jour, la moyenne du rapport R/R0 était de 0,84 +/- 0,15 pour les sphéroïdes MAG- (n = 937 noyaux Ki67+) et 0,68 +/- 0,22 pour les MAG+ (n = 2637 noyaux Ki67+), p < 0,005, T-Test. En comparant la distribution des noyaux Ki67+ des sphéroïdes MAG- et MAG+ aux différentes dates (figures C et D) on retrouve une modification nette de la localisation des noyaux Ki67+ dans les sphéroïdes MAG+ vers leur centre.

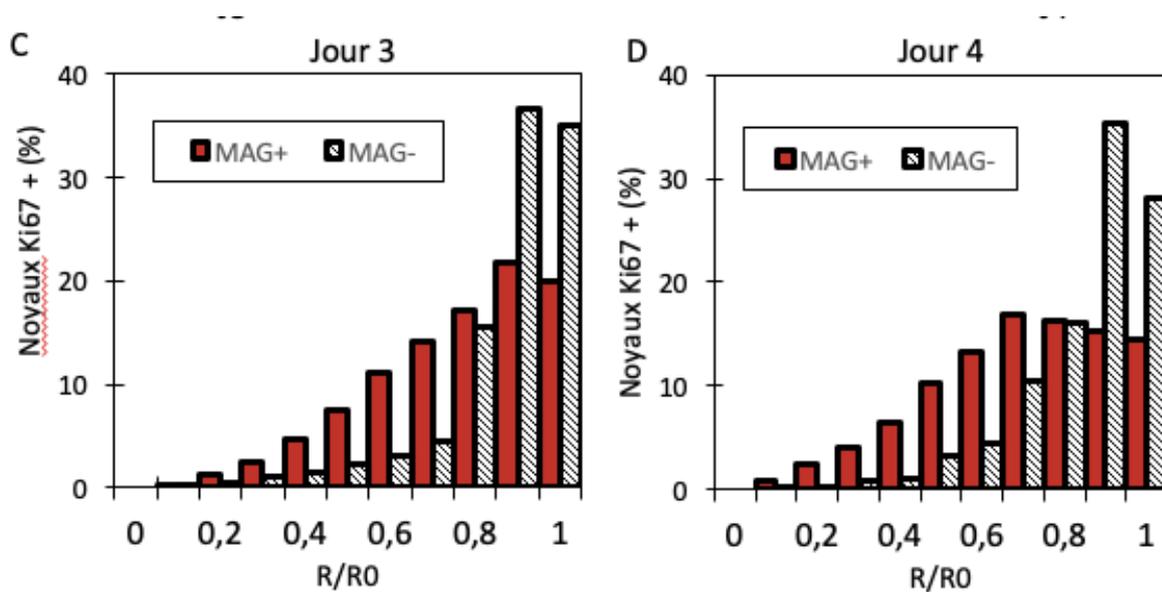


Figure 2.66. Distribution des noyaux Ki67+ sphéroïdes MAG+/- à J3 (C) et J4 (D).

La même analyse a été réalisée avec les cryosections uniquement faites sur les bords des sphéroïdes appelée moyenne locale du rapport R/R0 et retrouvait également une différence de localisation des noyaux Ki67+.

En effet, au 2^{ème} jour on retrouvait quantitativement une moyenne du rapport local de 0,83 +/- 0,03 pour les sphéroïdes MAG- et 0,71 +/- 0,097 pour les MAG+ (n = 3 pour chaque condition).

Au 3^{ème} jour le rapport local était de 0,81 +/- 0,02 pour les sphéroïdes MAG- et de 0,62 +/- 0,10 pour les sphéroïdes MAG+ (n = 3 MAG- et n = 5 MAG+, p = 0,014) confirmant les résultats de J2.

Ces résultats sont donc en adéquation avec les résultats des cryosections complètes des sphéroïdes montrant une localisation plus importante au centre des noyaux Ki67+ et donc de la prolifération cellulaire.

La prolifération cellulaire a été également étudiée en utilisant des tests avec le bleu d'alarmar (Figure E).

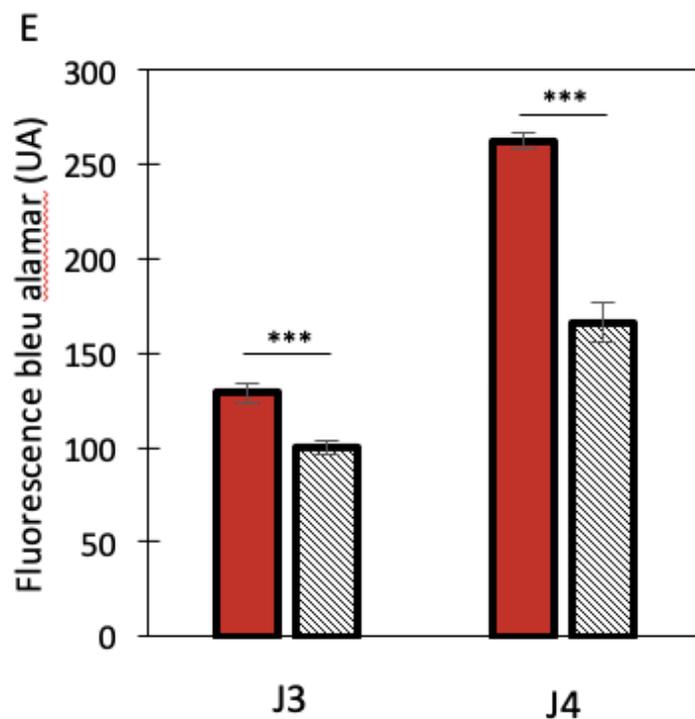


Figure 2.67. Prolifération des sphéroïdes MAG+/- par test bleu alamar.

La moyenne de la valeur de la fluorescence à l'Alamar à J3 des sphéroïdes MAG- a été prise comme référence et arbitrairement mise à 100% (n = 15, 100 +/-12,5 %).

En comparaison à cette valeur de référence, les sphéroïdes MAG+ à J3 avaient une valeur moyenne de fluorescence de 129 +/- 26,14 % (n = 26, p < 0,005, T-Test).

A J4 les moyennes de fluorescence à l'Alamar des sphéroïdes MAG- et MAG+ étaient respectivement de 166,48 +/- 38,82 % et 262,51 +/- 15,20 % (n = 14 pour MAG- et n = 15 pour MAG+, p < 0,005, T-Test).

Tous ces résultats montrent donc une augmentation de la prolifération cellulaire pour les sphéroïdes ayant été comprimés magnétiquement (MAG+) par rapport aux sphéroïdes laissés libres (MAG-) avec un déplacement de cette prolifération du bord des sphéroïdes vers le centre de celui-ci au fur et à mesure que la compression magnétique se prolongeait.

Marquage et quantification MMP-9

La métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9) était marquée sur des cryosections de 20 μm de sphéroïdes MAG- et MAG+ de 3 jours.

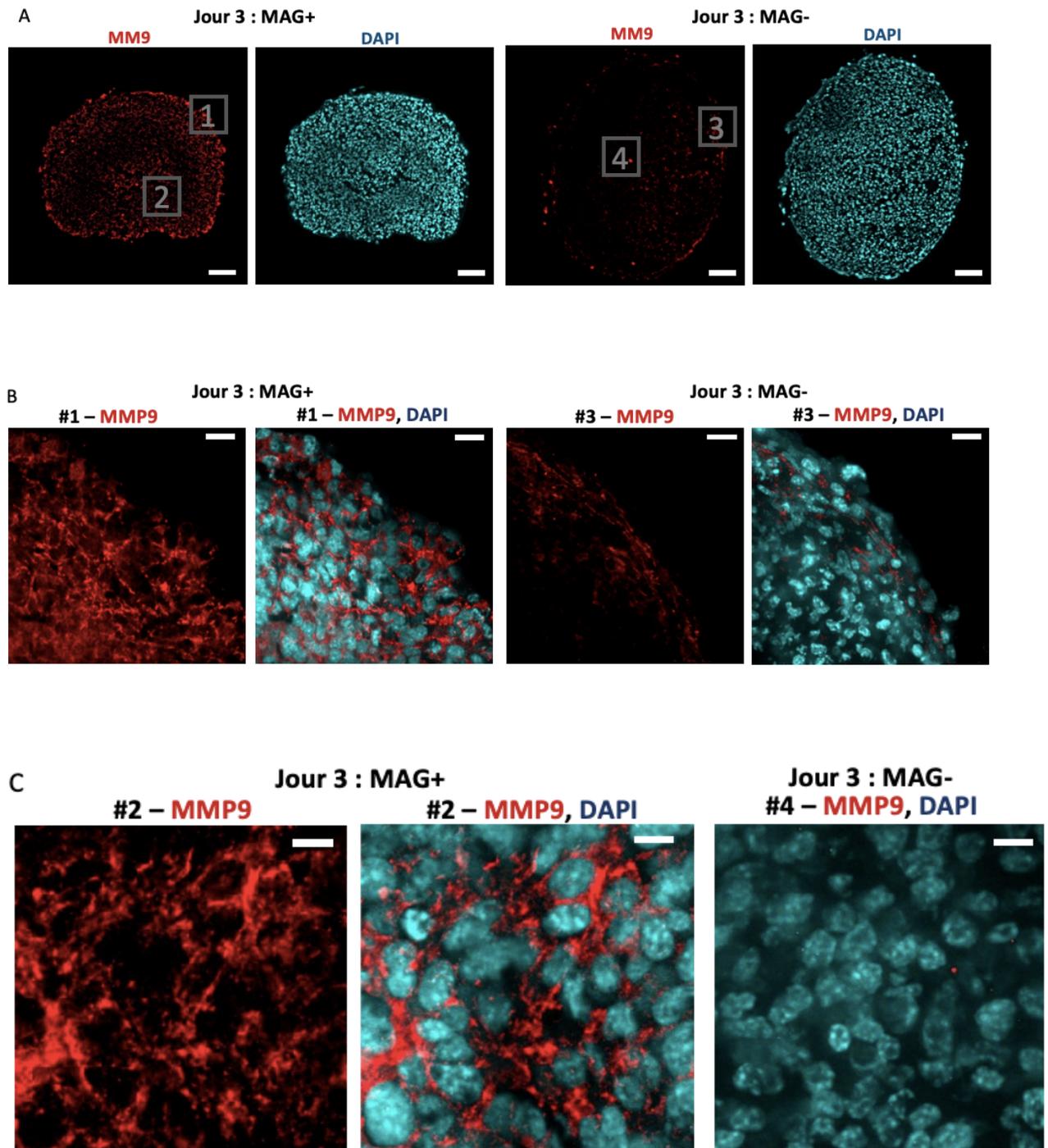


Figure 2.68. Marquage MMP9 (rouge), DAPI (bleu) de sphéroïdes MAG+/- à J3.

La figure A montre une vue globale des cryosections et les figures B et C représentent respectivement des agrandissements au niveau des bords et du centre des sphéroïdes. Alors que les sphéroïdes MAG- avaient une localisation de MMP-9 sur les bords du sphéroïde et non au centre, les sphéroïdes MAG+ exprimaient plutôt MMP-9 au niveau de leur centre et non sur leurs bords.

Nous avons mesuré la distance de l'expression de MMP-9 par rapport au bord des sphéroïdes sur un rayon (n = 3 sphéroïdes MAG- et n = 2 sphéroïdes MAG+). Les distances étaient de 30,55 +/- 16,36 µm pour les sphéroïdes MAG- et 68,58 +/- 42,44 µm pour les MAG+ (n = 280 mesures pour les MAG- et n = 104 mesures pour les MAG+, p < 0,005, T-Test).

Ceci démontre une augmentation de l'expression de MMP-9 dans les sphéroïdes comprimés magnétiquement au centre des agrégats.

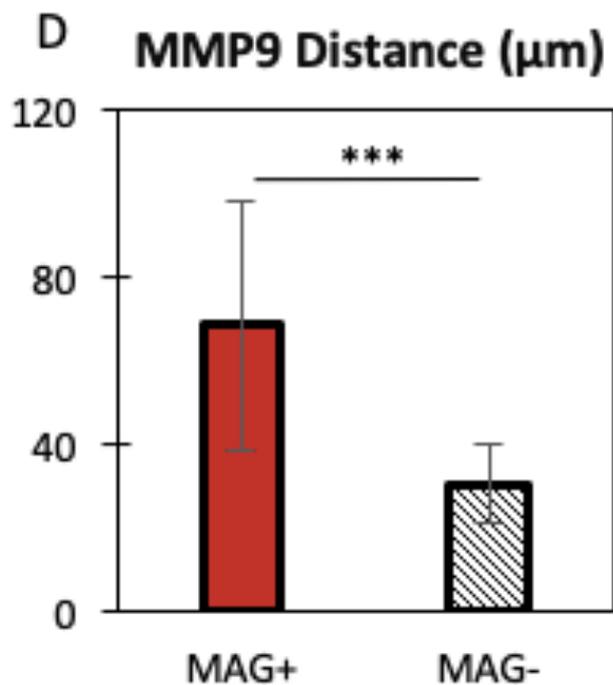


Figure 2.69. Distance expression MMP9 par rapport aux bords des sphéroïdes MAG+/-.

2.2.17. Expérimentations in-vivo : injections intrapéritonéales de sphéroïdes magnétiques.

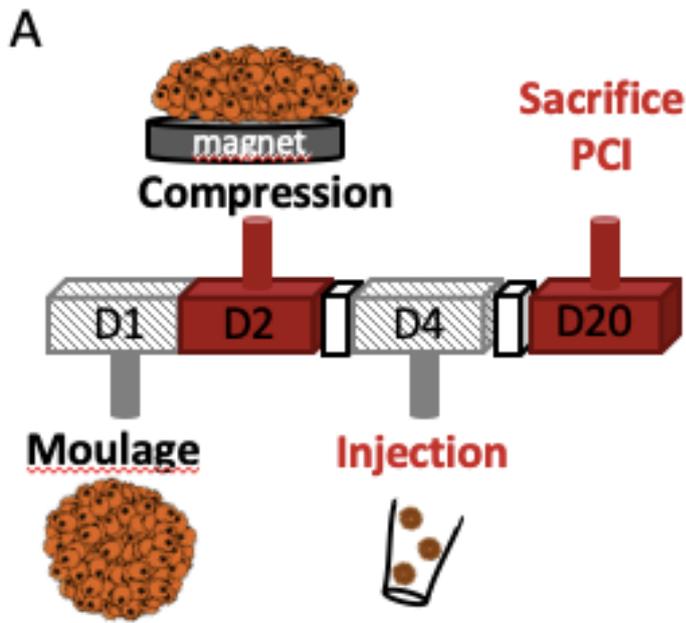


Figure 2.70. Schéma de l'expérimentation in vivo avec les sphéroïdes MAG+/-.

Les sphéroïdes étaient retirés de leur moule et cultivés pendant 3 jours avec ou sans compression (MAG+ et MAG-). Ensuite 10 sphéroïdes (soit 2,5 millions de cellules) MAG+ et 10 MAG- étaient injectés dans le péritoine de souris Balb/C de 8 semaines par une courte laparotomie via une pipette à gros embout afin d'éviter d'altérer les sphéroïdes.

Lors du sacrifice le score PCI moyen était de $20,8 \pm 2,74$ pour les souris MAG+ et de $13,25 \pm 3,69$ pour les souris MAG- ($n = 8$ pour les MAG+ et $n = 10$ pour les MAG-, $p < 0,005$).

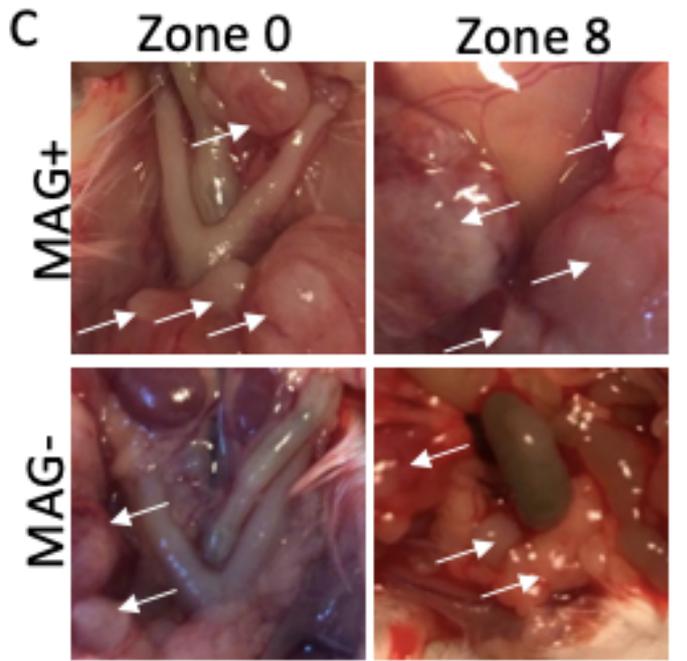


Figure 2.71. Nodules de carcinose péritonéale (flèches blanches) dans différentes zones de l'abdomen lors sacrifice souris MAG+/-.

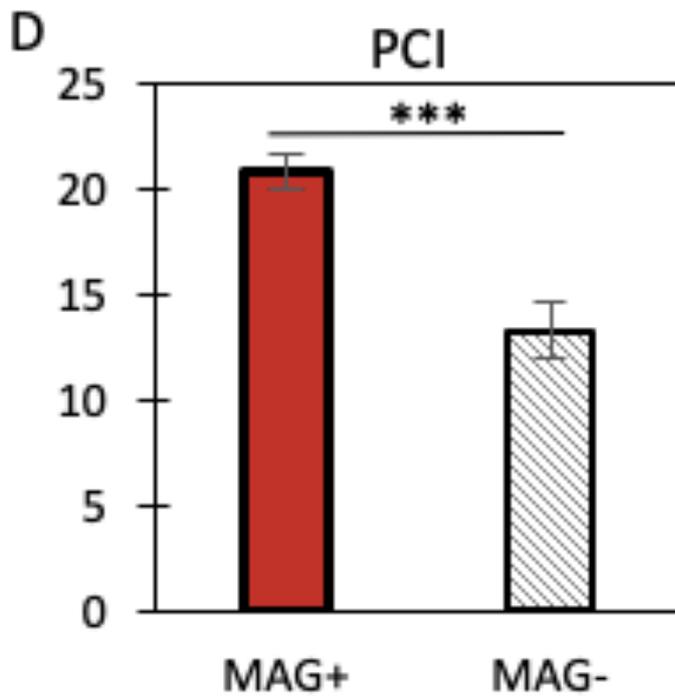


Figure 2.72. PCI moyen retrouvé lors du sacrifice des souris MAG+/-.

Aussi il a été noté uniquement chez les souris MAG+ la présence de métastases hépatiques (confirmées en histologie et différenciées de nodules de carcinose) (3/8 souris MAG+ avec métastases hépatiques versus 0/10 souris MAG-, $p = 0,07$).

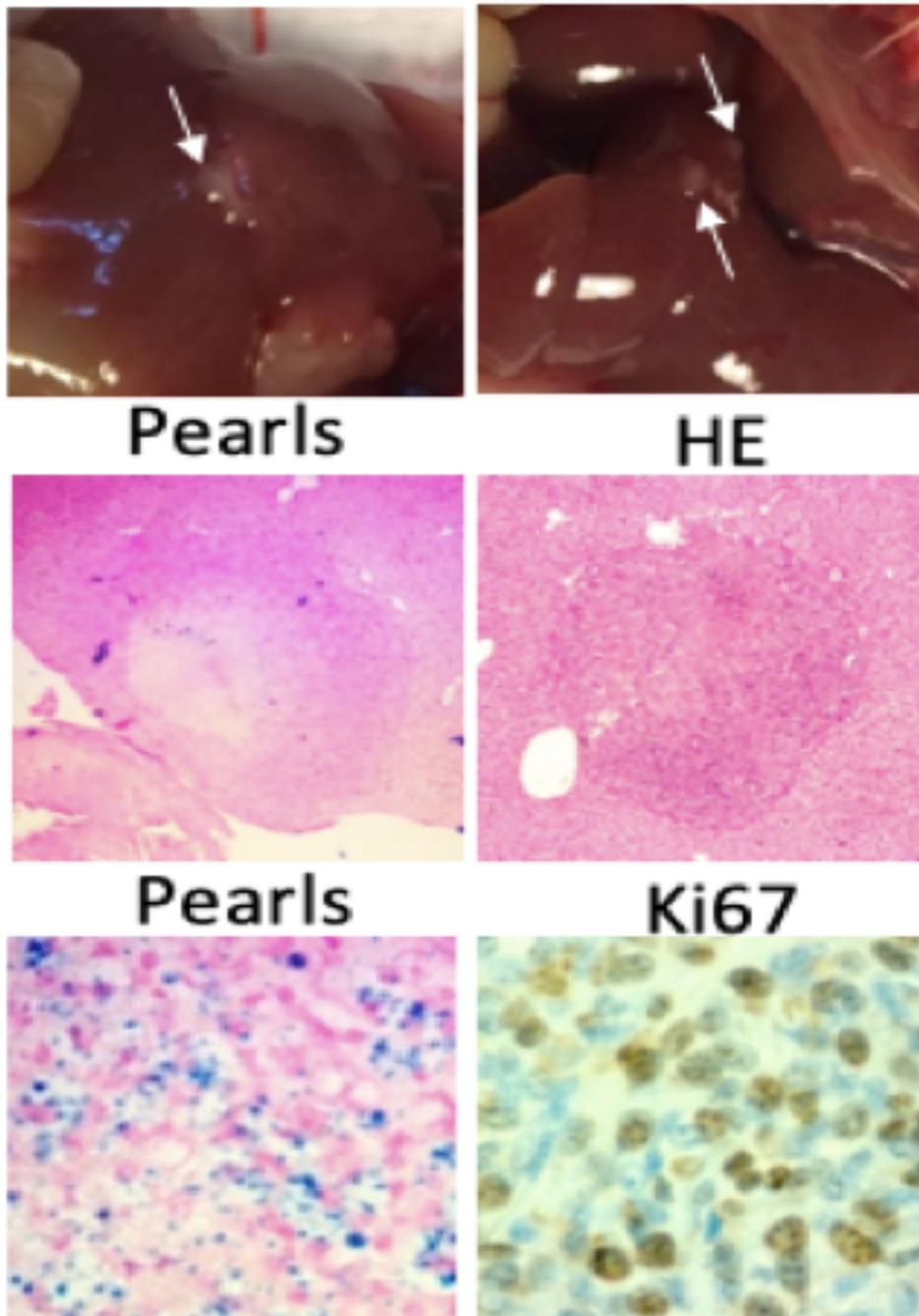


Figure 2.73. Métastases hépatiques souris MAG+. Images macroscopiques (flèches blanches), puis histologiques (HE : hématoxyline éosine, Pearls : fer, Ki67).

Les prélèvements (nodules de carcinose et métastases hépatiques) ont été marqués au Ki67, Pearls et bêta-caténine)

L'analyse du Ki67 sur les différents prélèvements (nodules de carcinoses sur différents prélèvements) n'a pas permis de retrouver des différences significatives entre les souris MAG+ et MAG- avec des taux de Ki67 variant de manière homogène entre 30 et 50%.

Aussi il n'a pas été retrouvé aussi bien sur les souris MAG+ que MAG- de localisation nucléaire de la bêta-caténine restant toujours cytoplasmique dans tous les prélèvements réalisés.

Analyse de la bioluminescence

Des analyses de bioluminescence ont été réalisées selon le même protocole que dans la 1^{ère} série d'expériences à J6 et J13 afin de suivre l'évolution de la carcinose péritonéale.

Jour 6 Bioluminescence

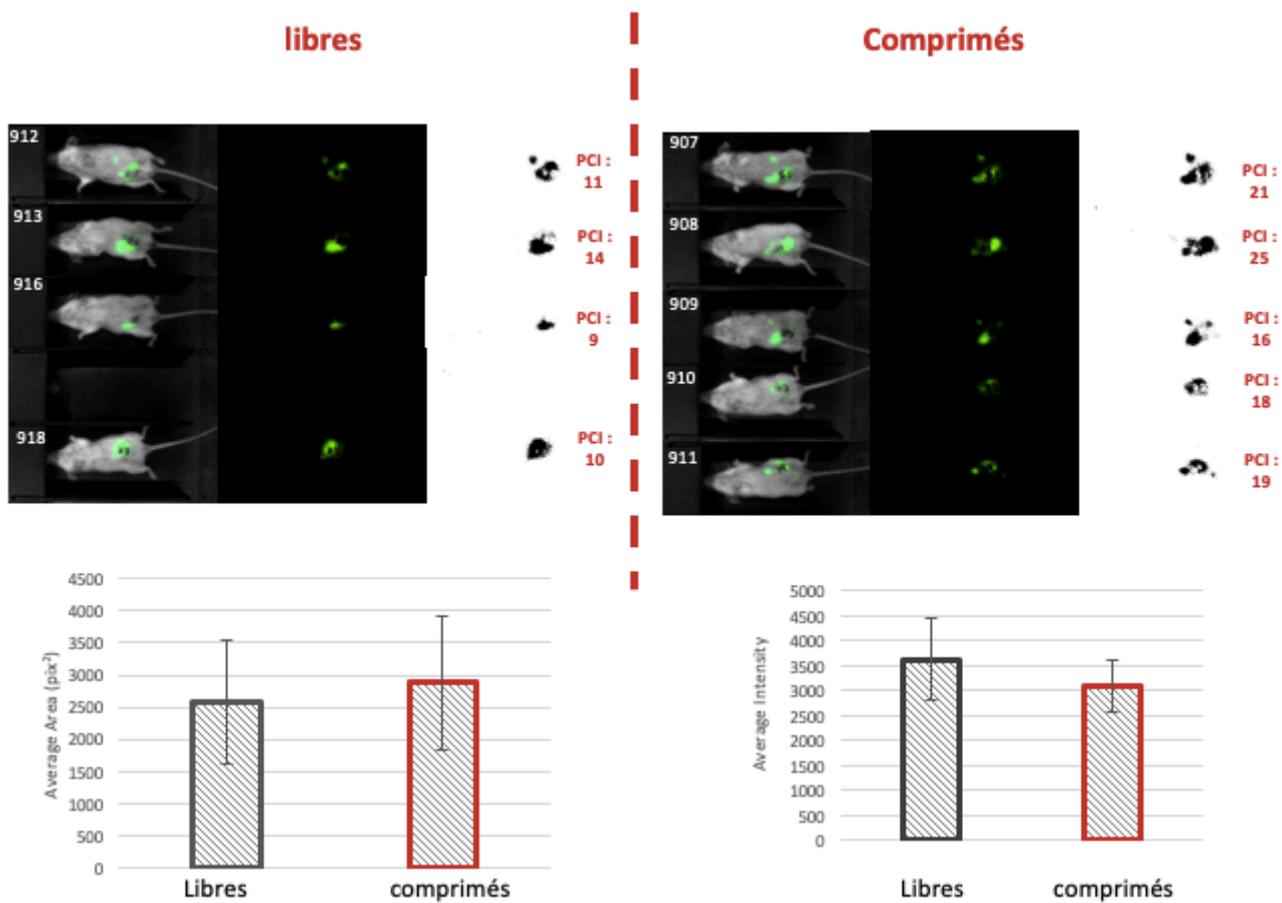


Figure 2.74. Bioluminescence à J6 avec souris MAG+ (sphéroïdes comprimés) et MAG- (libres).

Jour 13 Bioluminescence

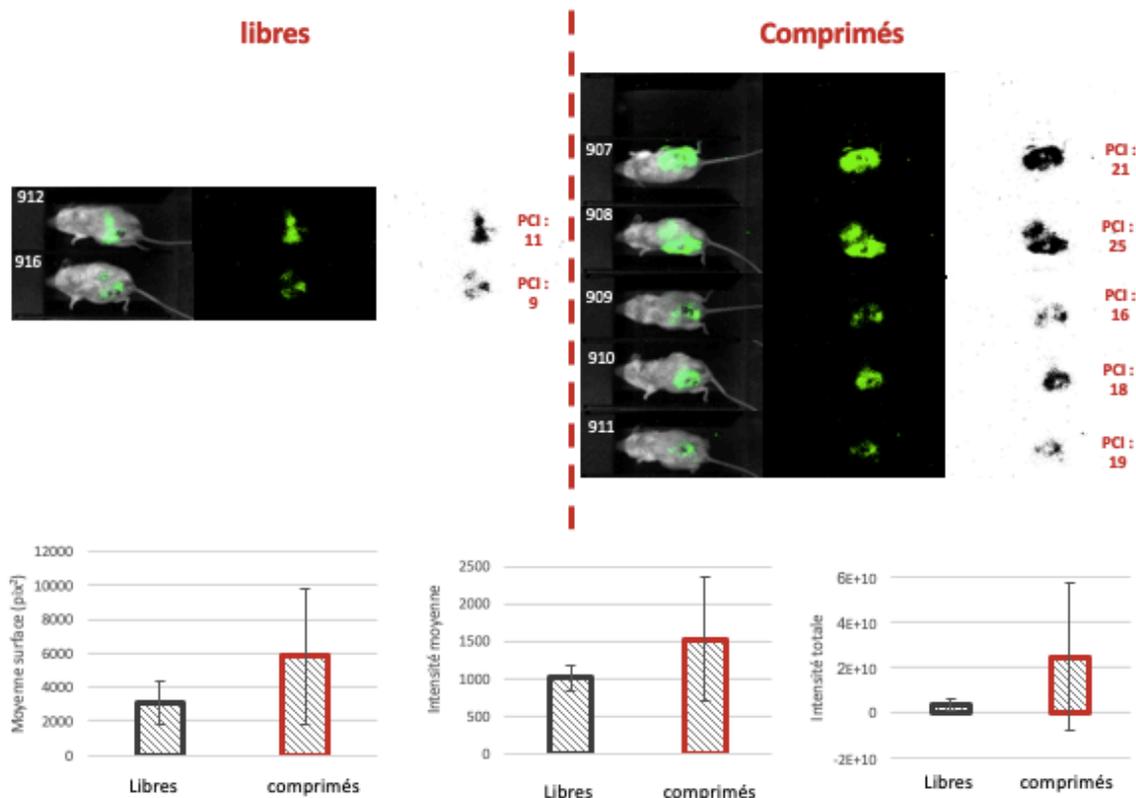


Figure 2.75. Bioluminescence à J13 souris MAG+ (sphéroïdes comprimés) et MAG- (libres).

L'interprétation des données de la bioluminescence est à prendre avec précaution du fait du faible nombre de souris évaluées et des aléas techniques.

Toutefois ces résultats semblent aller dans le même sens que les données de l'analyse finale macroscopique lors du sacrifice des souris avec une tendance à plus de régions touchées et une intensité plus forte du signal de bioluminescence chez les souris ayant eu des injections de sphéroïdes comprimés.

2.2.18. Conclusions 2^{ème} série d'expériences

Au terme de cette 2^{ème} série d'expériences nous avons pu donc observer que la compression magnétique de sphéroïdes multicellulaires tumoraux avait tendance à augmenter leur caractère prolifératif mais aussi invasif.

Cette prolifération était plutôt observée au centre des sphéroïdes là où la pression était la plus forte plutôt qu'à leur périphérie.

Lorsqu'on injectait ces sphéroïdes multicellulaires tumoraux comprimés dans des modèles animaux de carcinose péritonéale connus, on observait une carcinose péritonéale plus importante et même plus de métastases hépatiques que chez les souris ayant eu des injections de sphéroïdes identiques mais non comprimés magnétiquement.

Tous ces résultats sont donc en faveur d'un effet néfaste de l'application d'une contrainte mécanique sur des cellules tumorales avec une tendance à augmenter leur caractère prolifératif, invasif et donc à péjorer le pronostic oncologique.

2.3. 3^{ème} série d'expériences

2.3.1. Injections intra-spléniques + laparotomie

La 1^{ère} série d'expérimentations a consisté à mettre en place un modèle murin d'injection intra-splénique de cellules tumorales marquées magnétiquement et d'évaluer la distribution des métastases hépatiques ainsi générées en fonction ou non de la mise en place d'aimants au contact du foie. (90)

Les animaux utilisés étaient des souris Balb/c identiques à celles utilisées dans les expériences précédentes, sous les mêmes conditions d'hébergement et de préparation.

Les cellules utilisées étaient des cellules CT 26 marquées magnétiquement selon le même protocole que celui de la 2^{ème} série d'expériences ci-dessus.

Le nombre de cellules injectées dans la rate étaient de 2 millions.

Les manipulations étaient réalisées sous anesthésie générale à l'isoflurane.

Une laparotomie médiane était réalisée puis tout d'abord après exposition de la rate une injection avec une aiguille fine de 27G puis contrôle du point de ponction par compression douce afin d'éviter un saignement.



Figure 2.76. Injection intrasplénique de cellules CT26 marquées magnétiquement par laparotomie médiane.

Ensuite un aimant était positionné en arrière du foie droit ou un fantôme dans le groupe contrôle (mêmes dimensions, inox)

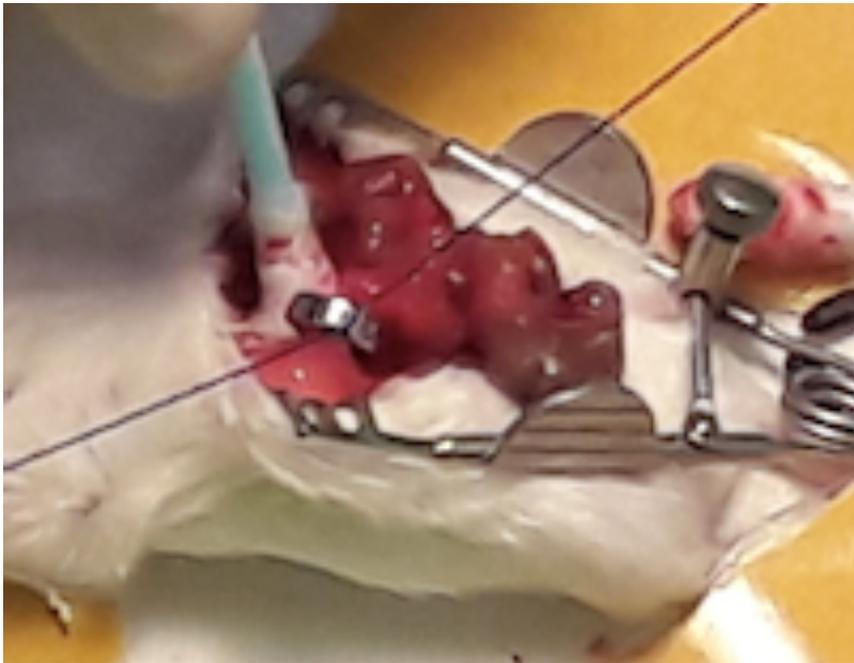


Figure 2.77. Fixation de l'aimant derrière le foie d'une souris par laparotomie.

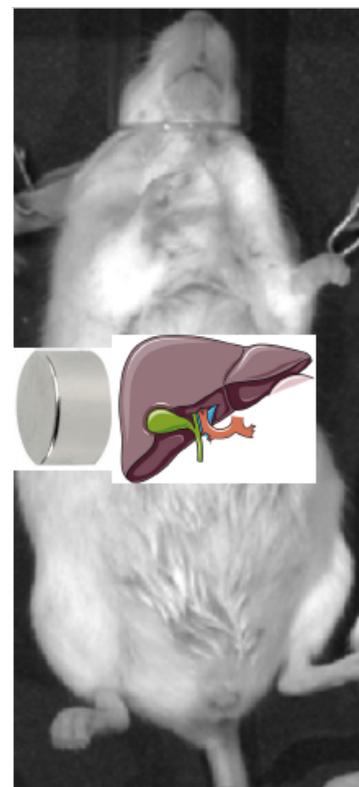
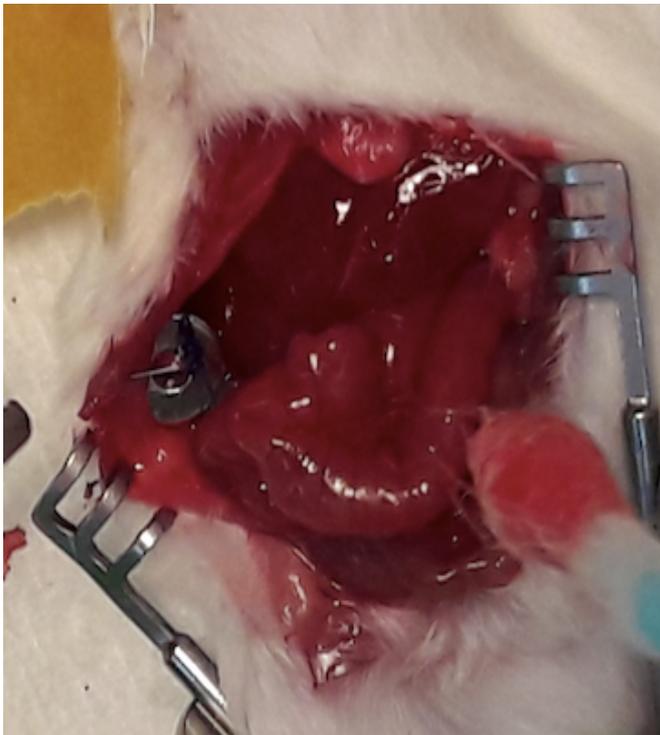


Figure 2.78. Aspect final de l'aimant positionné à proximité du foie.

Enfin la laparotomie était fermée par des points séparés de fil non résorbable sur le péritoine et des agrafes sur la peau.

Des acquisitions de bioluminescence puis un sacrifice en fonction de la tolérance clinique et de l'importance de la maladie étaient prévus.

10 souris Balb/c ont été injectées avec pour 5 la mise en place d'un aimant et pour 5 autres la mise en place d'un fantôme.

Toutes les souris ayant eu un aimant sont mortes dans les 2 premiers jours alors que les autres ont été sacrifiées au 15^{ème} jour.

Les acquisitions précoces de bioluminescence n'ont pas permis de mettre en évidence de métastases hépatiques du fait de leur caractère trop précoce après l'injection. (90)

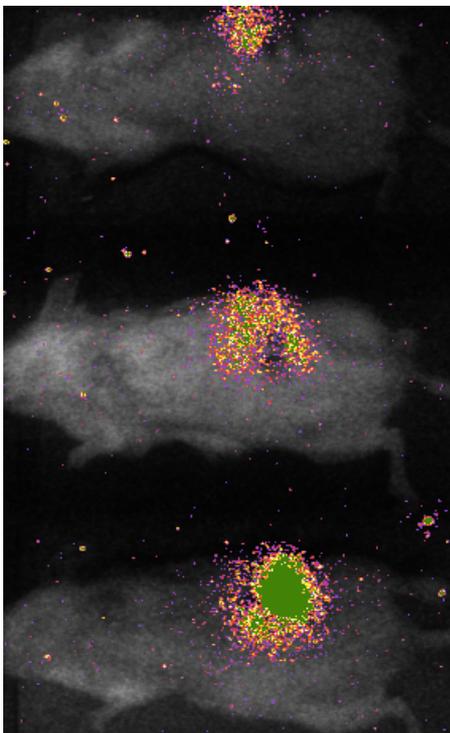


Figure 2.79. Bioluminescence à J6 après injection intrasplénique (fixation splénique).

Ainsi des implantations d'aimants seuls en arrière du foie droit sans injection intra-splénique de cellules tumorales a été réalisé et a montré une mauvaise tolérance clinique des aimants par les souris ayant entraîné leur sacrifice précoce.

2.3.2. Injection intra-spléniques + aimant sous cutané

La même expérience a donc été réalisée mais cette fois ci avec simplement une petite laparotomie sous costale gauche afin d'extérioriser la rate et injecter les cellules dont le nombre a été réduit à 500000.



Figure 2.80. Injection intrasplénique de cellules CT 26 magnétiques par sous costale gauche.



Figure 2.81. Positionnement de l'aimant en sous cutané en regard du foie.

L'aimant était cette fois-ci implanté en sous cutané en regard du foie droit dans l'hypothèse d'une mauvaise tolérance liée à son implantation en intra-péritonéal ; avec implantation d'un fantôme au même endroit chez les souris contrôles.

Mais le même résultat a été observé qu'avec l'implantation de l'aimant en intra-péritonéal avec un décès rapide des souris avec les aimants en moins de 48 heures alors que les souris contrôles ont survécu. Les expérimentations ont donc été arrêtées.

2.3.3. Conclusions 3^{ème} série d'expériences

Malheureusement l'échec des expériences, notamment des souris avec implantation de l'aimant, n'ont pas rendu possibles des comparaisons avec les souris sans aimant et n'ont donc pas permis d'essayer de montrer à nouveau une différence de comportement tumoral en fonction de l'application ou non d'une contrainte mécanique.

3. Discussion

Les deux principaux résultats de la première partie des expérimentations sont la diminution significative de la survie et l'augmentation significative des taux sériques de LDH en cas de pose de stent colique pour une tumeur occlusive dans notre modèle murin.

La diminution de la survie en cas de pose de stent colique a déjà été retrouvée chez l'homme mais est encore sujette à controverses. (80,81,91)

Les causes de cette diminution de survie ne sont pas totalement connues, même si le stent semble être associé à de nombreux facteurs de mauvais pronostic du cancer colorectal comme le relargage de cellules tumorales circulantes et la présence d'engainements péri-nerveux et de perforations « silencieuses » c'est à dire vues à l'examen histologique de la pièce de colectomie. (80,82–84)

Dans notre modèle murin la diminution de survie semblait plutôt être liée à la maladie tumorale qu'à des complications liées au stent car seulement 2 souris présentaient des occlusions lors du sacrifice et celles-ci étaient en rapport avec des dysfonctions du stent liées à une pose tardive avec une obstruction complète de la lumière colique dans un cas et des dimensions de stent inadéquates dans l'autre. Or ces 2 paramètres sont aussi connus pour engendrer plus d'échecs techniques en cas de pose de stent chez l'homme. (92–94)

Cette diminution de la survie en raison de la progression de la maladie néoplasique, était d'ailleurs concordante avec le 2^{ème} résultat significatif de notre modèle murin qui est l'augmentation du taux de LDH en cas de pose de stent colique. Il a d'ailleurs été montré chez l'homme que l'augmentation du taux de LDH, chez les patients porteur d'un cancer colorectal, était corrélée à un plus mauvais pronostic et prédictive d'une résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie. (95,96)

D'autre part, dans un modèle murin expérimental, l'augmentation des taux de LDH était associée au développement de métastases hépatiques, ce qui se rapproche également de nos résultats expérimentaux qui ont retrouvé une tendance à l'augmentation des métastases hépatiques en cas de pose de stent colique ($p = 0,059$). (95)

Enfin un autre modèle expérimental a montré que l'augmentation des taux de LDH chez la souris était associée au caractère hypoxique des tumeurs, ce qui favorisait la progression tumorale et était associée à un plus mauvais pronostic. (97)

La bioluminescence repose sur une réaction chimique entre une enzyme (la luciférase) et son substrat (la luciférine), il ne peut donc a priori pas y avoir de faux positifs. (98–100) Toutefois des discordances entre les données de la bioluminescence (ou plutôt de leur interprétation qualitative) et l'examen macroscopique final lors du sacrifice des souris dans notre modèle ont été observées notamment concernant l'importance de la carcinose péritonéale. Une explication pourrait être que les images de la bioluminescence mettaient en évidence une atteinte rétropéritonéale plutôt qu'une véritable carcinose péritonéale car les injections étaient systématiquement réalisées en décubitus dorsal, à la face postérieure du côlon avec donc un risque d'essaimage du fait de la finesse de la paroi colique et de ses rapports étroits avec le rétropéritoine.

Ainsi même si la carcinose péritonéale était retrouvée plus fréquemment chez les souris stentées lors de l'examen macroscopique final, on ne peut pas conclure dans notre modèle murin que la carcinose péritonéale observée soit exclusivement liée à la pose du stent, car elle était déjà présente à la bioluminescence avant la pose du stent de façon plus fréquente ($p = 0,04$) que chez les souris non stentées. Cette différence ne se retrouvait pas lors de la 2ème série de bioluminescence, 1 semaine après, mais il persistait juste une tendance à avoir plus de carcinose péritonéale en cas de pose de stent. Cela peut être en rapport avec une baisse de la sensibilité de la bioluminescence qui peut être secondaire à l'hypoxie (l'oxygène étant nécessaire à la

réaction enzymatique de l'analyse en bioluminescence), à la présence d'ascite, ou à un problème d'injection de la luciférine. (100,101) En effet il n'y avait pas de signal détecté dans 60 % des souris non stentées Luc et 30 % des souris stentées Luc ($p = 0,33$), rendant l'analyse de la bioluminescence qu'elle soit quantitative ou qualitative moins pertinente.

L'analyse de la progression qualitative en bioluminescence, lorsqu'elle était possible c'est à dire avec 2 bonnes acquisitions interprétables, a retrouvé une tendance à une plus forte progression chez les souris stentées (50 % global et 40 % Luc contre 37,5 % / 25 % chez les non stentées), différence qui se majorait en ne prenant que les souris ayant eu leur stent pendant 6 jours minimum (75 % souris stentées versus 38,5 % souris non stentées, $p = 0,2$). Ainsi, avec toutes les réserves de l'analyse de la bioluminescence déjà évoquées, il semblerait que dans notre modèle murin la pose d'un stent colique favoriserait la progression des lésions tumorales présentes peut-être par une modification du comportement des cellules tumorales qui deviendraient plus agressives.

L'effet attendu du stent colique sur les cellules tumorales circulantes (CTC), qui a été retrouvé chez l'homme, n'a pas été observé dans ce modèle du fait tout d'abord des difficultés techniques à les mettre en évidence avec des résultats pas encore définitifs. (82) Cela peut peut-être s'expliquer également par le moment où les analyses de sang ont été faites puisqu'il a été montré que les stents augmentaient les CTC chez l'homme mais immédiatement après le geste, or dans notre modèle la recherche de CTC était faite sur des prélèvements lors du sacrifice (car nécessitant un volume sanguin important) donc à distance de la pose du stent. (82)

Le volume tumoral significativement plus important retrouvé chez les souris non stentées peut s'expliquer par la plus grande proportion de tumeurs occlusives dans le groupe des souris stentées qui étaient plus petites peut être du fait du moindre d'espace pour se développer. Nous avons pu remarquer d'ailleurs de façon surprenante que les souris non stentées avec des tumeurs occlusives, généralement trop proches de l'anus pour la mise en place d'un

stent, ne mourraient pas d'occlusion, peut-être à cause d'une plus grande plasticité du côlon de la souris expliquant alors aussi pourquoi l'effet mécanique du stent sur la tumeur primitive aurait été moins important que prévu dans cette étude. Aussi la survie des souris ayant un volume tumoral important (du moins au-dessus de la médiane) n'était pas diminuée, au contraire, sans véritable explication puisque le volume tumoral n'était pas associé aux autres variables pronostiques (métastases hépatiques et carcinose péritonéale).

Enfin les discordances entre l'effet que peut avoir le stent sur la survie et l'amélioration de celle-ci en cas de volumineuse tumeur et de façon beaucoup moins évidente en cas de CP peut s'expliquer peut-être par la technique d'injection orthotopique. En effet si les injections étaient trop profondes dans la paroi colique, elles avaient tendance à donner des tumeurs à développement extrinsèque, voire une carcinose péritonéale ; et si elles étaient trop superficielles, elles avaient tendance à ne pas donner naissance à une tumeur colique. Toutefois l'impression de réaliser une injection "parfaite" n'était pas corrélée à l'obtention d'une tumeur occlusive sans CP et/ou une atteinte rétropéritonéale ; et d'ailleurs dans ce groupe dit « d'injections parfaites », on retrouvait sensiblement les mêmes tendances que dans l'analyse globale de l'ensemble des injections orthotopiques.

Afin de démontrer de façon plus probante l'effet propre du stent sur la dissémination métastatique, nous aurions pu peut-être utiliser des cellules moins agressives (avec un potentiel métastatique moindre) pour que l'essentiel de la dissémination soit le fait du stent lui-même. Aussi il faudrait encore également plus maîtriser la technique d'injection sous muqueuse afin d'être sûr à chaque fois de ne pas disséminer des cellules.

Durant la 2^{ème} série d'expériences, grâce à des modèles déjà existants dans le laboratoire, nous avons mis en place un modèle expérimental de micro-tumeurs sous formes de sphéroïdes marqués magnétiquement par des nanoparticules de fer afin de pouvoir les

déformer et étudier les effets de la pression mécanique sur le comportement de ces micro-tumeurs. (86)

La technique de marquage magnétique des cellules utilisée par endocytose de nanoparticules de fer a déjà été utilisée dans d'autres modèles expérimentaux et n'a pas montré de toxicité particulière pour les cellules ou d'impact négatif sur leur métabolisme (notamment concernant leur différenciation), y compris à long terme avec peu à peu, et selon les différentes lignées cellulaires utilisées, une dégradation de ces nanoparticules. (102,103) Cela a été vérifié d'ailleurs dans nos expérimentations avec des résultats similaires lors des tests de viabilité cellulaire (tests bleu alamar) entre les cellules marquées magnétiquement et les cellules non marquées.

Aussi la technique de marquage magnétique des cellules dans notre modèle a permis de créer des sphéroïdes de grande taille (1 mm et plus) pouvant donc être déformés largement. Après l'essai de plusieurs techniques de fabrication de sphéroïdes, celle du moulage magnétique a été retenue du fait de sa simplicité, de sa reproductibilité et de sa rapidité (simplement une nuit d'incubation pour former les sphéroïdes versus plusieurs jours pour les autres techniques utilisant les puits d'agarose, ou la goutte pendante). Cette méthode de moulage magnétique permet également de créer des agrégats de différentes formes en fonction du moule utilisé (pas uniquement sphériques) ; elle peut donc être utilisée dans de nombreux modèles expérimentaux.

Les sphéroïdes étant composés de cellules marquées magnétiquement, l'application de forces mécaniques externes est simple grâce à l'utilisation d'un simple aimant mis au contact de ceux-ci entraînant des déformations importantes par le biais du champ magnétique ainsi créé. Aussi ces larges déformations (allant jusqu'à une réduction de 50 % du diamètre des sphéroïdes) n'ont pas de conséquence sur la viabilité de ces cellules écrasées, comme en témoignent les examens d'immunofluorescence réalisés au bout de quelques jours qui ne

montraient pas de cellules mortes au sein des sphéroïdes, et ce malgré des déformations maximales obtenues après un délai de compression de quelques heures (baisse du volume du sphéroïde de l'ordre de 10 % du volume total ne variant plus passé ce délai).

D'autre part la particularité de notre compression est tout d'abord son caractère anisotropique, asymétrique du fait du type de la force exercée par l'aimant comparable à une force de gravité magnétique avec pour les sphéroïdes comprimés une surface globalement libre sauf au niveau de sa base située juste en regard de l'aimant dont elle est séparée par la boîte de Pétri. Cette pression mécanique s'exerce entre les cellules d'un même sphéroïde en s'accroissant vers le bas (zone la plus proche de l'aimant où la pression est maximale).

La force mécanique exercée dans notre modèle est donc bien différente de celles déjà étudiées auparavant comprimant des sphéroïdes dans des gels d'agarose ou dans des solutions comprimées par un piston qui sont plutôt à l'origine d'une pression isotropique, homogène. (50,66,67,104–109) L'application d'un stress mécanique ou stress solide dans ces différents modèles était en faveur d'un effet de baisse de la croissance des sphéroïdes lié principalement à une baisse de la prolifération cellulaire (à part en périphérie du sphéroïde) et à une augmentation de l'apoptose (même si les résultats étaient parfois contradictoires entre les différentes études qui n'avaient pas les mêmes protocoles de compression et les mêmes pressions de compression).

Cependant dans notre modèle avec une compression différente, asymétrique, nous avons retrouvé principalement une augmentation de la prolifération cellulaire au sein des sphéroïdes comprimés magnétiquement (mise en évidence par le test au bleu alamar et la recherche des noyaux Ki67+). Si dans les sphéroïdes non comprimés la prolifération cellulaire a été retrouvée uniquement sur leurs bords, dans les sphéroïdes comprimés magnétiquement la prolifération cellulaire était retrouvée plus à l'intérieur, au centre des sphéroïdes là où la pression était plus importante (et moins en surface là où la pression était moins forte).

En effet la pression sur la surface libre supérieure des sphéroïdes comprimés n'était que de l'ordre de 50 Pa, alors que la force mécanique exercée au sein du sphéroïde comprimé était de l'ordre de 100 g.

Ainsi la force appliquée dans notre modèle est bien différente de celles appliquées dans les autres modèles qui reflétaient d'avantage une pression qu'on pourrait qualifier de « physiologique » correspondant à la pression exercée par le milieu extérieur dans lequel grossit une tumeur (plutôt isotropique, et de plus faible puissance). (67,104,106,108,109)

Dans notre modèle la pression appliquée était plutôt anisotropique, maximale (sphéroïde incompressible) donc plutôt en faveur d'une pression « non physiologique » ou pathologique. Ainsi nos résultats in vitro sont différents des autres modèles expérimentaux avec une augmentation de la prolifération dans les zones les plus soumises à la pression mécanique, comme cela a été aussi montré par une autre équipe appliquant sur leurs sphéroïdes des forces mécaniques comparables aux nôtres. (110)

Les métalloprotéases sont des protéases extracellulaires ciblant la dégradation de la matrice extracellulaire et qui sont souvent associées à une augmentation de la migration, de l'invasion et de la dissémination des cellules tumorales. (111–114)

Il a déjà été montré que l'application d'un stress mécanique avait tendance à augmenter l'expression des métalloprotéases. (115)

D'autre part les cellules CT26 sont aussi connues pour exprimer la MMP-9. (116)

Ainsi nous avons étudié l'impact de nos déformations mécaniques sur l'expression de MMP-9 afin de savoir si en plus de l'augmentation de la prolifération cellulaire, la pression mécanique exercée dans notre modèle pouvait aussi favoriser la dissémination métastatique. Nous avons retrouvé les mêmes résultats qu'avec la répartition des noyaux Ki67 positifs, c'est-à-dire une augmentation de l'expression de MMP-9 à l'intérieur des sphéroïdes (au centre) là où la pression était la plus importante.

Au terme de ces expériences in vitro de sphéroïdes multicellulaires comprimés magnétiquement, l'application d'une forte contrainte mécanique semble donc favoriser la prolifération cellulaire, l'invasion et la dissémination des cellules tumorales.

Dans la 2^{ème} série d'expériences in vivo, nous avons voulu savoir si cette tendance se confirmait dans nos modèles murins connus de carcinose péritonéale.

Les principaux résultats ont confirmé les résultats obtenus in vitro avec tout d'abord un index de carcinose péritonéale (reflétant l'importance de la maladie néoplasique) plus important chez les souris ayant eu des sphéroïdes comprimés, témoignant de leur caractère plus prolifératif en cas de compression mécanique se manifestant par une maladie péritonéale plus évoluée et donc de moins bon pronostic.

Aussi il a été mis en évidence un caractère plus invasif des sphéroïdes comprimés par la présence de métastases hépatiques uniquement chez les souris ayant eu des sphéroïdes comprimés témoignant d'une plus grande dissémination métastatique en cas de compression mécanique. L'analyse histologique des métastases hépatiques a permis premièrement d'éliminer les faux positifs (nodules de carcinose péritonéale posés sur la surface du foie) et aussi de rattacher leur origine aux sphéroïdes injectés comprimés puisqu'on y retrouvait des particules de fer à la coloration de Pearls comme dans les sphéroïdes injectés en intra-péritonéal.

Par contre aucune différence n'a été retrouvée au niveau du % de Ki67 et de la localisation de la bêta-caténine sur les nodules de carcinose péritonéale chez les souris avec compression ou non. Cela s'explique peut-être par le caractère déjà très invasif des cellules CT26 donnant des nodules d'emblée évolués et prolifératifs (Ki67 entre 30 et 50 %).

4. Conclusions

Au terme de ces expérimentations nous avons pu montrer que l'application d'une contrainte mécanique sur une tumeur ou une cellule tumorale avait tendance à changer leur comportement.

En effet l'application de forces mécaniques sur des cellules tumorales a tendance à stimuler leur prolifération mais aussi à modifier leur comportement en les rendant plus invasives, favorisant ainsi la dissémination métastatique.

D'autre part nous avons eu l'impression, au travers de ce travail, que les conséquences d'une contrainte mécanique sur le comportement tumoral étaient dépendantes de l'intensité de celle-ci avec donc des résultats qui pouvaient être complètement différents en fonction du type et de l'intensité de la force mécanique appliquée.

Ainsi même si cela n'a pas été démontré clairement chez l'homme, cet aspect mécanique et ses conséquences potentielles sur le comportement tumoral doivent être donc pris en compte lors du traitement d'une tumeur afin de ne pas péjorer le pronostic des patients comme cela peut être le cas avec une endoprothèse colique.

Cela soulève également un autre aspect de l'impact de la force mécanique et notamment celui du microenvironnement sur la cancérogénèse. Ainsi comme l'ont suggéré certains dans des modèles expérimentaux une pression mécanique du microenvironnement sur une cellule pourrait la modifier et la rendre tumorale. L'aspect mécanique a donc aussi potentiellement un rôle dans le phénomène de cancérisation et doit être pris en compte dès lors qu'on étudie le développement tumoral et la dissémination métastatique.

5. Perspectives

- Afin de mieux mettre en évidence les modifications de comportement tumoral, et plus particulièrement les voies de mécanotransduction, en fonction de l'application de contraintes mécaniques il serait peut-être judicieux d'utiliser dans de futurs modèles expérimentaux des cellules moins agressives que les CT 26.

- Aussi après avoir travaillé sur les cellules tumorales elles-mêmes, il serait intéressant d'étudier plutôt le stroma tumoral et ses modifications en fonction des contraintes mécaniques afin de voir l'effet sur la cancérogénèse, mais aussi une fois la tumeur formée les modifications de son comportement. Cela permettrait aussi d'étudier l'impact des thérapeutiques sur ces tumeurs en fonction de leur stroma (comme cela est étudié par certaines équipes dans les cancers du pancréas connus pour avoir un stroma dense) ; mais également l'intérêt de mesures préventives passant par la « normalisation » d'un stroma cellulaire afin d'éviter son évolution tumorale (comme par exemple pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin).

- Enfin l'étude de ces forces mécaniques serait intéressant à rechercher aussi dans d'autres maladies comme la cirrhose hépatique entraînant une fibrose du foie, facteur de risque de cancer. En effet la question qui peut se poser est de savoir s'il existe un effet mécanique dans les phénomènes de thrombose vasculaire intra-hépatique pouvant conduire à une modification de comportement cellulaire des espaces portes entraînant une évolution tumorale.

6. Références

1. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med*. 2006;6(4):145–9.
2. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989;8(2):98–101.
3. Gayer CP, Basson MD. The effects of mechanical forces on intestinal physiology and pathology. *Cell Signal*. 2009;21(8):1237–44.
4. Brodribb AJ, Condon RE, Cowles V, DeCosse JJ. Effect of dietary fiber on intraluminal pressure and myoelectrical activity of left colon in monkeys. *Gastroenterology*. 1979;77(1):70–4.
5. Basson MD, Yu CF, Herden-Kirchoff O, Ellermeier M, Sanders MA, Merrell RC, et al. Effects of increased ambient pressure on colon cancer cell adhesion. *J Cell Biochem*. 2000;78(1):47–61.
6. Kellow JE, Phillips SF. Altered small bowel motility in irritable bowel syndrome is correlated with symptoms. *Gastroenterology*. 1987;92(6):1885–93.
7. Alizadeh H, Weems WA, Castro GA. Long-term influence of enteric infection on jejunal propulsion in guinea pigs. *Gastroenterology*. 1989;97(6):1461–8.
8. Dunn GA, Zicha D, Fraylich PE. Rapid, microtubule-dependent fluctuations of the cell margin. *J Cell Sci*. 1997;110 (Pt 24):3091–8.
9. Read NW, Gwee KA. The importance of 5-hydroxytryptamine receptors in the gut. *Pharmacol Ther*. 1994;62(1–2):159–73.
10. Shiratsuch H, Basson MD. Differential regulation of monocyte/macrophage cytokine production by pressure. *Am J Surg*. 2005;190(5):757–62.
11. Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B, Bardeesy N, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human

tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(38):15101–8.

12. Jain RK, Baxter LT. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res.* 1988;48(24 Pt 1):7022–32.

13. Baxter LT, Jain RK. Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc Res.* 1989;37(1):77–104.

14. Boucher Y, Baxter LT, Jain RK. Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res.* 1990;50(15):4478–84.

15. Boucher Y, Kirkwood JM, Opacic D, Desantis M, Jain RK. Interstitial hypertension in superficial metastatic melanomas in humans. *Cancer Res.* 1991;51(24):6691–4.

16. Boucher Y, Jain RK. Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Res.* 1992;52(18):5110–4.

17. Gutmann R, Leunig M, Feyh J, Goetz AE, Messmer K, Kastenbauer E, et al. Interstitial hypertension in head and neck tumors in patients: correlation with tumor size. *Cancer Res.* 1992;52(7):1993–5.

18. Boucher Y, Lee I, Jain RK. Lack of general correlation between interstitial fluid pressure and oxygen partial pressure in solid tumors. *Microvasc Res.* 1995;50(2):175–82.

19. Boucher Y, Leunig M, Jain RK. Tumor angiogenesis and interstitial hypertension. *Cancer Res.* 1996;56(18):4264–6.

20. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science.* 2002;296(5574):1883–6.

21. Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure

- gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.* 2004;64(11):3731–6.
22. Jain RK, Tong RT, Munn LL. Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and lymphatic metastasis: insights from a mathematical model. *Cancer Res.* 2007;67(6):2729–35.
23. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005;307(5706):58–62.
24. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 2001;7(9):987–9.
25. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 2011;91(3):1071–121.
26. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature.* 2011;475(7355):226–30.
27. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):393–410.
28. Henson PM, Hume DA. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* 2006;27(5):244–50.
29. Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res.* 1978;28:149–250.
30. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994;9(6):1799–805.
31. Hengst L, Reed SI. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998;227:25–41.

32. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991;351(6326):453–6.
33. Haneveld GT. Compression as a treatment of cancer, a historical survey. *Arch Chir Neerl*. 1979;31(1):1–8.
34. Recamier on Cancer. *Medico-Chir Rev*. 1830;12(24):490–1.
35. Walshe WH. Practical Treatise on Cancerous Diseases and on Curable Affections Confounded with Cancer. *Br Foreign Medico-Chir Rev*. 1853;11(21):92–105.
36. Helmstein, K. Treatment of bladder carcinoma by a hydrostatic pressure technique. Report on 76 cases. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1264475>
37. England HR, Rigby C, Shephard BG, Tresidder GC, Blandy JP. Evaluation of Helmstein's distension method for carcinoma of the bladder. *Br J Urol*. 1973;45(6):593–9.
38. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249–57.
39. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(11):839–49.
40. Willis RA. The place of histopathology in cancer research. *Med Press*. 1961;245:339–43.
41. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*. 2003;200(4):429–47.
42. Starz-Gaiano M, Montell DJ. Genes that drive invasion and migration in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14(1):86–91.
43. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):540–50.
44. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 1998;153(3):865–

- 73.
45. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):563–72.
46. Whitehead J, Vignjevic D, Fütterer C, Beaurepaire E, Robine S, Farge E. Mechanical factors activate beta-catenin-dependent oncogene expression in APC mouse colon. *HFSP J*. 2008;2(5):286–94.
47. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 2004;427(6976):695.
48. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 2005;8(3):241–54.
49. Huang S, Chen CS, Ingber DE. Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell*. 1998;9(11):3179–93.
50. Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol*. 1997;15(8):778–83.
51. Avvisato CL, Yang X, Shah S, Hoxter B, Li W, Gaynor R, et al. Mechanical force modulates global gene expression and beta-catenin signaling in colon cancer cells. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 15):2672–82.
52. Benoliel AM, Pirro N, Marin V, Consentino B, Pierres A, Vitte J, et al. Correlation between invasiveness of colorectal tumor cells and adhesive potential under flow. *Anticancer Res*. 2003;23(6C):4891–6.
53. Walsh MF, Woo RK, Gomez R, Basson MD. Extracellular pressure stimulates colon cancer cell proliferation via a mechanism requiring PKC and tyrosine kinase signals. *Cell Prolif*. 2004;37(6):427–41.
54. Streit M, Schmidt R, Hilgenfeld RU, Thiel E, Kreuser ED. Adhesion receptors in

malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *Recent Results Cancer Res.* 1996;142:19–50.

55. Haier J, Nasralla M, Nicolson GL. Cell surface molecules and their prognostic values in assessing colorectal carcinomas. *Ann Surg.* 2000;231(1):11–24.

56. Stupack DG. The biology of integrins. *Oncology (Williston Park).* 2007;21(9 Suppl 3):6–12.

57. Thamilselvan V, Basson MD. The role of the cytoskeleton in differentially regulating pressure-mediated effects on malignant colonocyte focal adhesion signaling and cell adhesion. *Carcinogenesis.* 2005;26(10):1687–97.

58. Verspaget HW, Biemond I, Allaart CF, van Weede H, Weterman IT, Gooszen HG, et al. Assessment of plasma fibronectin in Crohn's disease. *Hepatogastroenterology.* 1991;38(3):231–4.

59. van der Voort van Zyp J, Thamilselvan V, Walsh M, Polin L, Basson MD. Extracellular pressure stimulates colon cancer cell adhesion in vitro and to surgical wounds by Src (sarcoma protein) activation. *Am J Surg.* 2004;188(5):467–73.

60. Craig DH, Downey C, Basson MD. SiRNA-mediated reduction of alpha-actinin-1 inhibits pressure-induced murine tumor cell wound implantation and enhances tumor-free survival. *Neoplasia.* 2008;10(3):217–22.

61. Craig DH, Owen CR, Conway WC, Walsh MF, Downey C, Basson MD. Colchicine inhibits pressure-induced tumor cell implantation within surgical wounds and enhances tumor-free survival in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(9):3170–80.

62. Cabane B, Bonnet-Gonnet C. Osmotic pressure of latex dispersion. *Langmuir.* 1994;10:4012–21.

63. Bouchoux A, Cayemite PE, Jardin J, Gésan-Guiziu G, Cabane B. Casein micelle dispersions under osmotic stress. *Biophys J.* 2009;96(2):693–706.

64. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol.* 2010;148(1):3–15.
65. Montel F, Delarue M, Elgeti J, Malaquin L, Basan M, Risler T, et al. Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids. *Phys Rev Lett.* 2011;107(18):188102.
66. Delarue M, Montel F, Vignjevic D, Prost J, Joanny JF, Cappello G. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophys J.* 2014;107(8):1821–8.
67. Demou ZN. Gene expression profiles in 3D tumor analogs indicate compressive strain differentially enhances metastatic potential. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(11):3509–20.
68. Ben-Eliyahu S. The promotion of tumor metastasis by surgery and stress: immunological basis and implications for psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun.* 2003;17 Suppl 1:S27-36.
69. Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJ, Baum M, Gukas ID. The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Ann Oncol.* 2008;19(11):1821–8.
70. Hiller JG, Perry NJ, Pouligiannis G, Riedel B, Sloan EK. Perioperative events influence cancer recurrence risk after surgery. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(4):205–18.
71. Tsuchiya Y, Sawada S, Yoshioka I, Ohashi Y, Matsuo M, Harimaya Y, et al. Increased surgical stress promotes tumor metastasis. *Surgery.* 2003;133(5):547–55.
72. Shiromizu A, Suematsu T, Yamaguchi K, Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S. Effect of laparotomy and laparoscopy on the establishment of lung metastasis in a murine model. *Surgery.* 2000;128(5):799–805.
73. Raa ST, Oosterling SJ, van der Kaaij NP, van den Tol MP, Beelen RH, Meijer S, et al. Surgery promotes implantation of disseminated tumor cells, but does not increase growth of tumor cell clusters. *J Surg Oncol.* 2005;92(2):124–9.

74. Azuar AS, Matsuzaki S, Darcha C, Déchelotte PJ, Pouly JL, Mage G, et al. Impact of surgical peritoneal environment on postoperative tumor growth and dissemination in a preimplanted tumor model. *Surg Endosc.* 2009;23(8):1733–9.
75. Lee SW, Southall J, Allendorf J, Bessler M, Whelan RL. Traumatic handling of the tumor independent of pneumoperitoneum increases port site implantation rate of colon cancer in a murine model. *Surg Endosc.* 1998;12(6):828–34.
76. Mutter D, Hajri A, Tasseti V, Solis-Caxaj C, Aprahamian M, Marescaux J. Increased tumor growth and spread after laparoscopy vs laparotomy: influence of tumor manipulation in a rat model. *Surg Endosc.* 1999;13(4):365–70.
77. Turnbull RB, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg.* 1967;166(3):420–7.
78. Hayashi N, Egami H, Kai M, Kurusu Y, Takano S, Ogawa M. No-touch isolation technique reduces intraoperative shedding of tumor cells into the portal vein during resection of colorectal cancer. *Surgery.* 1999;125(4):369–74.
79. Takii Y, Shimada Y, Moriya Y, Nakamura K, Katayama H, Kimura A, et al. A randomized controlled trial of the conventional technique versus the no-touch isolation technique for primary tumor resection in patients with colorectal cancer: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1006. *Jpn J Clin Oncol.* 2014;44(1):97–100.
80. Sabbagh C, Browet F, Diouf M, Cosse C, Brehant O, Bartoli E, et al. Is Stenting as “a Bridge to Surgery” an Oncologically Safe Strategy for the Management of Acute, Left-Sided, Malignant, Colonic Obstruction?: A Comparative Study With a Propensity Score Analysis. *Ann Surg.* 2013;258(1):107-15.
81. Foo CC, Poon SH, Chiu RH, Lam WY, Cheung LC, Law WL. Is bridge to surgery stenting a safe alternative to emergency surgery in malignant colonic obstruction: a meta-analysis of randomized control trials. *Surg Endosc.* 2019;33(1):293–302.

82. Maruthachalam K, Lash GE, Shenton BK, Horgan AF. Tumour cell dissemination following endoscopic stent insertion. *Br J Surg.* 2007;94(9):1151–4.
83. Kim HJ, Choi GS, Park JS, Park SY, Jun SH. Higher rate of perineural invasion in stent-laparoscopic approach in comparison to emergent open resection for obstructing left-sided colon cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2013;28(3):407–14.
84. Steinert R, Hantschick M, Vieth M, Gastinger I, Kühnel F, Lippert H, et al. Influence of subclinical tumor spreading on survival after curative surgery for colorectal cancer. *Arch Surg.* 2008;143(2):122–8.
85. Zigmond E, Halpern Z, Elinav E, Brazowski E, Jung S, Varol C. Utilization of murine colonoscopy for orthotopic implantation of colorectal cancer. *PloS One.* 2011;6(12):e28858.
86. Mazuel F, Reffay M, Du V, Bacri JC, Rieu JP, Wilhelm C. Magnetic flattening of stem-cell spheroids indicates a size-dependent elastocapillary transition. *Phys Rev Lett.* 2015;114(9):098105.
87. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics.* 2009;25(11):1463–5.
88. Tinevez JY, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, et al. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods.* 2017;115:80–90.
89. Lo Dico R, Tijeras-Raballand A, Bonnin P, Launay JM, Kaci R, Pimpie C, et al. Hepatectomy increases metastatic graft and growth in an immunocompetent murine model of peritoneal metastases. *Eur J Surg Oncol.* 2018;44(6):784–91.
90. Eveno C, Contreres JO, Hainaud P, Nemeth J, Dupuy E, Pocard M. Netrin-4 overexpression suppresses primary and metastatic colorectal tumor progression. *Oncol Rep.* 2013;29(1):73–8.
91. Matsuda A, Miyashita M, Matsumoto S, Matsutani T, Sakurazawa N, Takahashi G, et

- al. Comparison of long-term outcomes of colonic stent as “bridge to surgery” and emergency surgery for malignant large-bowel obstruction: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(2):497–504.
92. Pirlet IA, Slim K, Kwiatkowski F, Michot F, Millat BL. Emergency preoperative stenting versus surgery for acute left-sided malignant colonic obstruction: a multicenter randomized controlled trial. *Surg Endosc*. 2011;25(6):1814–21.
93. Small AJ, Coelho-Prabhu N, Baron TH. Endoscopic placement of self-expandable metal stents for malignant colonic obstruction: long-term outcomes and complication factors. *Gastrointest Endosc*. 2010;71(3):560–72.
94. van Hooft JE, Bemelman WA, Oldenburg B, Marinelli AW, Holzik MF, Grubben MJ, et al. Colonic stenting versus emergency surgery for acute left-sided malignant colonic obstruction: a multicentre randomised trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(4):344–52.
95. Abedini F, Ismail M, Hosseinkhani H, Ibrahim TAT, Omar AR, Chong PP, et al. Effects of CXCR4 siRNA/dextran-spermine nanoparticles on CXCR4 expression and serum LDH levels in a mouse model of colorectal cancer metastasis to the liver. *Cancer Manag Res*. 2011;3:301–9.
96. Schwartz MK. Enzymes as prognostic markers and therapeutic indicators in patients with cancer. *Clin Chim Acta*. 1992;206(1–2):77–82.
97. Lukacova S, Sørensen BS, Alsner J, Overgaard J, Horsman MR. The impact of hypoxia on the activity of lactate dehydrogenase in two different pre-clinical tumour models. *Acta Oncol*. 2008;47(5):941–7.
98. Zabala M, Alzuguren P, Benavides C, Crettaz J, Gonzalez-Aseguinolaza G, Ortiz de Solorzano C, et al. Evaluation of bioluminescent imaging for noninvasive monitoring of colorectal cancer progression in the liver and its response to immunogene therapy. *Mol Cancer*. 2009;8:2.

99. Zinn KR, Chaudhuri TR, Szafran AA, O'Quinn D, Weaver C, Dugger K, et al. Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. *ILAR J.* 2008;49(1):103–15.
100. Badr CE, Tannous BA. Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends Biotechnol.* 2011;29(12):624–33.
101. Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, et al. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia.* 2000;2(6):491–5.
102. Landázuri N, Tong S, Suo J, Joseph G, Weiss D, Sutcliffe DJ, et al. Magnetic targeting of human mesenchymal stem cells with internalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Small.* 2013;9(23):4017–26.
103. Mazuel F, Espinosa A, Luciani N, Reffay M, Le Borgne R, Motte L, et al. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano.* 2016 23;10(8):7627–38.
104. Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PloS One.* 2009;4(2):e4632.
105. Mpekris F, Angeli S, Pirentis AP, Stylianopoulos T. Stress-mediated progression of solid tumors: effect of mechanical stress on tissue oxygenation, cancer cell proliferation, and drug delivery. *Biomech Model Mechanobiol.* 2015;14(6):1391–402.
106. Nia HT, Liu H, Seano G, Datta M, Jones D, Rahbari N, et al. Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology. *Nat Biomed Eng.* 2016;1.
107. Voutouri C, Polydorou C, Papageorgis P, Gkretsi V, Stylianopoulos T. Hyaluronan-Derived Swelling of Solid Tumors, the Contribution of Collagen and Cancer Cells, and Implications for Cancer Therapy. *Neoplasia.* 2016;18(12):732–41.
108. Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA, Wilcox-Adelman SA, Boucher Y, Jain RK, et al.

- Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(3):911–6.
109. Kalli M, Papageorgis P, Gkretsi V, Stylianopoulos T. Solid Stress Facilitates Fibroblasts Activation to Promote Pancreatic Cancer Cell Migration. *Ann Biomed Eng.* 2018;46(5):657–69.
110. Desmaison A, Frongia C, Grenier K, Ducommun B, Lobjois V. Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids. *PloS One.* 2013;8(12):e80447.
111. Kee JY, Han YH, Park J, Kim D-S, Mun JG, Ahn KS, et al. β -Lapachone Inhibits Lung Metastasis of Colorectal Cancer by Inducing Apoptosis of CT26 Cells. *Integr Cancer Ther.* 2017;16(4):585–96.
112. Gebhard C, Fuchs-Baumgartinger A, Razzazi-Fazeli E, Miller I, Walter I. Distribution and activity levels of matrix metalloproteinase 2 and 9 in canine and feline osteosarcoma. *Can J Vet Res.* 2016;80(1):66–73.
113. Aparicio T, Lehy T. Matrix metalloproteases in digestive pathology. *Gastroenterol Clin Biol.* 1999;23(3):330–41.
114. Walter M, Simanovich E, Brod V, Lahat N, Bitterman H, Rahat MA. An epitope-specific novel anti-EMMPRIN polyclonal antibody inhibits tumor progression. *Oncoimmunology.* 2016;5(2):e1078056.
115. Qazi H, Shi ZD, Tarbell JM. Fluid shear stress regulates the invasive potential of glioma cells via modulation of migratory activity and matrix metalloproteinase expression. *PloS One.* 2011;6(5):e20348.
116. Chen YJ, Chang WM, Liu YW, Lee CY, Jang YH, Kuo CD, et al. A small-molecule metastasis inhibitor, norcantharidin, downregulates matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting Sp1 transcriptional activity in colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2009;181(3):440–6.

7. Annexes

Ann Surg Oncol
DOI 10.1245/s10434-015-4588-y

Annals of
SURGICAL ONCOLOGY
OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY OF SURGICAL ONCOLOGY



ORIGINAL ARTICLE – TRANSLATIONAL RESEARCH AND BIOMARKERS

Insertion of a Stent in Obstructive Colon Cancer Can Induce a Metastatic Process in an Experimental Murine Model

Brice Malgras, MD^{1,2}, Laura Brullé, PhD³, Réa Lo Dico, MD^{1,2,4}, Fatima El Marjou, PhD³, Sylvie Robine, PhD³, Amu Therwath, MD, PhD^{1,4}, and Marc Pocard, MD, PhD^{1,2,4}

¹UMR INSERM 965—Carcinomatosis Angiogenesis and Translational Research Lab, Lariboisière Hospital, Paris, France; ²Oncologic and Digestive Surgical Unit, Lariboisière Hospital, Paris, France; ³Unité UMR 144, Institut Curie, Paris, France; ⁴Université Diderot, Paris, France

ABSTRACT

Background. Colonic self-expanding metallic stents (SEMS) are used in obstructive colorectal cancer patients as a bridge to surgery. However, its oncologic safety remains uncertain. Therefore, we attempted to clarify this further with an experimental study and constructed a mouse model of colonic cancer.

Methods. CT26 cells were injected in the rectal wall, and to mimic SEMS, a cardiac stent was inserted under endoscopy in occlusive (75 % lumen occlusion) tumors. We set up a control group ($n = 22$) and a stent group ($n = 16$), and the findings were compared. We focused on serum lactate dehydrogenase (LDH) concentrations, circulating tumor cells, survival time, peritoneal carcinomatosis, liver metastases, and bioluminescence.

Results. One week after stent insertion, the serum LDH concentrations were significantly higher in the stent group (506 ± 203 IU/L) compared to the controls (229 ± 52 IU/L) ($P = 0.005$). The average survival time before sacrifice was significantly lower in the stent group (15.2 ± 1 days) compared to the controls (20 ± 5 days) ($P = 0.005$). The presence of a peritoneal carcinomatosis was more frequently observed in the stent group (75 %) than in the controls

(50 %). Liver metastases were observed in 19 % of the stent group compared to the controls (4.5 %) ($P = 0.29$). After multivariate analysis, the stent group was still found to be associated with significantly lower survival time ($P = 0.002$).

Conclusions. These observations led us to conclude that in our mouse model, SEMS resulted in an increased metastatic process and a shorter survival time. We suggest, therefore, that the utmost caution be exercised when opting for a stent as a bridge to surgery.

Patients with an obstructive colorectal cancer pose a dilemma for the surgeons because of the association of obstruction and cancer. Previous studies have reported poor outcome and increased postoperative mortality in such patients.^{1–3} Emergency surgery, though controversial, is an option in this situation, although with a risk of high morbidity and mortality.^{4,5}

In order to improve the situation, the use of colonic self-expanding metallic stents (SEMS) has been proposed as a bridge to surgery to relieve obstruction before elective operation.⁶ Initial studies have dealt with the feasibility, the efficacy, and the decline in short-term morbidity after the insertion of a colonic SEMS compared to emergency surgery.^{7,8} Three multicenter randomized trials using colonic SEMS were terminated prematurely because of safety considerations related to colonic perforations and morbidity.^{6,9,10} However, in a meta-analysis, SEMS as a bridge to surgery was found to have a high successful primary anastomosis and low overall stoma rates, with no significant difference in complications or mortality. Thus, it was validated in the National Institute for Clinical Excellence (NICE) process.^{4,11} Moreover, a recent study showed that SEMS was oncologically comparable to emergency surgery with respect to overall survival, disease-free survival, and recurrence.¹²

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1245/s10434-015-4588-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

© Society of Surgical Oncology 2015

First Received: 21 January 2015

B. Malgras, MD
e-mail: bricemalgras@hotmail.com

Published online: 09 May 2015

Facteurs mécaniques de la dissémination tumorale

Résumé: les tumeurs ne se développent pas de façon isolée mais ont besoin systématiquement de leur microenvironnement avec lequel elles sont en constante interaction biochimique. La croissance d'une tumeur entraîne une augmentation de son volume qui se fait donc aux dépens des tissus environnants au sein desquels elle se développe; ainsi la question est de savoir si dans ce processus de croissance tumorale il existe, en plus du dialogue biochimique, des interactions mécaniques entre la tumeur et son environnement (ou la cellule tumorale et son microenvironnement) liées à cette compétition dans l'espace. N'ayant donc pas la preuve formelle dans les études cliniques et/ou expérimentales disponibles que les contraintes mécaniques appliquées sur une cellule tumorale ou une tumeur peuvent altérer le pronostic oncologique, nous avons décidé de l'étudier au travers de plusieurs modèles expérimentaux.

Ainsi nous avons donc tout d'abord voulu étudier dans une première série d'expériences l'impact d'une force mécanique exercée sur une tumeur primitive en récréant la situation de l'endoprothèse digestive qui lève l'occlusion liée à une tumeur du côlon.

Nous avons donc mis en place un modèle murin de tumeur occlusive du côlon puis testé les répercussions de la mise en place d'une endoprothèse.

Dans une 2^{ème} série d'expériences nous avons voulu étudier cet impact mécanique plus au niveau cellulaire avec l'application de contraintes mécaniques sur les cellules tumorales utilisées dans notre premier modèle murin afin de voir si les résultats étaient concordants tant au niveau microscopique que macroscopique.

Au terme de ces expérimentations nous avons pu montrer que l'application d'une contrainte mécanique sur une tumeur ou une cellule tumorale avait tendance à changer leur comportement. En effet l'application de forces mécaniques sur des cellules tumorales a tendance à stimuler leur prolifération mais aussi à modifier leur comportement en les rendant plus invasives, favorisant ainsi la dissémination métastatique. Ainsi même si cela n'a pas été démontré clairement chez l'homme, cet aspect mécanique et ses conséquences potentielles sur le comportement tumoral doivent être donc pris en compte lors du traitement d'une tumeur afin de ne pas péjorer le pronostic des patients comme cela peut être le cas avec une endoprothèse colique.

Mots clés : tumeur; force; mécanique; prolifération; métastase ; pronostic.

Mechanical factors of metastatic dissemination.

Abstract: tumors do not grow in isolation but they need their microenvironment with which they are in constant biochemical interaction. Tumor growth leads to an increase in its volume at the expense of the surrounding tissues in which it develops; Thus, the question is whether in this process of tumor growth, in addition to the biochemical dialogue, are there mechanical interactions between the tumor and its environment (or the tumor cell and its microenvironment) related to this space competition? Therefore, having no formal proof in the available clinical and / or experimental studies that the mechanical stresses applied to a tumor cell or a tumor can alter the oncological prognosis, we decided to study it through several experimental models.

Thus we first wanted to study in a first series of experiments the impact of a mechanical force exerted on a primary tumor by recreating the situation of the digestive stent that lifts the occlusion related to a tumor of the colon .

We therefore set up a murine model of occlusive colon tumor and then tested the repercussions of the placement of a stent.

In a second series of experiments we wanted to study this mechanical impact more at the cellular level with the application of mechanical stress on the tumor cells used in our first mouse model to see if the results were consistent at both microscopic and macroscopic levels.

At the end of these experiments we were able to show that the application of a mechanical stress on a tumor or tumor cells tended to change their behavior. Indeed the application of mechanical stress on tumor cells tends to stimulate their proliferation but also to change their behavior by making them more invasive, thus promoting metastatic spread. Thus, although this has not been clearly demonstrated in humans, this mechanical aspect and its potential consequences on tumor behavior must therefore be taken into account when treating a tumor so as not to jeopardize the prognosis of patients as this may be the case with a colonic stent.

Keywords : tumor; stress; mechanical; proliferation; metastasis; prognosis.