

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE ED 524

FACULTE DE MEDECINE

EA3842 – Homéostasie cellulaire et pathologies

Année 2012

Thèse n° [...]

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie-Santé

présentée et soutenue publiquement par

Carole MÉLIN

Stratégies d'isolement et de caractérisation des cellules initiatrices de cancer colorectal

le 19 Octobre 2012

Thèse co-dirigée par **Pr Muriel MATHONNET** et **Dr Serge BATTU**

JURY :

Mme Marie-Odile JAUBERTEAU	Professeur, Univ. Limoges	Président
M. Stéphane PYRONNET	D.R., INSERM, Toulouse	Rapporteur
Mme Gaëtane LESPES	Professeur, Univ. Pau	Rapporteur
M. Serge BATTU	M.C.U., Univ. Limoges	Examineur
Mme Muriel MATHONNET	P.U.P.H., Univ. Limoges	Examineur
M. Mauricio HOYOS	C.R., ESPCI Paris	Invité

Remerciements

A Madame le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier au Laboratoire d'Immunologie

Faculté de Médecine, Université de Limoges

Directrice de l'EA3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies

Je vous remercie pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Vous vous êtes montrée très disponible et à mon écoute tout au long de ma thèse, et je vous en remercie de tout cœur. Soyez assurée, Madame, de tout mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Stéphane PYRONNET

Directeur de recherche dans l'unité U1037

Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

CNRS/INSERM/ UPS

Recevez, Monsieur, mes plus sincères remerciements pour m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteur. Je tiens à vous exprimer ma plus profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Gaëtane LESPES

Professeur des Universités

Technopôle Hélio parc Pau Pyrénées

LCABIE UMR5254

Je suis très touchée de l'honneur que tu me fais en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je garde un excellent souvenir de notre rencontre dans des conditions privilégiées à San Francisco. J'espère sincèrement pouvoir continuer à travailler en collaboration avec toi. Je te remercie pour ta présence dans ce jury et sois assurée de tout mon respect et de ma plus profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur Mauricio HOYOS

Chargé de recherche

ESPCI Paris

Laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes, UMR CNRS 7636

Recevez, Monsieur, mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Soyez assuré de ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Serge BATTU

Maître de conférences des Universités

Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

EA3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies

Directeur de thèse.

Je pense que ces quelques mots de remerciements ne suffiront pas à exprimer toute la gratitude que j'ai pour toi. Tu m'as permis d'évoluer aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Cette bonne entente entre un chef et son étudiante va réellement me manquer. Je garderai un excellent souvenir de cette thèse, en grande partie grâce à toi, à nos bons moments, à nos séjours (près de la maison bleue, adossée à la colline) mais aussi avec du recul, à nos mauvais moments, qui maintenant me font sourire ! Je n'oublie pas que je te dois beaucoup et j'espère te l'avoir bien rendu et que je continuerai à bien te le rendre !

A Madame le Professeur Muriel MATHONNET

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier au Service de Chirurgie Viscérale et Endocrinienne (CHU de Limoges)

Faculté de Médecine, Université de Limoges

EA3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies

Directrice de thèse.

Je vous remercie de tout cœur pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Vous avez été pour moi d'une grande aide, disponibilité (malgré un emploi du temps bien chargé), gentillesse. Merci pour la confiance dont vous m'avez prouvé et tout votre soutien. J'ai vraiment apprécié nos discussions, qu'elles soient scientifiques ou personnelles et nos moments passés ensemble. Soyez assurée de toute mon estime et mon profond respect.

A Madame le Docteur Aurélie PERRAUD

Ingénieur de recherche au CHU de Limoges
Faculté de Médecine, Université de Limoges
EA3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies

Sans toi, ma thèse n'aurait vraiment pas été ce qu'elle est devenue. Parce que tu as de réelles qualités scientifiques mais aussi parce que tu es une personne exceptionnelle. Je ne saurais comment te remercier de tout ce que tu m'as apporté, de toute ta gentillesse, ta patience et ta bonne humeur. Tous nos petits moments passés ensemble ont fait de toi une réelle amie à qui je dois énormément, scientifiquement parlant mais aussi humainement. Un grand merci pour tout.

Je remercie également le Conseil Régional du Limousin ainsi que la Ligue contre le Cancer pour leurs soutiens financiers.

Les remerciements suivants sont pour les personnes de la faculté de Médecine et de Pharmacie de Limoges.

Je remercie bien évidemment toute mon équipe, doctorants et statutaires qui m'ont permis de faire ma thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie en particulier Fabrice pour sa « Creusitude » et les bons moments pendant lesquels nous avons bien ri. Je me souviendrai toujours de la forêt de Chizé... Merci également à Danielle, Mimi, Marie-Hélène pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci à tous les docteurs et doctorants qui m'ont subie tout au long de ma thèse. Merci à Hussein, le plus beau Libanais du monde, à Cynthia avec qui j'ai passé de superbes moments, Marie-Claude qui a failli m'éplucher plus d'une fois, Lydie (le bleu te va si bien...), Pierre le Karatékid, Docteur Kim, Sofiane notre chouchoutte adorée, Soha, ...

Merci à mon petit Barbouze. On a passé des moments géniaux ensemble, dans le labo et en dehors. Je ne te souhaite que du bonheur, tu le mérites vraiment...

Un grand merci à Mathilde grâce à qui je garderai des moments impérissables du laboratoire, de notre truc en plumes, et des câlins de toutes circonstances.

Merci à Barbara (Chef, oui Chef !) même si je sais que tu m'aimes pas et que tu veux pas me faire de bisous...

Merci à Aurélie Lacroix, ma voisine de bureau, pour tous ces bons fous rires et ces moments de détente. Je te souhaite bien du bonheur dans ta vie professionnelle et personnelle.

Merci bien évidemment à mon petit Elodie, à tous nos bons moments... Je te remercie parmi les doctorants de l'équipe, je dois bien ça à notre mascotte ! Merci ma petite viandarde pour ton soutien.

Un grand grand grand merci à mon compagnon de galère, Romain qui a dû me subir dans les meilleurs et les pires moments. J'espère que je te le rendrai bien quand ce sera ton tour...

Je finis en remerciant ma famille. Je remercie mes parents pour m'avoir soutenue tout au long de mon parcours universitaire qui n'a pas forcément été très simple et pour m'avoir soutenu quelques soient mes choix. Merci à ma grande sœur adorée, ma fierté, qui m'a montré toute sa confiance et son soutien.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	14
INTRODUCTION GENERALE	19
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	21
A. Le cancer colorectal	22
I. Epidémiologie	22
II. Anatomie et cancérogenèse colorectales	23
II.1. L'anatomie générale du côlon.....	23
II.2. Structure normale de la crypte intestinale.....	24
II.3. La cancérogenèse colorectale, le processus multi-étapes.....	26
a. L'instabilité chromosomique ou CIN (Chromosome INstability).....	26
b. L'instabilité microsatellitaire ou MSI (MicroSatellite Instability).....	26
c. Les Proto-oncogènes	26
d. Les gènes suppresseurs de tumeur	27
III. La classification des cancers colorectaux et les bases thérapeutiques.....	31
III.1. Classification des CCR.....	31
III.2. Bases thérapeutiques de la prise en charge des CCR.....	34
B. Les cellules initiatrices de cancer dans le côlon	37
I. Les cellules souches intestinales saines	37
I.1. Caractéristiques fonctionnelles des cellules souches.....	37
I.2. La régulation des cellules souches intestinales	38
a. La voie Wnt.....	38
b. La voie PTEN-PI3K-Akt	40
c. La voie BMP	40
d. La voie Notch	40
e. La voie Hedgehog	40
II. Les cellules initiatrices de tumeur	41
II.1 L'origine du concept de cellules souches cancéreuses.....	41
II.2. Les CIC et le microenvironnement tumoral.....	41
II.3. La caractérisation des CIC au sein du CCR.....	42
II.4. Les marqueurs des CIC au sein du CCR.....	44
II.5. Le rôle des CIC dans la résistance thérapeutique des CCR	47
a. CIC et résistance à l'irradiation.....	47
b. CIC et résistance à la chimiothérapie.....	48

C. Le fractionnement par couplage flux force	51
I. Principes généraux	51
II. Les modes d'élu­tion.....	54
II.1. Mode normal ou mode brownien	56
II.2. Mode Stérique-Inertiel, mode par focalisation.....	57
a. Le mode inertiel	57
b. Le mode stérique.....	59
III. Le facteur de rétention.....	60
III.1. Définition.....	60
III.2. Applications.....	61
IV. Développement instrumental.....	62
IV.1 La SdFFF.....	62
IV.2. Développement instrumental de phase-1.....	64
IV.3. Développement instrumental de phase-2.....	68
V. Adaptation à l'analyse biologique	71
V.1. Méthodologies, instrumentation et procédures spécifiques	73
a. Parois du canal et composition de la phase mobile	74
b. La procédure d'injection.....	74
c. Conditions optimales d'élu­tion.....	76
V.2. Respect de l'intégrité cellulaire	79
V.3. Pré requis analytiques	80
V.4. Méthodologie de mise en œuvre dans le domaine biologique	81
a. Simplicité, rapidité et faible coût.	81
b. De la collection de fraction à la calibration du fractogramme	84
VI. Applications de la SdFFF au tri cellulaire.....	86
 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	 88
 RESULTATS.....	 90
 A. Isolement par SdFFF et caractérisation des cellules initiant le CCR	 91
I. ARTICLE 1 : Isolement par SdFFF et caractérisation <i>in vitro</i>	91
II. ARTICLE 2 : Etude de la capacité tumorigénique des différentes populations issues de SdFFF sur le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet.....	101
III. Etude de la capacité tumorigénique des différentes populations issues de SdFFF chez la souris SCID.....	114
III. 1. Introduction	114
III.2. Matériel et méthodes	115
a. Culture cellulaire et tri par SdFFF.....	115
b. Modèles de greffes chez la souris SCID.....	115
c. Analyses histologiques et immunohistochimiques	116

III.3. Résultats	116
a. Greffes hétérotopiques : modèle d'injection sous-cutanée	116
b. Greffes orthotopiques : modèle d'injection en position intra-caecale	121
III.4. Conclusions	125
B. Méthode d'enrichissement en cellules initiant le cancer par un milieu spécifique	126
C. Développement d'un nouvel outil instrumental de tri par SdFFF	149
D. Suivi de modifications biologiques induites par des nanotubes de carbone sur des cellules de CCR par SdFFF	169
DISCUSSION GENERALE.....	173
A. Le tri cellulaire par SdFFF	174
I. Obtention de fractions homogènes à partir de lignées humaines de CCR	174
II. Suivi par SdFFF d'évènements biologiques induits par les nanotubes de carbone <i>in vitro</i>	176
III. Amélioration de l'outil technique de SdFFF : le Splitt.....	177
B. Obtention de tumeurs à partir de populations homogènes.....	178
I. Intérêts d'utilisation de milieux spécifiques.....	178
I.1 Le milieu défini OncoMid.....	178
I.2. Le Matrigel.....	180
II. Le modèle de la CAM d'embryon de poulet	181
III. Le modèle mammifère : souris SCID	184
CONCLUSIONS / PERSPECTIVES	187
ANNEXE : Neurotrophines et CCR	192
BIBLIOGRAPHIE.....	208

LISTE DES ABREVIATIONS

-A-

A4F	Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation
ABC	ATP-Binding Cassette
AcFFF	Acoustical FFF
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALCAM	Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule
ALDH	Aldéhyde Déshydrogénase
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide RiboNucléique
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated

-B-

BAX	BCL-2 Associated X protein
BCL-2	B Cell Lymphoma-2
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine

-C-

CAF	Carcinoma Associated Fibroblasts
CAM	Chorio-Allantoïc Membran
CCD	Charge-Coupled Device
CCR	Cancer ColoRectal
CHK	Checkpoint Kinase
CIC	Cellules Initiant le Cancer
CLHP	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance
CIN	Chromosome INstability
CK1	Caséine Kinase I
CK20	Cytokératine 20
CS	Cellule Souche
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CSI	Cellule Souche Intestinale
CSM	Cellule Souche Mésoenchymateuse

-D-

DEP Diélectrophorèse

-E-

EdU 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
EIFFF Electrical FFF
ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMT Epithelial–Mesenchymal Transition
EpCAM Epithelial Cell Adhesion Molecule
EpICD EpCAM IntraCellular Domain
ERK Extracellular signal-Regulated Kinase

-F-

F1, F2, F3 Fraction 1, 2, 3
FACS Fluorescent Activated Cell Sorting
FFF Field Flow Fractionation
FIFFF Flow FFF
FOLFIRI Folinic acid- Fluorouracil-Irinotecan
FOLFOX Folinic acid- Fluorouracil-Oxaliplatin
Fz Frizzled

-G-

GFFF Gravitational FFF
GSK3 β Glycogen Synthase Kinase 3 β
GTP Guanosine-5'-TriPhosphate

-H-

HER Human Epidermal growth factor Receptor
HF5 Hollow Fiber FIFFF
HIF Hypoxia Inducible Factor
HNPCC Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer

-I-

INCA Institut National du Cancer

-L-

LAM	Leucémie Aigüe Myéloïde
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LGR5	Leucine-rich repeat containing G-protein coupled Receptor 5
LOH	Loss Of Heterozygosity
LRP	Low-density lipid Receptor Protein

-M-

MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MALLS	Multi Angle Laser Light Scattering
MAPK	Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases
MDR	MultiDrug Resistance
MgFFF	Magnetical FFF
MLH1	MutL homolog 1
MMR	MisMatch Repair
MRP1	Multidrug Resistance Protein 1
MSI	MicroSatellite Instability
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MWCNT	Multi-Walled Carbon NanoTube

-N-

NICD	Notch IntraCellular Domain
NOD/SCID	NonObese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency
NTC	NanoTube de Carbone

-O-

Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
--------------	--

-P-

PAF	Polypose Adénomateuse Familiale
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDK1	Phosphoinositide Dependent Kinase 1
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PT	Pic Total
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10

-R-

R0	Résidu 0
R_{obs}	Rétention observée
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

-S-

Sd	Sélectivité
SdFFF	Sedimentation Field Flow Fractionation
SNA	Sambucus Nigra
SP	Side Population
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
SWCNT	Single-Walled Carbon NanoTube

-T-

TCF	T-Cell Factor
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
ThFFF	Thermal FFF
TNM	Tumor-Node-Metastasis
TR	Temps de Rétention
Trk B	Tropomyosin-receptor-kinase B

-V-

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
5-FU	5-Fluoro-Uracile

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des Figures

INTRODUCTION	
Figure I-1 : Les différentes couches de la paroi du côlon.	24
Figure I-2 : Organisation des cellules au sein de la crypte intestinale.....	25
Figure I-3 : Dualité de fonction de la protéine p53 dans la prévention et la suppression de tumeurs.	28
Figure I-4 : Modèle génétique du CCR.....	30
Figure I-5 : Illustration schématique des différents stades tumoraux.....	33
Figure I-6 : EGFR et molécules thérapeutiques dans le cadre du CCR.....	35
Figure I-7 : Mécanismes d'action des agents dirigés contre le VEGF.....	36
Figure I-8 : La division et l'auto-renouvellement des cellules souches (CS).....	38
Figure I-9 : Schématisation de la voie de signalisation Wnt.....	39
Figure I-10 : Représentation schématique des caractéristiques des CIC au sein du CCR.	43
Figure I-11 : Effets des thérapies conventionnelles et de thérapies ciblant directement les CIC.....	50
Figure I-12 : Schéma général d'un appareillage de FFF.	52
Figure I-13 : Schéma classique d'un canal de FFF.....	52
Figure I-14 : Principe général de séparation par FFF.	55
Figure I-15 : Mécanisme général du mode d'élution normal ou brownien.....	57
Figure I-16 : Mécanisme général du mode Inertiel.	58
Figure I-17 : Mécanisme général du mode Stérique.	60
Figure I-18 : Schémas comparés des appareillages de GFFF et de SdFFF.....	63
Figure I-19 : Schéma général d'un appareil de SdFFF.....	64
Figure I-20 : Disposition de la feuille de Mylar® entre les parois du canal.....	65
Figure I-21 : Disposition de la feuille de Mylar® entre les parois du canal.....	65

Figure I-22 : Dispositif de serrage du canal et du contre canal dans le bol de centrifugation.....	66
Figure I-23 : Effet du serrage sur la forme des pics du volume mort.....	67
Figure I-24 : Effet du contre canal sur la répartition des forces de serrage.....	67
Figure I-25 : Plan du séparateur de phase-2.....	68
Figure I-26 : Schéma des joints tournants de phase-2 et 3	70
Figure I-27 : Applications et classifications des méthodes de tri cellulaire.....	72
Figure I-28 : Conséquence de l'injection des échantillons par la paroi d'accumulation : effet local d'élutriation avec champ et flux opposés.....	75
Figure I-29 : Image de l'élution cellulaire dans le volume mort / pic cellulaire. ..	76
Figure I-30 : Courbe de sélectivité en taille des cellules HEL.....	79
Figure I-31 : Description schématique des étapes de tri cellulaire par SdFFF. ...	83
Figure I-32 : Stratégies d'utilisation de la SdFFF en oncologie.	87
Figure R-1 : Photographies de tumeurs obtenues après greffe des fractions de WiDr obtenues par SdFFF sur souris SCID.....	117
Figure R-2 : Coloration HES d'une tumeur obtenue après greffe en sous-cutanée de la F3 de WiDr obtenue par SdFFF sur souris SCID.....	118
Figure R-3 : Illustrations des colorations HES des organes prélevés chez les souris SCID.....	119
Figure R-4 : Photographies de tumeurs obtenues après greffe des HCT116 triées par SdFFF en position sous-cutanée sur la souris SCID.	120
Figure R-5 : Photographies de tumeurs obtenues après greffe des WiDr non triées en position intra-caecale chez la souris SCID.....	122
Figure R-6 : Photographies de tumeurs obtenues après greffe des WiDr et HCT116 non triées reprises dans du Matrigel en position intra-caecale sur la souris SCID.....	123
Figure R-7 : Coloration HES des organes et nodules prélevés chez la souris greffée en intra-caecale avec la lignée HCT116 reprise dans du Matrigel.....	124
Figure R-8 : Schéma général du système « splitt » de concentration sur un canal de SdFFF.....	150

Figure R-9 : Schéma global du joint doubles voies pour système « splitt » et détail des connexions sur les semelles doubles-voies.....	151
Figure R-10 : Représentation de la structure tubulaire des SWCNT et MWCNT.	169
Figure R-11 : Effet des SWCNT sur les cellules Colo205 par test de métabolisme cellulaire.	170
Figure R-12 : Fractogrammes des Colo205 traitées 24 et 48h avec différentes concentration de SWCNT (0,1 ; 0,5 et 1µg/mL).	171

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des CCR.....	32
Tableau 2 : Survie relative à 5 ans par stade de CCR.	33
Tableau 3 : Marqueurs proposés pour caractériser les CSI saines et CIC.....	44
Tableau 4 : Principaux champs mis en œuvre en FFF.....	54

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer colorectal (CCR) est le cancer le plus fréquent en Europe et la deuxième cause de décès par cancer dans le monde. Malgré de réels progrès thérapeutiques, le taux de survie relative à 5 ans reste faible du fait de l'absence de dépistage précoce, la plupart des diagnostics étant réalisés à un stade avancé. Il est caractérisé par sa résistance aux traitements et sa capacité à récidiver suggérant la présence de cellules initiant le cancer (CIC) au sein de la tumeur. Ces cellules sont considérées comme cible majeure pour éradiquer la tumeur et la compréhension de leur comportement est devenue une priorité majeure pour l'adaptation des thérapies. En effet, l'implication des CIC dans l'émergence et la récurrence tumorales ne fait actuellement plus aucun doute. Bien que ces cellules suscitent un intérêt grandissant dans la communauté scientifique, des travaux visant à améliorer leur caractérisation, à comprendre leur fonctionnement et à développer des thérapies ciblées peinent à émerger. Leur proportion au sein de la masse tumorale reste faible et le développement de stratégies d'isolement des CIC est devenu une priorité. Dans ce sens, nous avons développé de nouveaux outils d'isolement et de caractérisation des CIC au sein de lignées humaines de CCR.

L'une des méthodes d'isolement est basée sur la technique de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation ou SdFFF (Sedimentation Field Flow Fractionation), technique innovante de tri cellulaire basée sur les propriétés biophysiques intrinsèques (taille, densité...) des cellules, permettant de s'affranchir des immuno-marquages. Les sous-populations isolées ont été identifiées *in vitro* par l'utilisation d'un panel de marqueurs (CD44, EpCAM, CD166...) corrélée à une caractérisation fonctionnelle *in-vitro*, puis *in-vivo* sur deux modèles différents. Dans un premier temps, le potentiel tumorigénique a été évalué *ex ovo* sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet (CAM). Cependant, ce modèle reste éloigné de l'environnement physiopathologique du CCR, nous conduisant à développer différents modèles *in vivo* chez la souris immunodéprimée. Le premier correspond à des greffes hétérotopiques en position sous-cutanée pour un suivi aisé du développement tumoral. Quant au second support, il est basé sur des greffes orthotopiques dans la paroi du caecum mimant le micro-environnement colique.

De façon parallèle à la mise en place des diverses méthodes et modèles d'études, nous avons optimisé l'outil technique afin de mieux l'adapter au tri de populations rares. En effet, la séparation et l'isolement d'espèces par la SdFFF s'associe à une dilution préjudiciable des

populations éluées. Afin d'en limiter la portée, nous avons réalisé l'implantation d'une lame séparatrice en fin de canal, divisant en deux parties le flux sortant, permettant l'élimination de la phase mobile excédentaire.

Un second outil d'enrichissement en CIC a été utilisé, il s'agit du milieu défini OncoMiD. Développé par la société Oncomedics, c'est un milieu dépourvu de SVF et spécifiquement utilisé dans le cadre de cultures primaires de CCR.

Enfin, nous avons mené une étude sur l'effet de nanoparticules sur les cellules cancéreuses en collaboration avec le laboratoire LCABIE CNRS UMR5254 de l'Université de Pau. Nous nous sommes intéressés aux effets biologiques de nanotubes de carbone, potentiels vecteur de traitements. En effet, lorsqu'ils sont fonctionnalisés, ces NTC auraient la possibilité de délivrer des traitements directement aux tissus, voire aux cellules cibles. L'hypothèse de travail s'est basée sur le très faible diamètre de ces nanotubes qui pourraient alors pénétrer dans les cellules. Le manque de connaissances concernant ces NTC et leur comportement reste important.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

A. Le cancer colorectal

I. Epidémiologie

Chaque année, plus de 1,23 millions de personnes dans le monde développent un cancer colorectal (CCR) et environ 609 000 personnes en meurent. Tous sexes confondus, c'est la 2^{ème} cause de décès par cancer dans le monde.

En Europe, l'incidence globale en 2008 a été de 432 000 soit 29,6 sur 100 000 habitants et 212 000 patients en sont décédés (selon le Centre International de Recherche sur le Cancer, 2010) [1]. Il s'agit du cancer le plus fréquent en Europe, suivi du cancer du sein, des poumons et de la prostate [2]. Son incidence est plus élevée dans les pays industrialisés. Chez l'homme, avec 27 500 nouveaux cas par an, il reste la 3^{ème} localisation derrière le cancer de la prostate (71 000 nouveaux cas) et le cancer du poumon (27 500 nouveaux cas). Chez la femme, le CCR arrive en 2^{ème} position (19 000 nouveaux cas) derrière le cancer du sein (53 000 nouveaux cas) (d'après l'Institut National du Cancer, Janvier 2011).

En France, en 2011, le CCR arrivait en 3^{ème} position en termes de fréquence avec 40 500 cas (d'après l'Institut National du Cancer, Janvier 2012). Les nouveaux cas surviennent en majorité chez des personnes de plus de 50 ans. L'âge moyen au moment du diagnostic est élevé, 70 ans chez l'homme et 73 ans chez la femme.

Le Limousin se place dans les régions à forte incidence (41,6/100 000 hommes et 25,9/100 000 femmes). Sur la période 2004-2008, 16 526 décès dans le Limousin lui ont été imputables. L'âge médian au moment du décès est respectivement de 75 ans chez l'homme et 80 ans chez la femme.

Malgré de réels progrès thérapeutiques, le taux de survie relative à 5 ans du CCR reste faible du fait de l'absence de dépistage précoce, la plupart des diagnostics étant réalisés à un stade avancé (d'après l'Institut National du Cancer 2010). Ainsi, lorsqu'il est dépisté précocement, les chances de survie peuvent dépasser 80% mais dépisté à un stade tardif, le taux de survie relative à 5 ans est inférieur à 5%.

Le CCR correspond à des maladies complexes et hétérogènes provenant de mutations somatiques ou des lignées germinales [3]. Environ 90 % des CCR sont sporadiques, seuls 5 à 10% sont héréditaires. Les deux formes les plus connues sont la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le CCR héréditaire sans polypose (ou syndrome de Lynch ou HNPCC pour Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer). La PAF est une maladie autosomique dominante à pénétrance variable pouvant survenir *de novo* dans 20 à 30 % des cas, mais qui

ne représente que 1 % des CCR [4]. Dans plus de 90 % des cas, elle est liée à une mutation constitutionnelle du gène APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) localisé dans le bras long du chromosome 5 (5q21-22) [5]. Cette mutation favorise la formation de polypes au niveau de la muqueuse du côlon et du rectum entraînant le développement inévitable d'un carcinome colorectal. Selon le degré de pénétrance de la maladie, l'âge médian de survenue du cancer varie de 34 ans (PAF profuse) à 55 ans (PAF atténuée) [6]. Quant au HNPCC, il est dû à une anomalie des gènes responsables du contrôle de la réparation des mésappariements des bases de l'ADN : les gènes ADN MMR (Mismatch Repair) [7].

II. Anatomie et cancérogenèse colorectales

Le CCR se développe aux dépens de la muqueuse colique ou rectale. Le rectum sous-péritonéal, dépourvu de péritoine viscéral (ou séreuse), sera volontairement écarté de la description. En effet, sa vascularisation et son drainage lymphatique particulier lui offrent des possibilités de diffusion différentes de celles du côlon.

II.1. L'anatomie générale du côlon

Le côlon s'étend de la valvule iléo-caecale de Bauhin à la jonction recto-sigmoïdienne. Il se divise en plusieurs segments :

- le côlon ascendant,
- le côlon transverse,
- le côlon descendant,
- le côlon sigmoïde.

La paroi colique est formée de quatre couches différentes (Figure I-1) qui se superposent (de l'intérieur vers l'extérieur) :

- La muqueuse, composée d'un épithélium de revêtement (constitué par des cellules caliciformes ou cellules sécrétrices de mucus, des entérocytes ou colonocytes et des cellules entéro-endocrines) s'invaginant en cryptes, d'un chorion ou *lamina propria* (rôle de soutien) riche en tissu lymphoïde diffus et de fibres musculaires formant la musculaire muqueuse.
- La sous-muqueuse, constituée par un tissu conjonctif richement irrigué et contenant le plexus nerveux autonome de Meissner.

- La musculuse, avec une disposition en deux couches de fibres musculaires lisses : circulaire (interne) et longitudinale (externe). Entre ces couches, se situe le plexus nerveux d'Auerbach,
- La séreuse, tunique externe constituant le feuillet viscéral du péritoine, constituée de tissu adipeux.

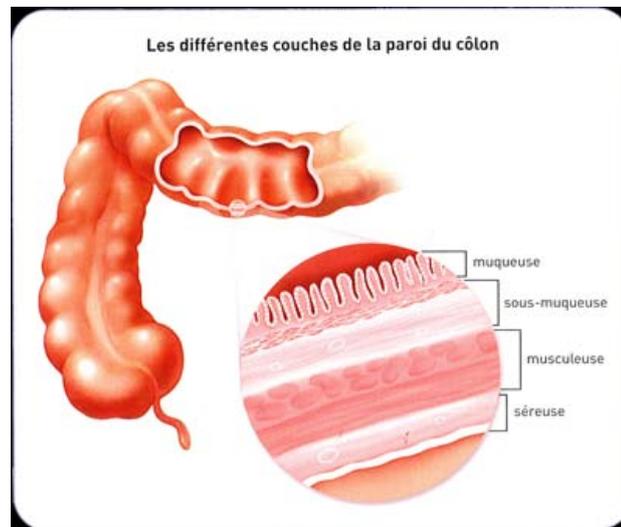


Figure I-1 : Les différentes couches de la paroi du côlon.

La paroi colique est composée par la superposition de quatre couches : muqueuse, sous-muqueuse, musculuse et séreuse. Schéma d'après l'Institut national du cancer.

II.2. Structure normale de la crypte intestinale

De par la rapidité de renouvellement de son épithélium, le côlon est considéré comme un organe tout à fait remarquable. Il est en contact avec un milieu septique, acide et agressif qui impose un renouvellement rapide du revêtement muqueux, siège des échanges entre la lumière colique et la vascularisation portale. Cet épithélium est en effet renouvelé tous les 5 jours.

La couche épithéliale du côlon est formée par une simple couche de cellules cylindriques hautes, formant des invaginations supportées par la lamina propria pour former une unité fonctionnelle : la crypte de Lieberkühn, chacune contenant 2000 à 3000 cellules. Il a été estimé que plus de 6×10^{14} colonocytes seraient produits au cours de la vie d'un individu [8].

Dès la naissance, se constitue le compartiment cryptique dans lequel résident les cellules prolifératives, les progéniteurs et les cellules souches. Les cellules différenciées localisées au sommet des cryptes sont éliminées dans la lumière du côlon. Ces cellules différenciées dérivent de cellules souches multipotentes retrouvées au fond des cryptes

intestinales (Figure I-2), en moyenne au nombre de 7 par crypte. Suite à une division asymétrique, une cellule souche donne naissance à une nouvelle cellule souche et à un progéniteur destiné à se différencier. Il est bien établi que les cellules souches intestinales donnent naissance aux trois types de cellules épithéliales différenciées : cellules caliciformes, les entérocytes et les cellules entéro-endocrines. L'homéostasie de l'épithélium intestinal est donc assurée grâce à un équilibre entre la production des cellules différenciées, leur migration le long de la villosité vers la lumière intestinale, et leur élimination par apoptose et/ou anoïkose [9,10,11].

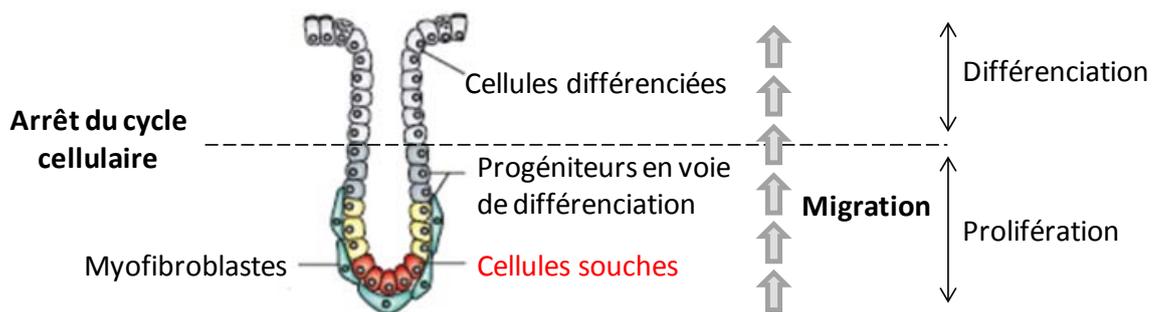


Figure I-2 : Organisation des cellules au sein de la crypte intestinale.

Les cellules souches entretiennent un compartiment prolifératif constitué par leurs descendants immédiats, les progéniteurs. Ces cellules donnent naissance aux trois types de cellules différenciées, les cellules caliciformes, les entérocytes et les cellules entéro-endocrines. Au fur et à mesure de leur différenciation, les cellules épithéliales issues des progéniteurs progressent le long de la villosité vers la lumière intestinale, où elles desquament par apoptose [12].

La muqueuse épithéliale est constituée de trois types de cellules différenciées :

- les entérocytes ou colonocytes (80 %) assurant l'absorption des nutriments et le transport des électrolytes,
- les cellules sécrétrices de mucus ou cellules caliciformes ou en gobelet (20 %) sécrétant le mucus tapissant l'épithélium et le protégeant des toxines et bactéries du tube digestif,
- les cellules entéro-endocrines (< 1 %) sécrétant les peptides gastro-intestinaux. Ces dernières ont pour particularité de dériver de la crête neurale.

Il est à noter que contrairement à l'intestin grêle, le côlon est dépourvu de cellules de Paneth.

II.3. La cancérogenèse colorectale, le processus multi-étapes

Les facteurs étiologiques et les mécanismes génétiques aboutissant au développement du CCR sont complexes et hétérogènes. Le style de vie, le mode d'alimentation et des mutations somatiques en font partie.

Le développement du CCR se réalise en plusieurs étapes mettant en jeu une accumulation de mutations sur des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes.

a. L'instabilité chromosomique ou CIN (Chromosome INstability)

Il s'agit de la classe la plus fréquente d'instabilité génomique observée dans le CCR (85 %). Elle est caractérisée par des réarrangements chromosomiques, des anomalies numériques [13,14] et par la survenue fréquente de pertes alléliques de gènes suppresseurs de tumeurs (*p53*, *MYH* et *APC*) [15]. La conséquence de l'instabilité chromosomique est un déséquilibre du nombre de chromosomes et une fréquence importante d'une perte d'hétérozygotie (LOH, Loss Of Heterozygosity) [16].

b. L'instabilité microsatellitaire ou MSI (MicroSatellite Instability)

Elle est causée par un défaut du système de réparation des mésappariements de l'ADN, le MMR (MisMatch Repair) [17]. Elle conduit à l'accumulation de mutations dans des gènes contrôlant l'apoptose et le cycle cellulaire (*TGFβRII*, *BAX* ou *Caspase5*).

c. Les Proto-oncogènes

Ce sont des gènes codant pour des protéines participant à la régulation de la prolifération cellulaire. Une fois mutés par gain de fonction, ils entraînent une prolifération exagérée et incontrôlée des cellules. La mutation d'un seul des deux allèles du gène est suffisante pour activer un oncogène. Les mutations somatiques sur ces gènes codant certains partenaires des voies de signalisation sont fréquentes, surtout pour le gène codant la sous-unité catalytique de la PI3K (phosphatidyl-inositol 3 kinase) (muté dans 32 % des cas) et les gènes codant la protéine BRAF et la protéine KRAS, mutés respectivement dans 15 et 40 % des CCR [18]. Les mutations du gène *KRAS* ont été fortement associées avec la résistance au traitement par l'anticorps monoclonal anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). De plus, *BRAF*, membre de la famille de gènes *RAF* (*BRAF*, *ARAF1*, *RAF1*), code pour une sérine-thréonine kinase activée en aval de la protéine KRAS [19]. Environ 15 % des CCR

portent des mutations de *BRAF* [20] qui sont associées à un mauvais pronostic et une résistance aux traitements.

d. Les gènes suppresseurs de tumeur

Contrairement aux oncogènes, ils ont une action négative sur la prolifération cellulaire. Dans le processeur de carcinogénèse, les gènes suppresseurs de tumeurs perdent leurs fonctions. Parmi ceux-ci :

- Le gène *APC* joue un rôle clé dans la voie de signalisation Wnt en favorisant la dégradation de la β -caténine [5,21]. Cette voie joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires incluant l'adhésion, la migration, l'organisation du cytosquelette et la ségrégation chromosomique. L'activation de la voie Wnt est désormais considérée comme un événement précoce dans la cancérogenèse colorectale. La mutation de ce gène est retrouvée dans 80 % des CCR sporadiques.

- Le gène *TP53* ou gardien du génome humain, est un facteur de transcription activé en réponse aux stress cellulaires tels que l'activation d'oncogènes, la présence de dommages de l'ADN, le raccourcissement des télomères ou encore d'hypoxie [22]. La voie p53 agit comme un point de contrôle crucial dans le maintien de la stabilité du génome et de l'homéostasie cellulaire. La plupart des réponses induites par p53 interviennent directement ou indirectement dans la suppression de la tumeur (Figure I-3). Approximativement 85 % des mutations du gène *P53* dans le CCR sont des faux-sens.

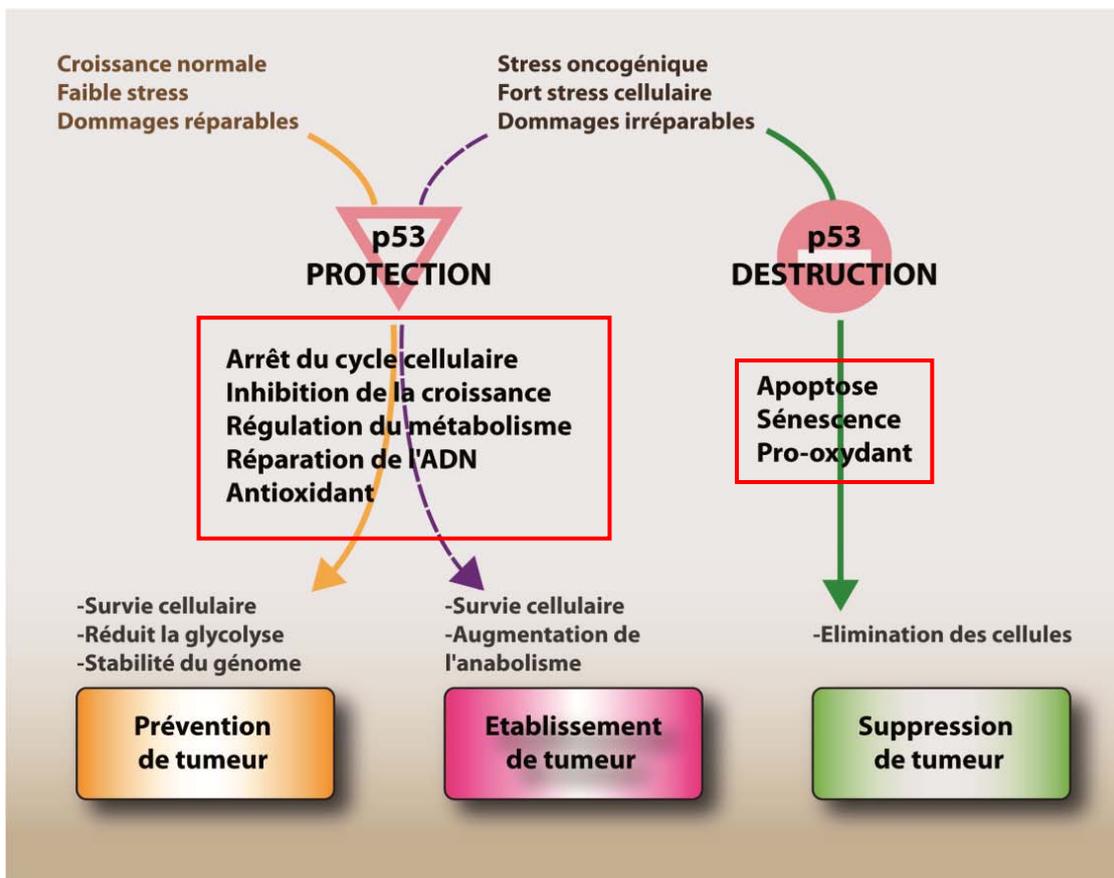


Figure I-3 : Dualité de fonction de la protéine p53 dans la prévention et la suppression de tumeurs.

P53 peut répondre à une variété d'agressions cellulaires en induisant premièrement des mécanismes de survie (arrêt du cycle, stabilité du génome), permettant de rétablir l'homéostasie cellulaire et de prévenir l'apparition de tumeur. Dans le cas de stress prolongés, de signaux oncogéniques ou de dommages irréparables, p53 active des mécanismes létaux (apoptose) et participe à la suppression de tumeur. Des mutations affectant p53 peuvent inactiver sa fonction suppresseur de tumeurs, comme lui apporter des gains de fonctions pour l'établissement de tumeurs. Schéma adapté d'après Vousden et Prives [23].

- Le gène codant pour la protéine TGF- β est inactivé dans un tiers des CCR. Il code pour des cytokines jouant un rôle central dans l'homéostasie cellulaire, la fibrose, l'angiogénèse, la carcinogénèse et la différenciation cellulaire [24]. Il a été démontré que le TGF- β agit à la fois comme suppresseur de tumeur et activateur de la progression tumorale, de l'invasion et du processus métastatique [25]. En effet, au cours des stades précoces de la cancérogénèse, il s'active pour limiter la croissance des cellules cancéreuses. Au contraire, lorsque la tumeur progresse, des changements génétiques et / ou biochimiques de la protéine permettent la stimulation de la progression tumorale.

- Le gène *PTEN* (Phosphatase and TENSin homolog deleted on chromosome 10) est un inhibiteur d'une des principales voies initiatrices du CCR, la voie phosphatidylinositol triphosphate kinase (PI3K/Akt). Son activité peut être perdue au travers de divers mécanismes tels qu'une perte allélique ou encore une hyperméthylation du promoteur [26]. Dans le cancer du sein surexprimant la protéine ERBB2, l'effet de l'anticorps monoclonal trastuzumab (Herceptin®) transite via la présence de PTEN. Sa perte est ainsi corrélée à un échec de traitement [27]. Cependant, l'impact de la perte de PTEN dans le CCR reste encore peu connu. Il est cependant connu que la perte de son expression est corrélée avec la transition épithélio-mésenchymateuse et donc une augmentation des capacités d'invasion des cellules de CCR [28].

Ainsi, le modèle multi-étapes ou séquence adéno-carcinomateuse a permis l'identification de proto-oncogènes, de gènes suppresseurs de tumeurs et de mécanismes génétiques et épigénétiques associés (Figure I-4). Toutefois, il ne permet pas d'expliquer par quel mécanisme une cellule normale différenciée peut acquérir au cours de sa vie des mutations amenant à sa transformation en cellule maligne. La théorie des cellules initiatrices de cancer, qui sera abordée dans une deuxième partie, permet de répondre en partie à cette question.

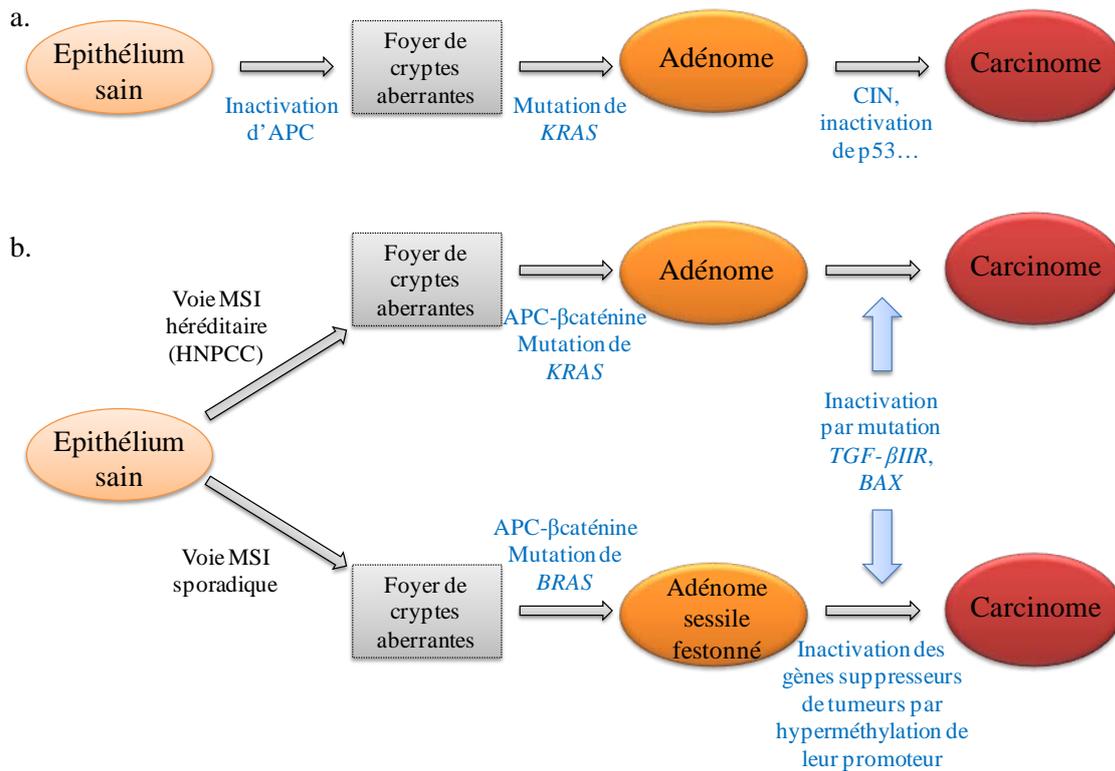


Figure I-4 : Modèle génétique du CCR.

a) La plupart des CCR se développent à partir de polypes adénomateux après quelques années ou décennies. Les mutations de gènes (APC, KRAS, etc ...) sont fortement associées à un stade précis de cancérogénèse. b) Dans environ 15 % des CCR, la fonction MMR est inactivée par des mutations somatiques ou par des inactivations épigénétiques conduisant à une instabilité microsatellitaire. L'inactivation des gènes MMR par mutation somatique est généralement observée chez les patients portant ces mutations dans la lignée germinale en particulier dans le cadre du syndrome HNPCC. L'inactivation épigénétique des gènes MMR concerne surtout l'hyperméthylation du promoteur MLH1. Les tumeurs se présentent initialement sous forme d'adénome sessile festonné avec une hyperméthylation de nombreux gènes et des mutations de BRAF. Aussi bien dans les tumeurs sporadiques et familiales, l'inactivation de gènes (TGF-βIIIR, BAX) codant pour des séquences contenant des éléments répétés (microsatellites) contribuerait à la progression tumorale. Schéma adapté de Fearon et al [22].

III. La classification des cancers colorectaux et les bases thérapeutiques

III.1. Classification des CCR

Les CCR sont classés selon l'importance de leur diffusion locale, régionale ou à distance au moment du diagnostic. De la diffusion initiale de la maladie dépendent le pronostic du patient et sa prise en charge thérapeutique. Cette classification est basée sur des données histologiques et d'imageries, afin de faciliter la prise en charge des patients. La première classification a été proposée par Dukes en 1932. Inadaptée pour les stades de gravité incertaine, cette classification a été modifiée à plusieurs reprises entre autre par Astler-Coller. Bien que largement utilisées jusque dans les années 1990, ces deux classifications ont été abandonnées, étant sources de confusion. Une classification dite pTNM (pathology Tumor Node Metastasis), basée sur le degré de l'envahissement pariétal (T), l'importance de l'envahissement ganglionnaire loco-régional (N) et la diffusion à distance par la présence de métastases (M), a été adoptée. Depuis Janvier 2010, il est recommandé d'utiliser la classification pTNM 7^{ème} édition de l'UICC/AJCC. Dans le tableau 1, sont résumés les différents stades de cette classification après révision en 2011 [29].

Tumeur primitive (T)	
TX	La tumeur primitive ne peut pas être évaluée
T0	Absence d'évidence de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : tumeur intra-épithéliale ou envahissant la lamina propria sans extension à la sous-muqueuse
T1	Tumeur envahissant la sous muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculature
T3	Tumeur envahissant la séreuse sans atteinte du revêtement mésothélial et le tissu péricolique non péritonéalisé
T4a	Tumeur perforant le péritoine viscéral
T4b	Tumeur envahissant ou adhérent à d'autres organes ou structures
Ganglions régionaux (N)	
NX	Les ganglions ne peuvent pas être évalués
N0	Absence de métastases ganglionnaires régionales
N1a	Métastases dans 1 des ganglions lymphatiques régionaux
N1b	Métastases dans 2-3 des ganglions lymphatiques régionaux
N1c	La tumeur s'étend à la séreuse, au mésentère, au tissu péricolique non péritonéalisé ou aux tissus péri-rectaux sans métastases ganglionnaires régionales
N2a	Métastases dans 4 à 6 des ganglions lymphatiques régionaux
N2b	Métastases dans 7 ou plus des ganglions lymphatiques régionaux
Métastases à distance (M)	
M0	Absence de métastase à distance
M1	Métastases à distance
M1a	Métastases confinées à un organe ou structure
M1b	Métastases dans plusieurs organes ou structures

Tableau 1 : Classification des CCR.

conformément à la révision de la classification pTNM révisée en 2011 [29].

A partir de cette classification, cinq stades de CCR ont été définis (Figure I-5) avec différentes sous-classes :

- Le stade I : pT1 N0 M0 et pT2 N0 M0
- Le stade II : pT3 N0 M0 et pT4a N0 M0
- Le stade III : quel que soit le type de tumeur, N1 M0, N2 M0 et N3 M0
- Le stade IV : quel que soit le type de T et N, M1.

Les chances de guérison varient considérablement entre le stade I et le stade IV (Tableau 2). Le CCR fait partie des cancers à pronostic intermédiaire dont la survie relative à 5 ans est moyenne. La stratégie thérapeutique est également adaptée à chacun de ces stades.

Stade	Survie relative à 5 ans (%)
Stade I	87
Stade II	82
Stade III	66
Stade IV	19
Tous	60

Tableau 2 : Survie relative à 5 ans par stade de CCR.

Etude PETRI sur une cohorte de 1994-1999 selon Institut National du Cancer (2010).

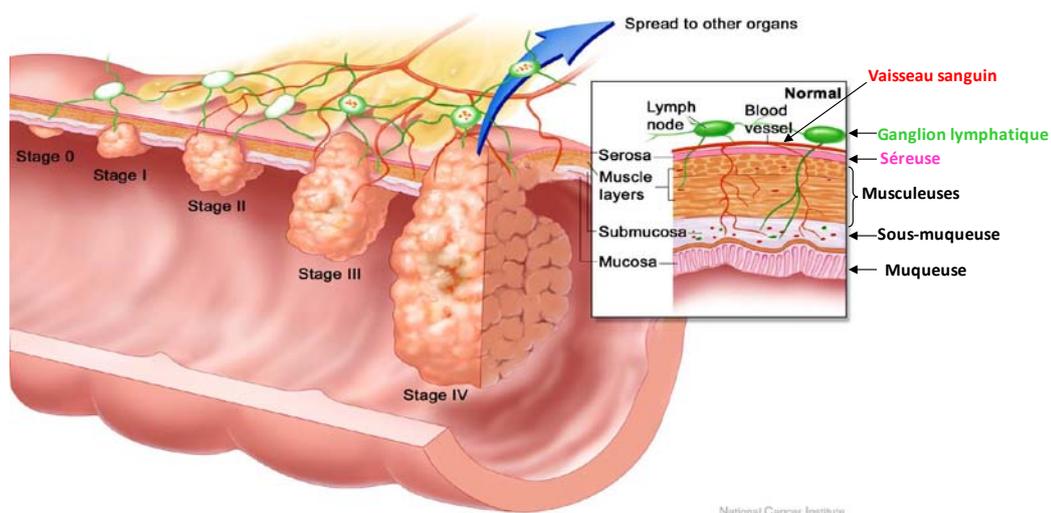


Figure I-5 : Illustration schématique des différents stades tumoraux.

La classification pTNM (pathology Tumor Node Metastasis) permet de distinguer 5 stades tumoraux (0, I, II, III et IV). Au stade 0, seule la muqueuse est atteinte. Au stade I, la tumeur atteint localement la muqueuse, la sous-muqueuse et la musculature. Les cellules cancéreuses peuvent alors envahir la séreuse et perforer le péritoine viscéral, correspondant au stade II. Au stade III, les cellules cancéreuses atteignent les ganglions lymphatiques péri-viscéraux régionaux et peuvent emprunter la circulation sanguine. Le stade IV est le stade terminal : la tumeur est vascularisée et une désorganisation totale de la paroi colique est observée. Les organes éloignés, principalement le foie et les poumons, peuvent être atteints par les métastases. Schéma adapté d'après l'Institut National du Cancer.

III.2. Bases thérapeutiques de la prise en charge des CCR

Le seul traitement curatif actuel est l'exérèse chirurgicale de type R0 (Résidu 0), emportant la tumeur primitive, ses relais ganglionnaires et d'éventuelles métastases, ne laissant aucun reliquat macro ou microscopique, selon les critères qualité de la chirurgie carcinologique définie par l'Institut National du Cancer. Malgré de réels progrès dans la prise en charge thérapeutique, le diagnostic reste encore trop tardif. Dans plus de la moitié des cas, le CCR est dépisté à un stade métastatique. L'âge, et les co-morbidités souvent associées, ne permettent pas une prise en charge optimale, combinant chirurgie et traitement systémique à base de chimiothérapie. Administrée avant la chirurgie, la chimiothérapie néo-adjuvante a pour but de diminuer la masse tumorale et de contrôler la progression de la maladie. Dans le meilleur des cas, la masse tumorale diminue et le patient est alors déclaré « répondeur ». Dans 10 % des cas des patients métastatiques, initialement déclarés « non résécables », ils peuvent ainsi bénéficier d'une chirurgie optimale de type R0, les métastases ayant parfois complètement disparu au terme de plusieurs mois de chimiothérapies. Chez les patients à haut risque de récurrence, et si l'état général le permet, une chimiothérapie dite adjuvante est proposée en postopératoire, diminuant ainsi le taux de récurrence. Plusieurs schémas thérapeutiques sont actuellement proposés. Ils sont choisis en fonction du stade initial de la maladie et des co-morbidités.

La première molécule utilisée a été le 5-fluoro-uracile (5-FU) [30] un analogue de la pyrimidine jouant le rôle antimétabolique, qui a donné lieu au protocole thérapeutique préopératoire de référence [31]. L'oxaliplatine (qui agit par inhibition de la synthèse et de la réplication de l'ADN via la formation de ponts intrabins entre 2 guanines adjacentes possédant une action alkylante) et l'irinotecan (qui est une prodrogue dont le métabolite inhibe la topoisomérase I) ont un effet anti-tumoral synergique au 5-FU. Au stade métastatique, ils sont associés avec le 5-FU selon les protocoles FOLFOX et FOLFIRI [32,33] augmentant ainsi la médiane de survie des patients.

Au cours de ces dernières années, de nouvelles cibles thérapeutiques ont été identifiées permettant la mise en place des « thérapies ciblées » agissant sur les mécanismes concourant à l'oncogenèse, basées principalement sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Les deux principales cibles de ces thérapies sont l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) et le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

L'EGFR, également appelé Erb-B1 ou HER, est actuellement une cible clé dans le CCR et est très souvent surexprimé. Son activation est corrélée à des phénomènes associés à

la progression tumorale, incluant la prolifération, la maturation, l'angiogenèse, la formation de métastases ainsi que l'inhibition de l'apoptose [34] corrélés à des facteurs pronostics péjoratifs [35]. Le cetuximab est un anti-EGFR, un anticorps monoclonal jouant le rôle d'inhibiteur compétitif, empêchant la fixation du ligand sur le récepteur et donc son activation [36,37]. Il apporte un bénéfice en survie en situation métastatique après échec des chimiothérapies usuelles [38,39] et a récemment apporté la preuve de son intérêt en première ligne, en association avec le 5-FU et l'oxaliplatine [40]. Toutefois, il ne peut être administré que si le statut de *KRAS* est non muté, et l'importance de ses effets secondaires limite actuellement son emploi. D'autres anticorps monoclonaux sont utilisés tels que le panitumumab [41,42]. Ce dernier induit l'internalisation du récepteur [43]. En parallèle, des anticorps monoclonaux, des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur sont utilisés tel que l'erlotinib inhibant ainsi la phosphorylation de l'EGFR sans induire son internalisation et sa dégradation [44,45]. Les modes d'action de ces molécules sont schématisés dans la Figure I-6.

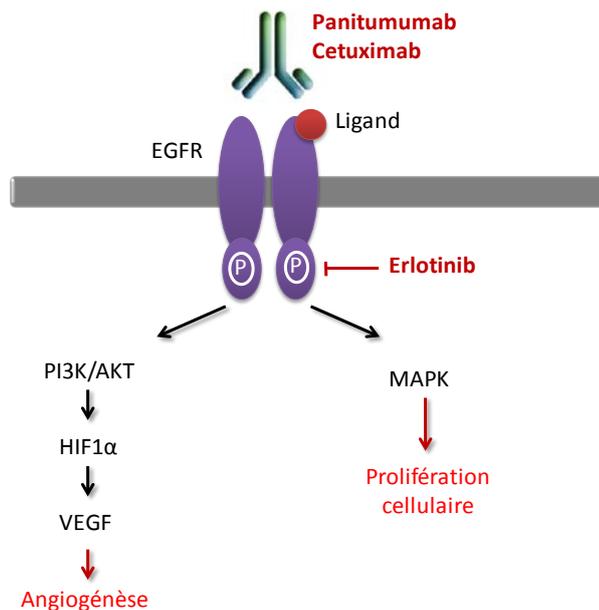


Figure I-6 : EGFR et molécules thérapeutiques dans le cadre du CCR.

Le panitumumab et le cetuximab sont des anticorps monoclonaux compétitifs empêchant l'activation de l'EGFR et des voies de signalisation impliquées dans les processus tumoraux tels que l'angiogénèse et la prolifération cellulaire. Ils provoquent tous deux l'internalisation du récepteur. L'erlotinib est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR. Schéma adapté de Krejsa et al. 2006 ; Okines and Chau, 2011 [41,42].

La néo-angiogenèse est également requise pour la croissance tumorale et dépend de la production de VEGF par les cellules tumorales ou par les cellules de l'environnement tumoral, notamment les cellules stromales [46]. Dans la tumeur, la production du VEGF est, en outre, stimulée par l'hypoxie [47]. Après liaison au VEGF, le récepteur au VEGF (VEGFR) s'auto-phosphoryle puis active les voies de signalisation conduisant à l'angiogenèse accompagnée d'une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi qu'une multiplication des cellules endothéliales [36,48]. Le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF, est utilisé en combinaison de la chimiothérapie [49]. Il bloque la néo-angiogenèse et par conséquent inhibe la croissance tumorale. Des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du VEGFR sont également utilisés dont le sorafenib et le sunitinib [50,51]. Les mécanismes d'action de ces molécules sont récapitulés dans la Figure I-7.

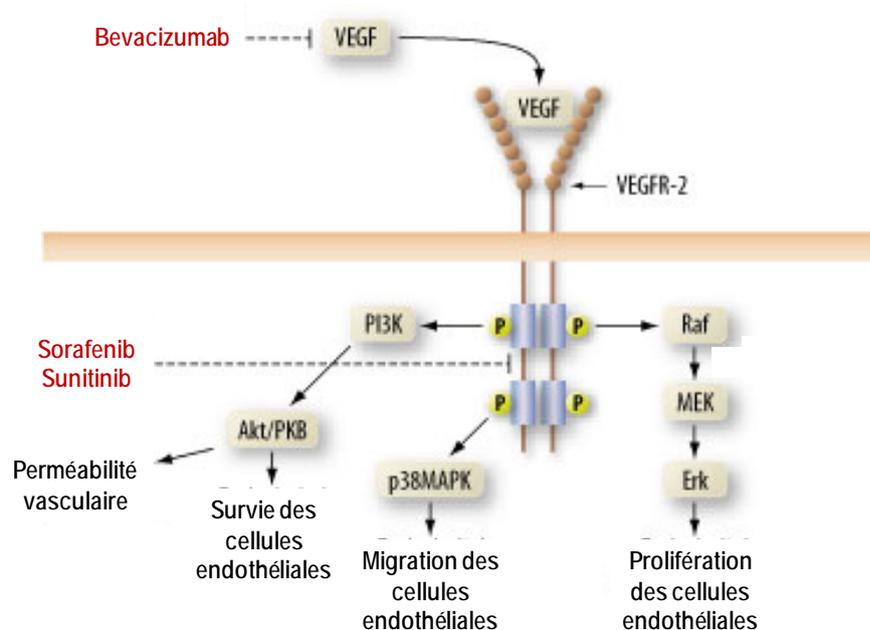


Figure I-7 : Mécanismes d'action des agents dirigés contre le VEGF.

Le bevacizumab empêche la fixation du ligand sur le VEGFR. Le sorafenib et le sunitinib inhibent la phosphorylation du VEGFR. Schéma adapté de Rodriguez et al, 2007 [51].

Ainsi, l'existence et la mise en œuvre de ces nouvelles thérapies combinées aux traitements préexistants ont permis une amélioration considérable de la prise en charge des patients. Cependant, de nombreux mécanismes de résistance aux traitements ont été mis en évidence. Cette résistance pourrait avoir lieu via l'émergence de clones cellulaires ne répondant pas aux thérapies, soit par résistance innée ou soit par résistance acquise au cours du traitement.

B. Les cellules initiatrices de cancer dans le côlon

I. Les cellules souches intestinales saines

I.1. Caractéristiques fonctionnelles des cellules souches

Les cellules souches intestinales (CSI) localisées au fond des cryptes intestinales sont responsables du renouvellement de l'épithélium colique. Au cours de la division asymétrique, la CS engendre une nouvelle CS fille (par auto-renouvellement) et simultanément génère une population de cellules en cours de différenciation qui transiteront vers le sommet de la crypte intestinale, proliféreront et se différencieront en cellules fonctionnelles [10]. Ces CSI possèdent une durée de vie longue et sont ainsi responsables du renouvellement cellulaire tout au long de la vie de l'individu. Elles sont ainsi définies par deux caractéristiques fonctionnelles : la capacité d'auto-renouvellement ainsi que la multipotentialité, correspondant à la capacité de générer l'ensemble des cellules constituant le tissu d'où elles proviennent [52]. Dans le développement normal, la question d'auto-renouvellement est centrale. Afin d'entretenir un pool et de conserver une aptitude à produire des nouvelles cellules, une CS doit garder la capacité de s'auto-renouveler par division symétrique ou asymétrique et donner naissance au moins à une cellule fille qui possède les mêmes capacités qu'elle. Si la CS prolifère mais ne s'auto-renouvelle pas, le pool de CS sera appauvri (Figure I-8).

Dans le cadre de l'épithélium colique, l'existence de deux pools de CSI a été suggérée : un pool de CSI quiescentes servant de réserve [53] et au contraire, un pool de CSI activées, « cyclantes » (c'est-à-dire actives au niveau du cycle cellulaire) prêtes à recevoir et répondre à des signaux de régulation provenant des cellules stromales [54].

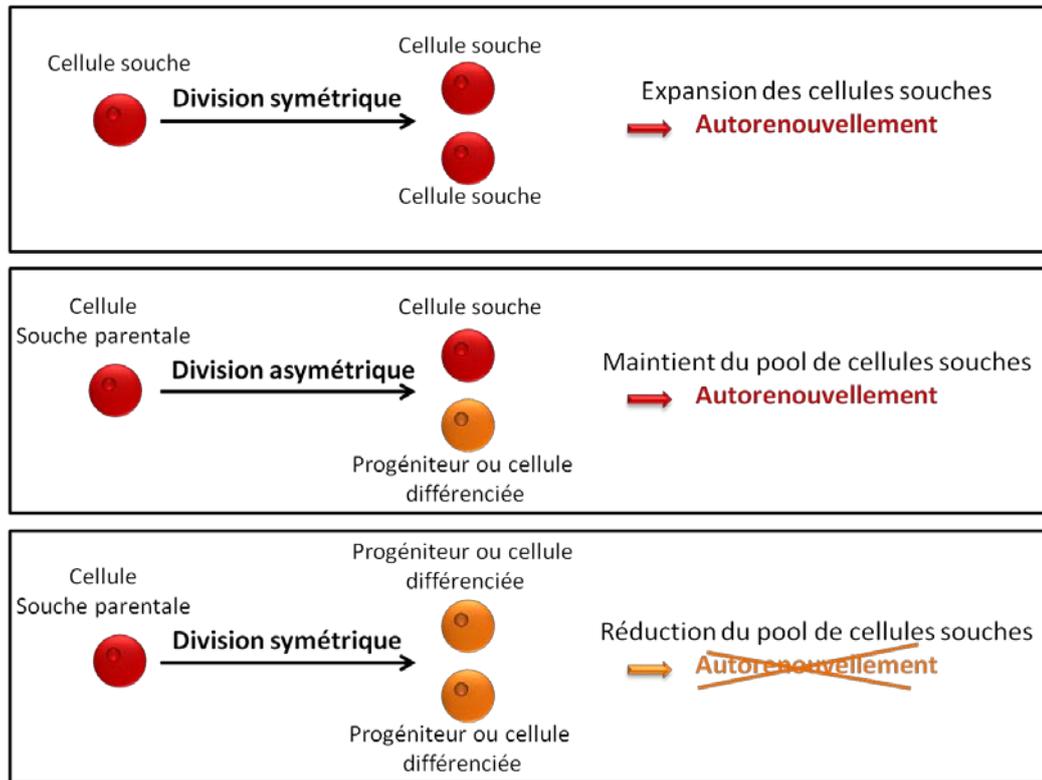


Figure I-8 : La division et l'auto-renouvellement des cellules souches (CS).

Afin de s'auto-renouveler, une CS doit donner au moins une CS fille par division symétrique ou asymétrique. Ces deux possibilités permettent de maintenir un pool de CS. La division symétrique d'une CS en deux cellules filles progéniteurs ou cellules différenciées ne permet pas de maintenir l'auto-renouvellement et donc entraîne la diminution du pool de CS.

I.2. La régulation des cellules souches intestinales

a. La voie Wnt

L'homéostasie des CS comprenant leur capacité d'auto-renouvellement dépend de relations complexes entre différents mécanismes dont la prolifération, la différenciation, la migration ainsi que la mort cellulaire. Tous ces phénomènes sont finement régulés par des voies de signalisation très conservées parmi laquelle la voie Wnt joue un rôle majeur. L'acteur central de cette voie est la protéine β -caténine. En l'absence du ligand de Wnt, β -caténine libre dans le cytoplasme est dégradée par l'intermédiaire du recrutement du complexe contenant la protéine de repliement axine, le produit du gène suppresseur de tumeurs *APC*, la CK1 (Caséine Kinase I) et la GSK β (Glycogen Synthase Kinase 3 β). Après phosphorylation de résidus sérine et thréonine hautement conservés sur la partie N-terminale, la β -caténine est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. En présence du ligand de Wnt, une interaction avec un récepteur de la famille Frizzled (Fz) et un membre de la famille des récepteurs Lpr (Low-density lipid receptor) se met en place permettant le recrutement de l'axine à la

membrane plasmique provoquant ainsi sa dégradation. La β -caténine s'accumule dans le cytoplasme, entre dans le noyau et se lie au facteur de transcription Tcf/Lef [55,56] (Figure I-9).

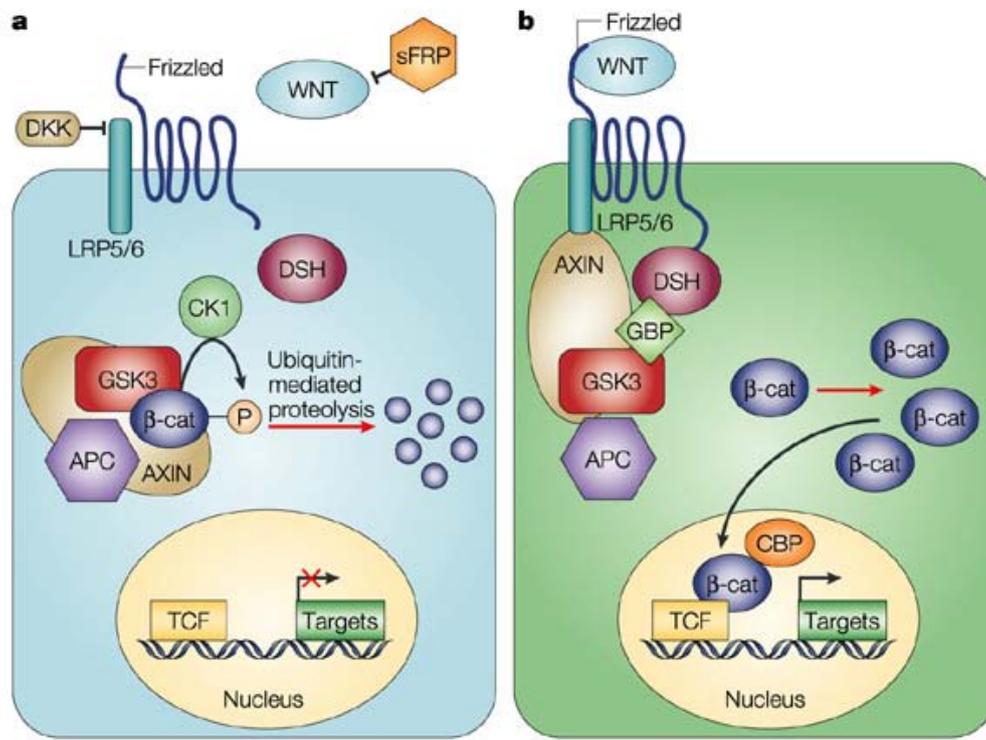


Figure I-9 : Schématisation de la voie de signalisation Wnt.

En absence du ligand (a), la β -caténine est dégradée. Lorsque la voie est activée (b), la dégradation de la β -caténine est réprimée entraînant une accumulation de celle-ci dans le cytoplasme. Elle rentre dans le noyau pour fixer les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (T-Cell-Factor/Lymphoid Enhancer-binding protein) et activer la transcription [56].

La cascade Wnt est essentielle pour la mise en place du destin des cellules le long de l'axe de la crypte intestinale [57]. L'identification de nombreuses cibles faisant partie de la voie Wnt/ β -caténine indique l'implication de cette cascade dans la régulation des CSI mais explique également les effets différentiels en fonction des types cellulaires et notamment selon leur localisation le long de l'axe de la crypte intestinale [12]. En effet, une des cibles principales de cette voie est *Lgr5/GPR49* dont le produit est exprimé spécifiquement par les CSI [58]. En parallèle, d'autres cibles de la voie Wnt, telles que *c-myc* ou la cycline D1, sont associées aux cellules en prolifération. De plus, l'identification des cibles *EphB/ephrinB* a renforcé l'implication de la voie Wnt dans la morphogénèse intestinale [59].

b. La voie PTEN-PI3K-Akt

Lors de la formation d'un complexe entre un ligand et un récepteur en amont de la voie, la PI3K est activée et phosphoryle ses substrats conduisant ainsi à la phosphorylation et activation de l'Akt par la PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1). Contrairement à de nombreuses voies de signalisation, cette voie ne dépend que d'un seul régulateur négatif, la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENsin homolog). Cette voie joue un rôle important dans la survie et la prolifération. Il est également connu que la voie PI3K stimule d'auto-renouvellement des CSI [60]. De façon remarquable, cette voie croise la voie Wnt puisque la protéine Akt phosphorylée est capable d'activer la β -caténine.

c. La voie BMP

Il semble que l'inhibition de la voie BMP (Bone Morphogenetic Protein) soit un évènement requis pour la conservation de l'état souche. En effet, l'activation de la voie BMP indiquée par la phosphorylation des protéines SMAD est retrouvée majoritairement dans les cellules intestinales différenciées [12].

d. La voie Notch

Les ligands Jagged et Delta sont capables de se fixer au récepteur Notch induisant un clivage protéolytique de celui-ci par une γ -sécrétase. La partie clivée de Notch, NCID, est alors transloquée dans le noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription [12]. Cette voie a été démontrée comme étant essentielle dans la prolifération du compartiment cryptique.

e. La voie Hedgehog

Cette voie joue un rôle capital dans l'organisation et la structure correcte de la muqueuse intestinale et ne joue pas réellement un rôle direct sur le destin des cellules épithéliales [12]. Le processus d'auto-régénération et de différenciation des CS dépend entre autres de cette voie.

II. Les cellules initiateuses de tumeur

II.1 L'origine du concept de cellules souches cancéreuses

Le fait que les tumeurs soient composées de populations cellulaires hétérogènes en termes de morphologie, d'expression de marqueurs, de capacité de prolifération et de potentiel tumorigénique est reconnu depuis longtemps. Les modèles traditionnels de carcinogénèse reposent sur le fait que l'hétérogénéité tumorale peut s'expliquer par une série d'évènements génétiques stochastiques et par une sélection clonale influencée par le microenvironnement.

Au contraire, le concept de cellules souches cancéreuses (CSC) ou cellules initiant le cancer (CIC) suggère que seulement une faible proportion de cellules au sein de la tumeur possède la capacité à l'initier et serait responsable de la croissance tumorale [61]. Cette hypothèse a pris naissance avec des études effectuées sur la Leucémie Aigüe Myéloïde (LAM) au cours desquelles des CIC ont pu être caractérisées [62]. Ces cellules, identifiées par les marqueurs CD34 et CD38, correspondent à la seule population cellulaire capable d'initier une LAM chez les souris immunodéficientes de type NOD/SCID (NonObese Diabetic Severe Combined ImmunoDeficient). La découverte de ces CS leucémiques représente un des évènements initiateurs de la recherche des CIC dans d'autres types de tumeurs, en particulier les tumeurs solides. Une hiérarchie cellulaire est alors suggérée, basée sur la présence de CIC qui prolifèrent et génèrent l'ensemble des cellules de la tumeur.

L'hypothèse la plus répandue actuellement concernant l'origine de ces CIC serait qu'elles dériveraient de CS présentes à la base même des cryptes intestinales. Ces CS saines subiraient des mutations qui pourraient s'accumuler tout au long des années voire des décennies. Une fois transformées, ces cellules mutées donneraient naissance à des CSC et des progéniteurs [57].

II.2. Les CIC et le microenvironnement tumoral

L'environnement tumoral fait partie intégrante de la néoformation tumorale dont il représente la partie non épithéliale. Il se constitue d'une composante cellulaire (fibroblastes, cellules immunes et vaisseaux) et d'une composante extracellulaire. Tous ces éléments interagissent entre eux *via* les facteurs de croissance, les cytokines et les molécules d'adhésion. Les interactions dynamiques entre les cellules épithéliales et stromales

représentent un point clé dans des processus aussi différents que l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire.

Les fibroblastes synthétisent les composants de la matrice extracellulaire comme les collagènes (type I, III, V) et la fibronectine. Ils contribuent également à la synthèse des membranes basales en sécrétant la laminine et le collagène IV. Les fibroblastes sont impliqués dans le contrôle de la différenciation épithéliale, la régulation de l'inflammation locale et dans les processus de remodelage tissulaire. Ils sont une source importante de métalloprotéases, qui sont responsables du remaniement de la matrice extracellulaire [63,64].

Le microenvironnement tumoral est également souvent le siège d'une inflammation responsable du recrutement des nombreuses cellules inflammatoires pouvant jouer un rôle pro- ou anti-tumoral. Parmi celles-ci, les macrophages ont un rôle dans la croissance tumorale de par leur capacité à intervenir dans le remodelage tissulaire, la production de facteurs de croissance et de facteurs pro-angiogéniques [65]. Il est connu que les réactions inflammatoires sont associées à l'initiation des métastases après infiltration par les macrophages.

Dans un dernier temps, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sembleraient jouer un rôle prépondérant dans l'initiation et la modulation de la croissance tumorale [66]. En effet, un lien étroit existe entre infection, inflammation chronique et cancer. L'environnement inflammatoire est généralement associé dans le côlon à une migration et une invasion des tissus périphériques par ces CSM. De ces cellules indifférenciées possédant un haut degré de plasticité cellulaire est née l'hypothèse d'une origine mésenchymateuse des cancers épithéliaux par le recrutement des CSM [67]. L'injection de CSM chez l'animal immunodéprimé stimule significativement la croissance tumorale [68].

II.3. La caractérisation des CIC au sein du CCR

Les CIC dans le CCR montrent des propriétés similaires aux CSI : l'auto-renouvellement, la multipotentialité, la prolifération quasi-illimitée dans le temps et l'état souche [69]. De plus, ces CIC seraient caractérisées par l'expression de marqueurs de cellules souches embryonnaires dont Oct4, Sox2 et Klf4 [70]. Tout comme les CSI, les CIC sont définies par l'auto-renouvellement tout en maintenant une capacité à engendrer une progéniture aussi bien tumorigénique que non-tumorigénique au travers de la division asymétrique (Figure I-8). Il est désormais admis qu'une série de mutations peut s'accumuler au cours des années voire des décennies au sein des CSI présentes à la base même des cryptes intestinales. Une fois transformées, les CSI mutées se divisent de manière symétrique et

asymétrique pour donner lieu à d'autres CIC ou des progéniteurs qui génèrent eux-mêmes des cellules cancéreuses. Ces mutations contribueraient à des anomalies de contrôle et une activation anarchique ou au contraire à une répression de certaines voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des CS [10,71].

Cependant, les CIC possèdent deux propriétés supplémentaires : la capacité d'initier une tumeur *in vivo* ainsi qu'une certaine capacité à résister aux traitements. Afin de les identifier et de les discriminer des CS saines, de nombreuses études ont été menées pour caractériser au mieux ces CIC dans le but de trouver des marqueurs spécifiques de celles-ci.

L'ensemble des propriétés des CIC sont schématisées dans la Figure I-10.

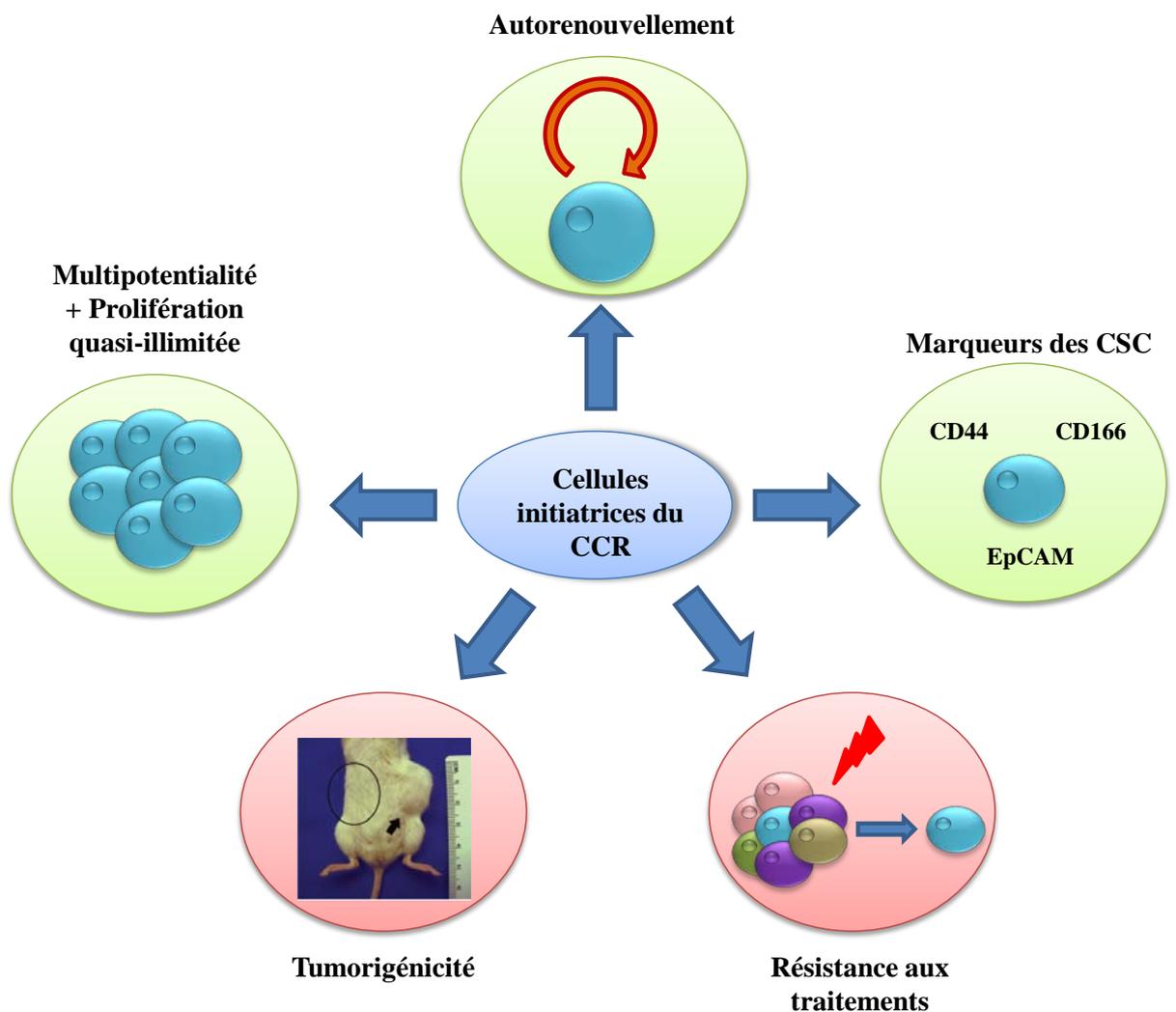


Figure I-10 : Représentation schématique des caractéristiques des CIC au sein du CCR.

Les différentes propriétés des CIC dans le CCR sont l'auto-renouvellement, l'expression de marqueurs spécifiques tels que le CD44, l'EpCAM ou encore le CD166, la multipotentialité ainsi que la prolifération quasi-illimitée dans le temps qui seront responsables de l'origine de la tumeur, la capacité de tumorigénicité *in vivo* et enfin la résistance aux traitements.

II.4. Les marqueurs des CIC au sein du CCR

L'un des principaux objectifs de la recherche dans ce domaine est désormais de caractériser et d'isoler les CIC afin de les étudier et de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de les éradiquer et d'éviter ainsi la récurrence tumorale. Néanmoins, les CIC ont comme caractéristique d'être des cellules non engagées dans une voie de différenciation comme les CS saines. Elles sont indifférenciées et n'expriment par conséquent que très peu de marqueurs de différenciation. Il existe néanmoins un certain nombre de marqueurs « généralistes » des CIC [55], dont certains sont encore controversés comme par exemple le CD133 [57]. Il est important de pouvoir discriminer correctement les CS saines des CIC, étant donné que celles-ci ont de nombreux marqueurs en commun dont le Lgr5 [58] ou encore l'aldéhyde déshydrogénase, ALDH [72,73] (Tableau 3).

	Marqueur	Fonction
Cellules souches saines de l'intestin	Musashi-1	Protéine de liaison à l'ADN
	Hes-1	Répresseur transcriptionnel
	Récepteur	Récepteur de surface de la cellule
	Bmi-1	Protéine répresseur de la famille Polycomb
	Lgr5	Non connue, cible de Wnt
	ALDH-1	Enzyme
Cellules initiant le cancer colorectal	CD133	Non connue
	CD44	Récepteur de l'acide hyaluronique
	CD166	Molécule d'adhésion
	EpCAM	Molécule d'adhésion
	ALDH-1	Enzyme

Tableau 3 : Marqueurs proposés pour caractériser les CSI saines et CIC.
Ensemble des marqueurs permettant de discriminer les CS et les CIC [55].

Le CD133 ou prominin-1, une glycoprotéine transmembranaire, a été en premier lieu utilisé comme marqueur permettant l'enrichissement des cellules capables de régénérer la tumeur dans les leucémies [74]. Son étude a ensuite été étendue aux tumeurs solides en particulier le glioblastome [75]. Dans le cadre du CCR, les premières études ont montré que

seule la population CD133⁺ possédait les caractéristiques des CIC et était capable de former une tumeur chez les souris immunodéprimées [76,77]. Cependant, la pertinence de ce marqueur est désormais contestée : l'expression du CD133 ne serait pas restreinte au pool de CIC et des cellules CD133⁻ auraient également le pouvoir de régénérer *in vivo* une masse tumorale au même titre que les cellules CD133⁺ [78,79,80]. Ces observations remettent en cause la validité de CD133 en tant que marqueur spécifique des CIC dans le CCR et conduisent à la recherche de nouveaux marqueurs plus fiables. Le CD133 reste cependant utilisé en association avec d'autres marqueurs [81,82,83,84]. De plus, de récentes avancées ont mis en évidence que le CD133 ne serait pas perdu par la cellule au cours de sa différenciation mais que l'état de glycosylation de cette protéine serait modifié [85,86].

Le CD44 est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans de nombreux phénomènes tels que la croissance, la survie ou encore l'adhésion cellulaire. Dans le cancer, cette protéine joue un rôle dans la migration et l'adhésion à la matrice, induisant l'agrégation cellulaire et la croissance tumorale [87,88]. Différents variants de cette protéine ont été identifiés [89]. Le CD44 est un marqueur robuste des CIC dans le CCR puisqu'une diminution de son expression empêcherait l'initiation de la tumeur *in vivo*, ce qui n'est pas le cas pour le CD133 [90]. L'injection de seulement 1000 cellules CD44^{hi} (exprimant fortement ce marqueur) permet la formation d'une tumeur chez la souris immunodéprimée [91]. Son expression est également associée à une translocation dans le noyau de la β -caténine. D'autre part, le CD44 peut subir une translocation vers le noyau en complexe avec la protéine STAT3 afin d'augmenter la prolifération cellulaire [92] et serait fortement impliqué dans la prolifération non contrôlée des CIC intestinales aboutissant au développement des tumeurs [93,94].

L'EpCAM est également une glycoprotéine transmembranaire surexprimée dans de nombreux cancers [95]. Elle est impliquée dans l'adhésion et dans la prolifération cellulaire. Il a été démontré que les cellules CD44⁺/EpCAM^{hi} correspondent à la population de cellules initiant la tumeur [96]. En plus de cette combinaison avec le CD44, lorsqu'il est corrélé avec le CD166, sa surexpression est corrélée à une augmentation du risque de développer un CCR chez le sujet âgé [97]. Par ailleurs, l'EpCAM peut être activé par clivage protéolytique de sa partie intracellulaire, donnant naissance à l'EpICD, qui peut subir une translocation vers le noyau. Associé à d'autres facteurs de transcription, ce domaine peut induire la transcription de gènes spécifiques impliqués dans la prolifération et la tumorigénicité chez la souris

immunodéficiente [98]. L'association du marqueur EpCAM avec le CD44 permet une identification phénotypique robuste des CIC au sein du CCR [96].

Le CD166 ou ALCAM (Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule), membre de la superfamille des immunoglobulines, est une molécule d'adhésion cellulaire homotypique et hétérotypique [99]. Son expression membranaire sur les cellules de CCR est associée à un taux de survie faible [100]. En effet, bien que son niveau d'expression ne semble pas être directement corrélé au stade tumoral, son élévation d'expression à la membrane est fortement restreinte aux cellules cancéreuses chez les patients dont les chances de survie sont nettement diminuées. L'élévation de son expression serait donc un évènement survenant précocement dans le développement tumoral. Au contraire, son expression cytoplasmique est ubiquitaire au niveau des cellules des cryptes saines [101]. De plus, le CD166 est un marqueur des CSM, ce qui a conduit à le tester comme candidat marqueur des CIC. Ainsi, le CD166 est exprimé en synergie avec le CD44 et l'EpCAM [96] dans les cellules aptes à initier une tumeur chez l'animal. Enfin, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le CD166 a permis de diminuer les capacités d'invasion cellulaire *in vitro* et d'induire une réduction de la taille de la tumeur *in vivo* ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle [102].

L'ALDH (Aldéhyde Déshydrogénase) est une enzyme métabolique de détoxification utilisée comme marqueur de la population capable d'initier la tumeur dans le CCR. En effet, la capacité invasive a été confirmée *in vitro* de par leur capacité à former des sphères mais également *in vivo* au cours de xénogreffes [103]. En plus de la caractérisation par l'expression de ce marqueur, son activité enzymatique peut être également mesurée. Ainsi, il a été confirmé que l'expression forte de ce marqueur est associée à une activité importante de cette enzyme au sein des CIC dans le CCR [104]. Il apparaît également que l'activité de l'ALDH est impliquée dans la résistance aux traitements. Cependant, l'activité de cette protéine ne serait pas strictement restreinte aux CIC puisqu'elle caractérise également les CSI saines [55,72]. Ce marqueur ne serait donc pas un marqueur discriminant suffisant pour servir de cible thérapeutique directe.

Afin d'identifier les CIC au sein du CCR, la caractérisation de celles-ci s'effectue désormais en utilisant une combinaison des différents marqueurs cités précédemment [81,96,97,105,106].

II.5. Le rôle des CIC dans la résistance thérapeutique des CCR

Les CCR sont des tumeurs hétérogènes composées de cellules à différents stades de différenciation. La mise en évidence de l'existence des CIC au sein des CCR a permis d'expliquer en partie l'échec des thérapies locorégionales ou systémiques.

a. CIC et résistance à l'irradiation

Les études des mécanismes de réponse à la radiothérapie ont été initiées sur les gliomes [107]. Il a été démontré que la population enrichie en CIC augmentait suite à l'irradiation. De plus, les CIC irradiées avaient une capacité de survie supérieure à la population des cellules différenciées. Enfin, les tumeurs les plus résistantes à la radiothérapie étaient composées d'un nombre plus important de cellules CD133⁺, marqueur principal des CIC dans les gliomes. Cependant, la radorésistance de ces cellules pourrait être inhibée par l'inactivation spécifique des kinases checkpoint Chk1 et Chk2 (Checkpoint kinases 1 et 2). En effet, les cellules cancéreuses répondent aux dommages de l'ADN par l'activation de mécanismes complexes de détection et de réparation de ces dommages. Ces points de contrôle dépendent de plusieurs protéines telles que ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ou encore Chk1 et Chk2. Ces différentes protéines sont activées suite à un stress pour initier un arrêt du cycle cellulaire pour tenter de réparer les dommages à l'ADN ou, si les dommages sont trop importants, d'induire l'apoptose des cellules normales. Ces protéines de contrôle semblent être significativement activées dans les cellules exprimant les marqueurs des CIC en réponse à l'irradiation [107,108]. En plus de l'implication d'ATM, Chk1 et Chk2 dans la résistance à l'irradiation des CIC, des études ont pu mettre en évidence le rôle d'autres acteurs dans ce mécanisme de résistance. En effet, la voie Wnt β -caténine joue un rôle dans la radorésistance des CIC du sein [109]. Dans le cadre du CCR, il a également été démontré que la structure de la chromatine et les histones jouent un rôle prépondérant dans la résistance à la radiothérapie. Ainsi, les CIC activent préférentiellement leurs mécanismes de point de contrôle des dommages à l'ADN après irradiation. Elles subissent donc les mêmes dommages dus aux rayonnements ionisants que les autres cellules composant la tumeur. Cependant, les CIC ont une capacité de réparation des dommages plus rapide et plus efficace que les cellules cancéreuses différenciées. Outre les mécanismes de réparation de l'ADN, la modification des histones telles que la méthylation, l'acétylation ou la phosphorylation peut augmenter la résistance des cellules cancéreuses à la radiothérapie. Ainsi, des changements dynamiques de

la conformation de la chromatine ont pu être observés après radiothérapie sur des cellules CD133⁺ [110].

b. CIC et résistance à la chimiothérapie

La majorité des thérapies utilisées dans le cas du CCR, hormis la chirurgie, engendre des dommages à l'ADN et perturbe la mitose pour induire la mort cellulaire des cellules cancéreuses les plus prolifératives. La résistance des CIC aux dommages à l'ADN induits par l'irradiation suggère que les CIC pourraient résister à d'autres types de traitements tels que la chimiothérapie.

L'un des mécanismes les plus importants dans la résistance des CIC à la chimiothérapie est le « multidrug resistance ». En effet, l'une des particularités des CIC est leur forte expression de pompes à efflux tels que les transporteurs à « ATP-binding cassette » (transporteur ABC). Cette famille inclut MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1 aussi nommée ABCC1), la P-glycoprotéine (ou ABCB1) ainsi que la protéine BCRP (Breast Cancer Resistance Protein aussi nommée ABCG2) [111]. Ces transporteurs sont des pompes exclusivement impliquées dans l'efflux des composés lipophiles. Le transporteur ABCG2 est particulièrement étudié dans le cadre de la résistance des cancers aux chimiothérapies [112]. Le taux d'expression élevé de ces protéines dans les CIC confère à cette population une capacité d'efflux importante caractérisée *in vitro* par le rejet du marqueur fluorescent Hoechst 33342. Cette capacité de rejet du Hoechst 33342, notamment par le transporteur ABCG2, a été mise en évidence dans les CS hématopoïétiques, ce qui a amené à employer le terme de « Side Population » ou cellules SP [113]. Le terme de cellules SP fait référence au fait que, lorsque les cellules sont analysées par cytométrie en flux, la population de CIC est visualisée comme des cellules marquées du côté (ou « side ») opposée au reste de la population cellulaire analysée [114,115].

Une exposition chronique aux chimiothérapies en culture cellulaire permet la sélection des cellules ayant un phénotype de résistance aux chimiothérapies, phénotype correspondant aux CIC [116]. En parallèle, la sélection de CIC en culture est associée à une augmentation de la résistance aux traitements [117]. En effet, cette exposition chronique induirait la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), mécanisme initialement connu dans le développement embryonnaire et actuellement démontré comme étant un phénomène clé dans les processus de progression tumorale et de formation des métastases [116]. Il a été démontré que ce mécanisme était également associé au phénotype souche [118]. De plus, les CIC sélectionnées

après une exposition chronique aux traitements chimiothérapeutiques sont capables de sécréter des facteurs solubles pour stimuler les cellules chimiorésistantes voisines [119].

De par leur forte croissance et leur consommation importante en oxygène, les tumeurs solides présentent presque toujours des zones dans lesquelles la teneur en oxygène est significativement plus basse que dans les tissus avoisinants. Il est de plus à noter que les CSC capables d'initier le cancer se situeraient au cœur même de la tumeur, caractérisé par ces zones hypoxiques. Ces cellules ont un rôle primordial dans la régulation de l'angiogénèse tumorale. En effet, l'angiogénèse est hautement régulée par l'activation du facteur HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor α). Ce dernier active la transcription de nombreuses protéines impliquées dans la néo-angiogénèse tumorale mais également dans le maintien de l'état souche et du caractère pluripotent des CIC [120]. En effet, HIF-1 régule l'expression de Oct-4 (Octamer-binding transcription factor 4) impliqué dans le maintien du caractère pluripotent des cellules souches [121]. Ce facteur joue également un rôle dans l'activation de l'autophagie, un phénomène de recyclage cellulaire. L'autophagie constitue un mécanisme de protection contre l'apoptose dans des conditions nutritionnelles défavorables en tant que système adaptatif en réponse aux stress métaboliques rencontrés par des cellules cancéreuses. Il a été démontré que l'autophagie joue un rôle dans le maintien de l'état indifférencié des cellules souches [122] et permet la survie des CIC dans le microenvironnement hypoxique [123]. L'autophagie aurait un effet protecteur sur les cellules souches au sein de nombreux cancers tels que le glioblastome [124] et le cancer du sein [125]. L'initiation de ce phénomène au sein des CIC faciliterait alors l'échappement à la mort induite par les traitements conventionnels. Cependant, cette relation hypoxie / autophagie / CIC reste peu étudiée au sein du CCR.

Ainsi, les CIC semblent être au cœur des mécanismes de résistance aux thérapies conventionnelles. En effet, ces dernières permettent seulement d'éradiquer les cellules tumorales différenciées. Quant aux CIC, elles ne sont pas sensibles à ces traitements, survivent et sont capables de ré-initier la tumeur. De nouvelles thérapies ciblant spécifiquement ces CIC pourraient permettre de mieux contrôler la croissance tumorale et la dissémination métastatique et de prévenir la formation de métastases ainsi que la récurrence tumorale (Figure I-11).

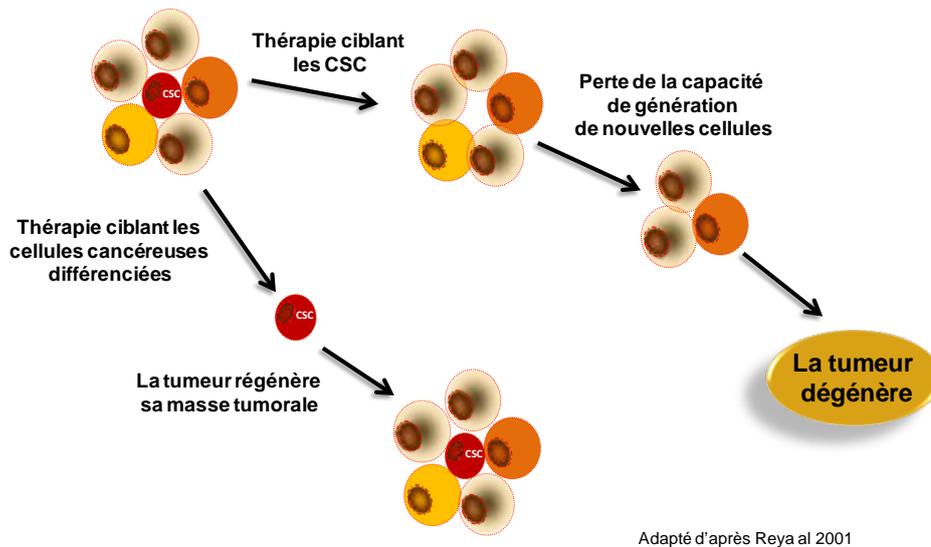


Figure I-11 : Effets des thérapies conventionnelles et de thérapies ciblant directement les CIC.

Les thérapies conventionnelles permettent de faire régresser la tumeur en tuant les cellules ayant une certaine capacité de prolifération. Si les CIC sont moins sensibles à ces traitements, elles restent viables et sont capables de reformer une nouvelle tumeur. Au contraire, si les thérapies ciblent directement les CIC, les tumeurs deviennent incapables de se maintenir et de se développer [126].

Les CIC représentent donc une sous-population restreinte de cellules hautement agressives, au caractère indifférencié, capables d'agir sur leur microenvironnement et d'adapter ce dernier selon leurs besoins. Elles possèdent de plus des propriétés de résistance accrues aux différents types de traitements anticancéreux ainsi que le pouvoir d'induire la récurrence tumorale. Leur étude s'avère donc nécessaire afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de les détruire. La caractérisation des CIC représente un point clé dans leur étude mais également dans le cadre de la démarche diagnostique.

L'hétérogénéité cellulaire des CCR et le caractère indifférencié des CIC représentent les deux principales difficultés à surmonter dans la démarche d'isolement et de caractérisation des CIC. Le développement et l'utilisation d'approches instrumentales d'isolement et de caractérisation des CIC ont ainsi fait l'objet d'une partie de mon travail. Plusieurs stratégies ont été développées pour améliorer le tri cellulaire, l'isolement des CIC et sont présentées dans le contexte de développement d'outils de tri cellulaire.

C. Le fractionnement par couplage flux force

I. Principes généraux

Développée dans la fin des années 1960 par J.C. Giddings, la FFF (Field Flow Fractionation) est souvent présentée comme l'une des méthodes séparatives les plus polyvalentes [127,128,129,130]. En effet, la grande variété de champs utilisables (Tableau 4) [131], de configurations instrumentales, de modes d'élution, permet d'envisager une infinité de conditions expérimentales à mettre en œuvre pour le tri, la séparation et la caractérisation de polymères, de poudres, d'émulsions, de colloïdes, de nanoparticules ou de bioparticules dont la taille varie de 1 nm à 100 µm [128,130,132]. Paradoxalement, ce vaste champ d'investigation conduisant à la dispersion des centres d'intérêt, et le déficit d'instrumentation disponible et fiable au niveau commercial, a longtemps contribué à ce que cette méthode reste confidentielle malgré tout son potentiel [130,132,133,134]. La FFF est une "superfamille" de techniques mettant en œuvre un principe commun dans un ensemble de dispositifs instrumentaux différents selon la nature des champs appliqués (Tableau 4). Cette même "superfamille" se trouve rattachée à celle plus vaste des méthodes chromatographiques au travers de son mécanisme de séparation basé sur l'élution différentielle des particules, et à celle des techniques basées sur l'application d'un champ telles que l'ultracentrifugation, l'élutriation ou l'électrophorèse [130,132,133,134,135].

La FFF, et en particulier la SdFFF (Sedimentation Field Flow Fractionation), partage avec la CLHP (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) une grande partie de son instrumentation (pompes, injecteurs, détecteurs ...), mais où la CLHP met en œuvre une colonne remplie de phase stationnaire, la FFF utilise un canal parallélépipédique (Figure I-12) ne contenant aucun remplissage, phase stationnaire ou préparation de surface.

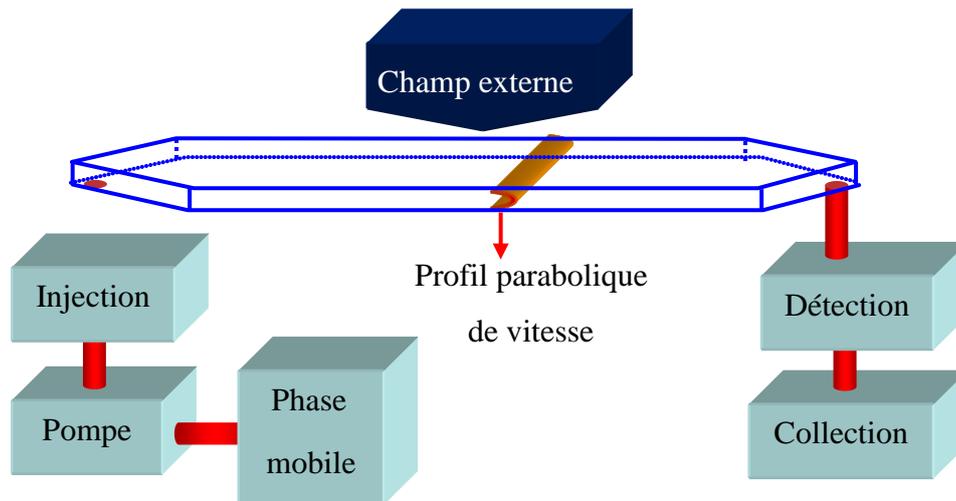


Figure I-12 : Schéma général d'un appareillage de FFF.

La forme et la géométrie du canal sont des éléments essentiels aux performances de l'appareillage, car elles déterminent le profil d'écoulement de la phase mobile et la direction dans laquelle sera appliqué le champ externe.

Ces canaux parallélépipédiques possèdent comme principale caractéristique d'être de grande longueur ($L = 50-90$ cm) en comparaison de leur largeur ($b = 1-2$ cm) et de leur épaisseur ($w = 80-250$ μm). Les extrémités triangulaires permettent une transition non turbulente au niveau des flux d'entrée et de sortie du flux laminaire se produisant dans le canal (Figures I-12 et I-13). A l'intérieur du canal, l'écoulement laminaire conduit à l'établissement d'un profil de vitesse parabolique : vitesse quasiment nulle au contact des parois (forces de friction), pour devenir maximale au centre du canal (Figure I-13) [128,133,136].

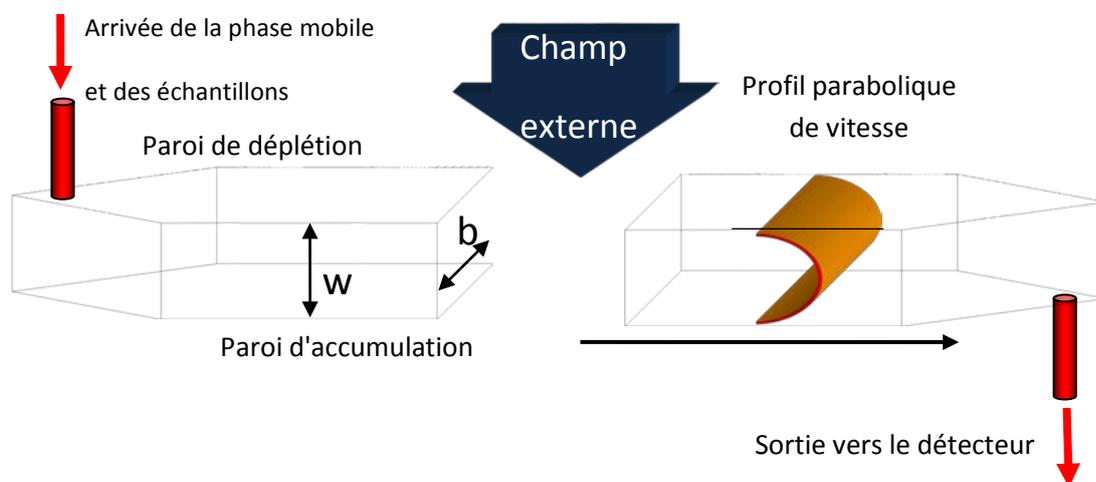


Figure I-13 : Schéma classique d'un canal de FFF.

Ce profil parabolique s'applique sur toute la longueur du canal, mais aussi sur sa largeur, à l'exception des bords de la section où des perturbations vont exister, mais celles-ci peuvent être négligeables si le rapport $b / w \approx 10^{-2}$ [137]. En pratique, le canal est obtenu par découpe rigoureuse du parallélépipède dans une feuille de Mylar® dont l'épaisseur définira celle du canal. Cette feuille est ensuite sertie de manière étanche entre deux plaques qui constituent les deux parois principales du canal : paroi d'accumulation et paroi de déplétion (Figure I-13). Le choix des matériaux pour ces parois est primordial, car ce sont elles qui offrent le maximum de surface de contact avec la phase mobile et les espèces à séparer. Les parois doivent transmettre le champ de façon intégrale et homogène, tout en offrant une interaction limitée ou nulle avec les espèces séparées [133,136,138,139].

La séparation des particules en mélange introduites dans le canal par l'intermédiaire du flux de phase mobile est basée sur le couple Flux-Force, par la mise en œuvre d'un champ externe appliqué perpendiculairement à la grande surface du canal (Figure I-13), la paroi d'accumulation étant opposée à celle où s'exerce le champ (paroi de déplétion). Sous l'effet du champ, les particules se positionnent à des hauteurs différentes dans l'épaisseur du canal, et progressent dans le canal à la vitesse moyenne de la ligne de flux dans laquelle elles se trouvent. Ainsi, selon la susceptibilité particulière de chaque particule au champ, celles-ci seront confinées dans des lignes de vitesse différentes, et seront éluées à des vitesses différentes induisant ainsi une différence de temps de rétention (t_r , Figure I-14). C'est le champ externe qui produit la différence de vitesse nécessaire à l'origine de la séparation des particules (Figure I-14) [128,129].

Ce principe est un élément commun à l'ensemble des techniques de FFF. La variété des champs applicables est directement à l'origine de la diversité des sous familles de FFF et de la polyvalence de la technique (Tableau 4) [131].

Champ	Technique
Gravité terrestre	FFF gravitationnelle : GFFF
Champ multigravitationnel	FFF multigravitationnelle ou de sédimentation : SdFFF
Thermique (gradient)	FFF thermique : ThFFF
Gradient hydrodynamique	FFF hydrodynamique : FIFFF / Hollow Fiber FIFFF (HF5)
Electrique	FFF électrique : EIFFF
Magnétique	FFF magnétique : MgFFF
Acoustique	FFF acoustique : AcFFF

Tableau 4 : Principaux champs mis en œuvre en FFF.

Dans la plupart des cas, il est possible d'ajuster, de contrôler ou de programmer l'intensité du champ. Le champ doit [128]:

- être suffisamment intense pour forcer le déplacement des particules dans une région la plus fine possible dans l'épaisseur du canal ($\ll \omega / 2$),
- permettre une sélectivité suffisante pour une séparation la plus efficace possible des différentes sous-populations (Sd : sélectivité en taille notamment),
- être facile de mise en œuvre pour la construction et le développement d'une instrumentation d'accès aisé.

II. Les modes d'élution

Le principe général de la FFF montre le confinement des espèces à des hauteurs différentes permettant leur élution à des vitesses différentes. Idéalement, les zones de confinement doivent être réduites à quelques micromètres ou moins, mais de nombreux facteurs conduisent à leur élargissement. Il existe, en fait, différents processus de distribution des particules dans la hauteur du canal, à l'origine des différents modes d'élution. Ceux-ci pouvant être mis en œuvre avec les différents champs précédemment décrits, cela accroît encore la polyvalence de la technique [128,132,134,136,140,141].

Selon le schéma classique d'un appareillage de FFF, l'introduction de l'échantillon se fait au niveau de la paroi de déplétion (Figure I-13). Sous l'effet du champ, les particules traversent le canal en direction de la paroi d'accumulation. Généralement, le flux de phase mobile est stoppé pendant une période nommée temps de relaxation (τ) [142].

$$\tau = \frac{w^2 \lambda}{D} \left(\frac{1}{2} - \lambda + \frac{1}{e^{\lambda} - 1} \right) \quad [1]$$

où $\lambda = \frac{\ell}{w}$, avec ℓ distance centre de gravité du nuage de particule / paroi d'accumulation et w : épaisseur du canal, D : coefficient de diffusion moléculaire. τ est d'autant plus grand que D est faible. Après un certain temps, un arrêt de la migration des particules est observé, car à l'approche de la paroi d'accumulation, les particules sont soumises à des forces ou des processus de transport s'exerçant de manière à contrebalancer l'effet du champ. Ainsi, la balance champ externe / forces d'opposition (diffusion pour les particules submicroniques, forces d'inertie pour les particules microniques) conduit à l'établissement d'un équilibre de distribution, définissant pour chaque particule une position d'équilibre (L) dans l'épaisseur du canal, position à laquelle elle sera élue à la vitesse de la ligne de flux correspondante (Figure I-14).

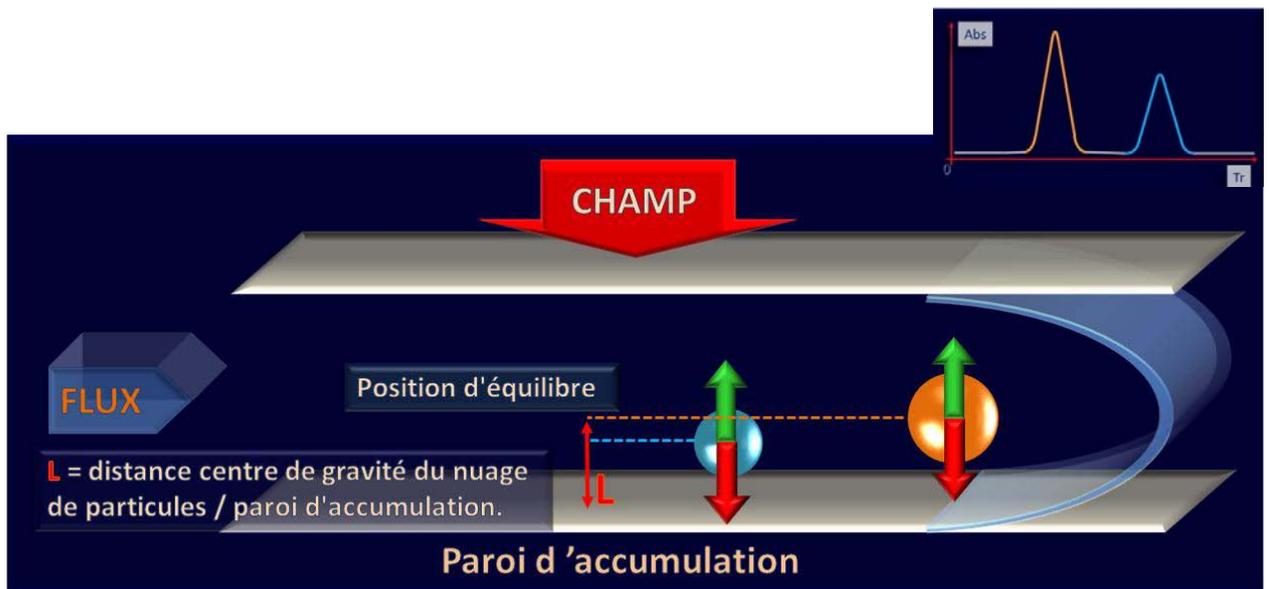


Figure I-14 : Principe général de séparation par FFF.

Les particules n'étant pas sensibles au champ appliqué auront une vitesse de progression égale à celle de la phase mobile dans le système et pourront être utilisées pour la mesure du temps mort t_0 et du volume mort V_0 du système. En pratique, le facteur de rétention nommé R_{obs} (R pratique ou observé) [128,132,133,141] est défini par :

$$R_{obs} = \frac{t_0}{t_r} = \frac{V_0}{V_r} \quad [2]$$

La nature des forces d'opposition est un élément clef de la FFF car elle détermine la distribution des particules, leur mode d'élution, la sélectivité et la résolution de la méthode. Ces forces dépendent prioritairement des propriétés physiques des particules séparées : taille, densité, forme, diffusion moléculaire... (Figure I-14) [128,130,133].

II.1. Mode normal ou mode brownien

C'est le mode d'élution des particules submicroniques ($< 1\mu\text{m}$) [128,130,132]: macromolécules, colloïdes, organites cellulaires... D'un point de vue historique, c'est le premier mode mis en œuvre (d'où le terme "normal") et reste encore parmi les plus employés. Sous l'influence du champ, les particules sont confinées au voisinage de la paroi d'accumulation, où se produit une augmentation de leur concentration. Un processus de diffusion s'oppose au champ et la balance de ces forces permet la formation d'un nuage de particules ayant une distribution exponentielle dans l'épaisseur du canal (Figure I-15). Ceci crée un gradient de concentration dont l'équation est la suivante [128,130,132]:

$$C_x = C_0 e^{\frac{-x|U_x|}{D}}$$

$$C_x = C_0 e^{\frac{-xF}{kT}}$$

où C_x : concentration de la particule à une position x dans le canal ($x \leq w$), C_0 : concentration à la paroi d'accumulation, U_x : vitesse transverse, D : coefficient de diffusion moléculaire, F : force du champ, k : constante de Boltzman, T : température absolue en degré Kelvin.

Ainsi les particules ayant des propriétés de diffusion différentes (coefficient de diffusion moléculaire) présentent des distributions et des épaisseurs différentes. Plus l'épaisseur du nuage de particules est important, plus le centre de gravité est élevé, et plus elles seront éluées rapidement (Figure I-15). Les particules les plus petites ont un coefficient de diffusion moléculaire supérieur et seront éluées avant les particules de plus grand diamètre. C'est l'ordre d'élution du mode normal (Figure I-15) [128,130,132,140].

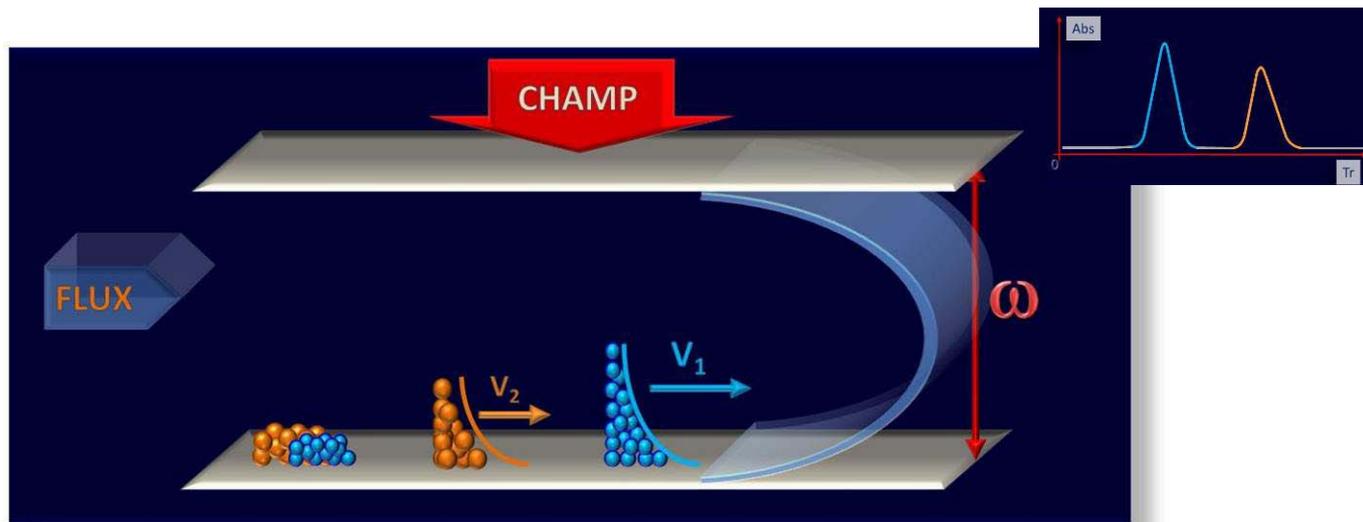


Figure I-15 : Mécanisme général du mode d'éluion normal ou brownien.

II.2. Mode Stérique-Inertiel, mode par focalisation

Si l'on considère à présent des particules dont le diamètre est supérieur au micron, le coefficient de diffusion moléculaire est alors négligeable. En absence de flux, les particules sont conduites au contact proche de la paroi d'accumulation.

a. Le mode inertiel

La mise en mouvement des particules dans le flux de phase mobile conduit à la génération de forces hydrodynamiques de deux types : forces inertielles et forces ascensionnelles qui s'opposent au champ externe. Les particules sont alors focalisées dans de fines couches situées au-dessus de la paroi d'accumulation. Ces monocouches seront éluées à la vitesse de la ligne de flux passant par leur centre de gravité (Figure I-16) [130,132,133,136,138,140,143,144,145,146].



Figure I-16 : Mécanisme général du mode Inertiel.

Les forces hydrodynamiques sont décrites par les équations suivantes [132,136]:

$$F_L = F_I + F_{asc} \approx C \frac{a^3 \eta S o}{\delta} \text{ avec } F_I = C \frac{a^3 \eta 6 \langle V \rangle}{\delta w} \text{ et } F_{asc} = 13.5 \pi \frac{\langle V \rangle^2 a^4 \rho}{w^2} g \left(\frac{x}{w} \right)$$

où **FL** : forces hydrodynamiques, **FI** : forces inertielles, **Fasc** : forces ascensionnelles, **C** : coefficient adimensionnel dépendant du flux de phase mobile (7(10⁻³)), **a** : rayon des particules, **η** : viscosité, **ρ** : densité de la phase mobile, **So** : coefficient de Soret, **δ** : distance entre le centre de gravité de la monocouche et la paroi d'accumulation, **⟨V⟩** : vitesse moyenne de la phase mobile / **w** : épaisseur du canal, **x** : distance entre le centre de gravité de la particule et la paroi.

Les facteurs influençant ces forces, et sur lesquels il est possible d'agir pour améliorer la séparation, sont essentiellement la vitesse de la phase mobile (débit) et l'épaisseur du canal.

Concernant les particules, les deux principaux paramètres régissant la séparation et l'ordre d'éluion sont la densité et la taille. A densité égale, les particules les plus grandes génèrent le plus de forces hydrodynamiques : situées plus haut dans le canal, elles seront éluées avant les particules de plus faible diamètre (Figure I-16) [132,136].

En SdFFF, la force de gravité s'exerçant sur une particule est de la forme [132] :

$$F = m \left(1 - \frac{\rho_{mob}}{\rho_{part}} \right) \omega^2 r$$

où, m : masse de la particule, ρ : densité de phase mobile et de la particule, ω : fréquence de rotation angulaire, r : rayon du rotor.

A taille égale, les particules les plus denses sont plus sensibles au champ de gravité et sont éluées en dernier. Dans une population de forte polydispersité en taille et densité, les particules les plus grandes et les moins denses seront éluées en premier, alors que les plus petites et les plus denses le seront en dernier [128,130,132].

L'intérêt de ce mode d'éluéon est évident pour l'éluéon des cellules dont la fragilité et la capacité d'interaction ou d'adhésion aux surfaces sont connues. Ces interactions conduisent à des effets néfastes en termes d'intégrité. Dans une stratégie de séparation cellulaire ou de particules microniques, du fait de l'importante sélectivité de ce mode en fonction de la taille (a^3 , eq. 5) et du faible risque d'interaction particules / paroi qu'il offre, le mode Inertiel est un modèle de choix, dont on doit assurer la mise en œuvre [132,133,138].

b. Le mode stérique

Il est considéré comme étant un cas limite du mode Inertiel [128,130,132,133,136,138,140,143,144,145,146]. Il est mis en œuvre lorsque les forces hydrodynamiques sont largement contre-balancées par la force exercée par le champ externe (fort champ et / ou faible débit de phase mobile). Les particules sont focalisées dans une zone proche située au contact ou très proche de la paroi d'accumulation alors $\delta \approx a$ (Eq. 5). Dans ces conditions, où les particules semblent rouler sur la paroi d'accumulation, les plus grandes particules ont leur centre de gravité situé plus haut dans l'épaisseur du canal (ligne de vitesse plus rapide) et seront donc éluées avant les plus petites, comme pour le mode Inertiel (Figure I-17) [128,130,132,133,136,138,140,143,144,145,146].

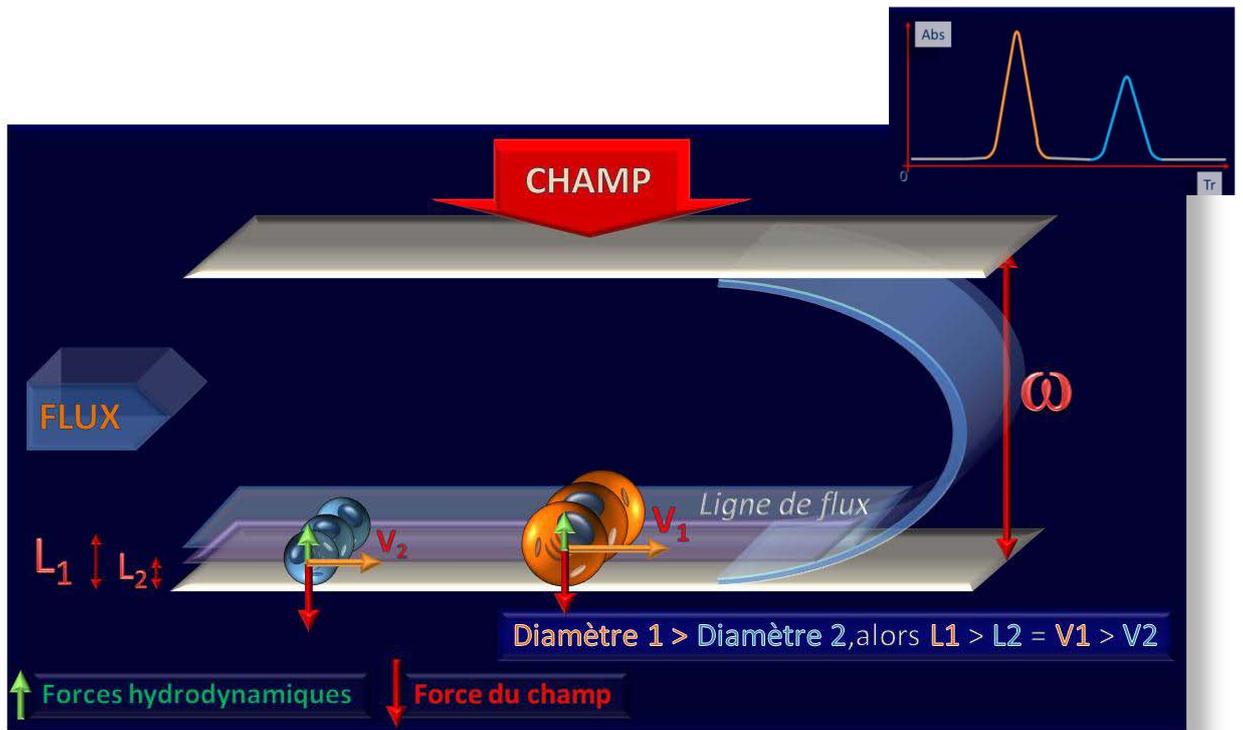


Figure I-17 : Mécanisme général du mode Stérique.

Les conséquences du mode Stérique sont très importantes. L'élution au proche contact de la paroi d'accumulation se traduit à terme, en plus des inconvénients sur l'intégralité fonctionnelle cellulaire, par une baisse de répétabilité, de reproductibilité et du rendement ("empoisonnement" progressif du canal). Ce mode d'élution conduit, de plus, à une perte de sélectivité selon la densité [133,138].

III. Le facteur de rétention

III.1. Définition

L'une des grandeurs fondamentales de premier intérêt en chromatographie ou en FFF reste le moment d'ordre 1 ou la médiane du pic [132,136]. Lorsque le pic est parfaitement gaussien, cette valeur est confondue avec le temps de rétention mesuré au sommet du pic, condition plutôt rare en FFF lors de l'analyse de populations polydisperses. Le facteur de rétention **R** est donné par l'équation suivante [147]:

$$R = \frac{M_{10}}{M_{1r}} \quad \text{et} \quad R_{obs} = \frac{t_0}{t_r} = \frac{\langle v \rangle_{mob}}{\langle v \rangle_{part}} \quad [7]$$

R_{obs} est la valeur pratique du facteur de rétention, **t₀** : temps mort, **t_r** : temps de rétention des particules, **<v>_{mob}** : vitesse moyenne linéaire de la phase mobile et **<v>_{part}** : vitesse moyenne linéaire du nuage de particules.

Pour le mode normal[142]:

$$R = 6\lambda \left[\coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 2\lambda \right] \quad [8]$$

où $\lambda = \frac{\ell}{w}$, avec ℓ étant la distance centre de gravité du nuage de particule et la paroi

d'accumulation et w : épaisseur du canal.

Pour le mode Stérique-Inertiel [136]:

$$R_{corr} = 6(\alpha - \alpha^2) + 6\lambda(1 - 2\alpha) \left[\coth\left(\frac{1-2\alpha}{2\lambda} - \frac{2\lambda}{1-2\alpha}\right) \right] \quad [9]$$

où $\alpha = a / w$ avec a : rayon de la particule.

On peut également écrire :

$$R_{corr} = 6\gamma(\alpha - \alpha^2) + 6\lambda(1 - 2\alpha) \left[\coth\left(\frac{1-2\alpha}{2\lambda} - \frac{2\lambda}{1-2\alpha}\right) \right] \quad [10]$$

où γ est un facteur de correction stérique, prenant en compte l'effet des forces hydrodynamiques. Une écriture simplifiée peut être donnée si $\alpha \gg \lambda$:

$$R = 6\gamma\alpha + 6\lambda \quad [11], \text{ et si la particule } \gg 1 \mu\text{m alors } R \approx 6\gamma\alpha = 6\gamma \frac{a}{w} \quad [12].$$

Dans le cadre du mode Stérique, γ n'est pas pris en compte.

III.2. Applications

L'ensemble de ces égalités montre que la FFF permet d'établir facilement les équations de transport des analytes ou du profil de concentration. Du fait de l'utilisation de canaux ouverts, non remplis, de géométrie simple conduisant à l'établissement d'un écoulement laminaire à profil parabolique, il est aisé de traduire les grandeurs de rétention en paramètres physico-chimiques tels que : taille, densité, coefficient de diffusion moléculaire ou thermique, conduction électrique, forces hydrodynamiques [128,130,136,145,148]. Dans des conditions d'élution parfaitement calibrées, pour des populations relativement monodisperses, la FFF est un outil de mesure de ces paramètres. Ceci correspond à l'une des applications les plus répandues de la technique, en particulier en ce qui concerne la FFF hydrodynamique permettant, après calibration, la mesure de taille de polymères et colloïdes variés, et à présent de nanoparticules [149]. Ces applications deviennent beaucoup plus difficiles de mise en

œuvre pour des populations polydisperses telles que les populations cellulaires pour lesquelles aucun standard réaliste n'est disponible [133,138].

D'un point de vue pratique, il faut connaître la dépendance de R_{obs} aux variations des conditions opératoires. En mode normal, R_{obs} est directement dépendant de la taille des particules (coefficient de diffusion D , Eqs. 3, 8) et du champ appliqué. Plus le champ augmente, plus R_{obs} diminue pour des particules de taille égale. R_{obs} reste indépendant du flux de phase mobile. En mode Inertiel au contraire, si R_{obs} est dépendant du champ, de la taille et de la densité des particules, il sera également dépendant du flux de la phase mobile (création des forces hydrodynamiques). Ainsi, à champ constant, si le débit de phase mobile augmente, R_{obs} augmente. A débit constant, si le champ augmente, R_{obs} diminue. Pour le mode Stérique, R_{obs} devient totalement indépendant du champ et du débit de la phase mobile. Les particules étant éluées au contact de la paroi, R_{obs} ne dépend plus que de leur diamètre [128,130,132,133,136,138,140,143,145,146].

IV. Développement instrumental

IV.1 La SdFFF

La méthode de fractionnement par couplage flux force de sédimentation fait intervenir un champ de gravité pour la séparation des espèces. Le champ le plus simple à mettre en œuvre est celui qu'exerce la gravité terrestre (force = 1g). Cette méthode est alors nommée FFF gravitationnelle ou GFFF (Tableau 4) [150]. Elle se pratique avec l'appareillage de FFF très simple et peu onéreux (Figure I-18A). Mais, il est très difficile de moduler la valeur du champ et les temps de rétention sont parfois très longs (faible débit de phase mobile), ce qui limite l'applicabilité de la méthode [128,130,132,133,140].

La méthode proprement dite de FFF de sédimentation fait intervenir des champs multigravitationnels (force $\gg 1g$), par la mise en rotation du canal à l'intérieur d'un bol de centrifugation afin de produire des champs élevés d'intensité variable et programmable, impliquant cette fois-ci un dispositif instrumental complexe (Figures I-18B, I-19) [128,130,132,133,140].

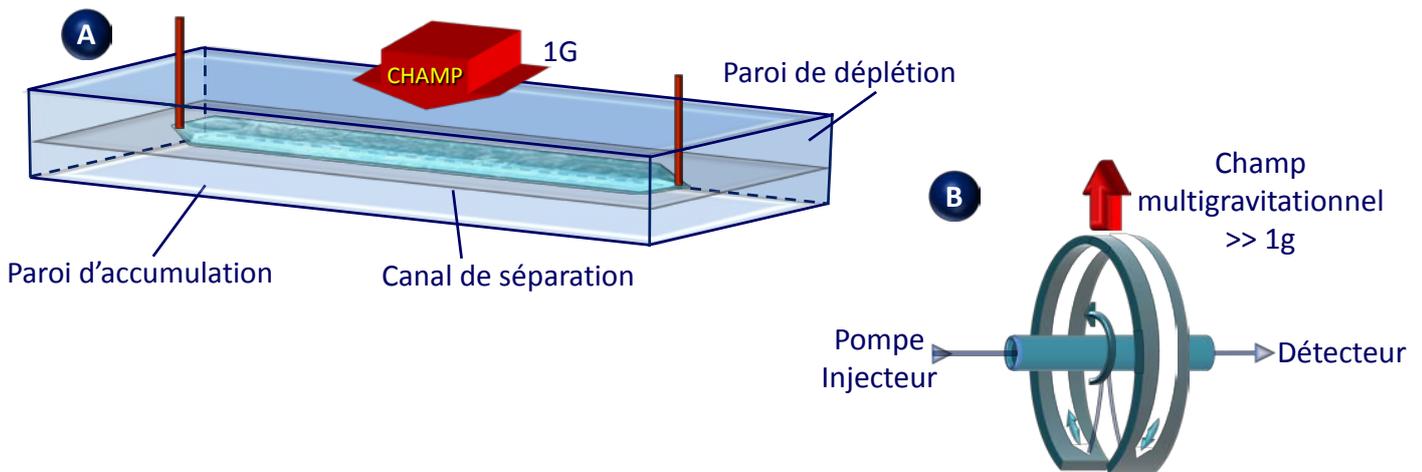


Figure I-18 : Schémas comparés des appareillages de GFFF et de SdFFF.
Schémas de la GFFF (A) et de la SdFFF (B).

La SdFFF est ainsi reconnue par la communauté scientifique comme l'une des plus efficaces et des plus polyvalentes méthodes de séparation : mise en œuvre de tous les modes d'élution, échelle des particules (50 nm – 50 / 100 μm) [128,132]. Elle est une des seules méthodes à permettre la séparation et la caractérisation des particules grâce à la connaissance précise des relations définissant l'ordre d'élution en fonction de la taille et de la densité [128,134,136]. Cependant, la diffusion de la SdFFF a été jusqu'à présent fortement limitée par le manque récurrent de matériels fiables disponibles à la commercialisation. De ce fait, en produisant ses prototypes, notre laboratoire a acquis au cours de cette dernière décennie une expérience et une place unique aux niveaux européen et mondial avec le dépôt de 2 brevets internationaux [139].

IV.2. Développement instrumental de phase-1.

La Figure I-19 représente le schéma général d'un appareil de SdFFF développé par notre laboratoire :

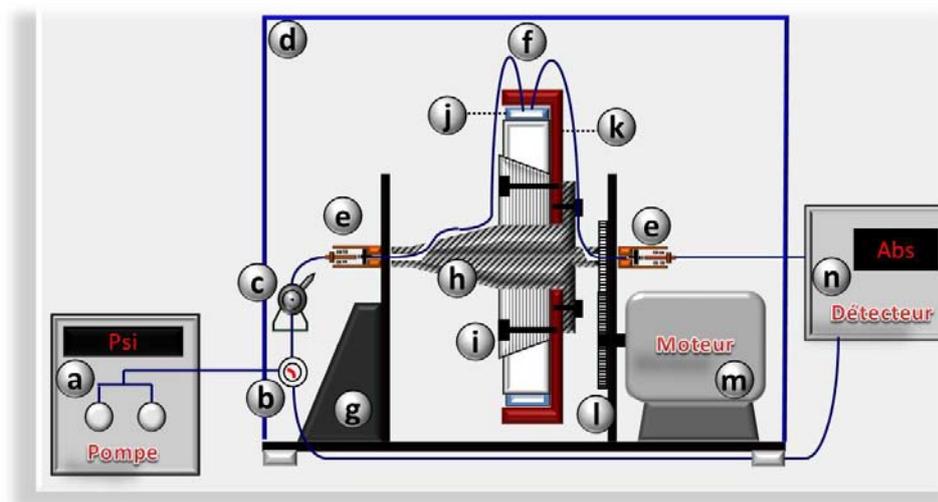


Figure I-19 : Schéma général d'un appareil de SdFFF.

a : pompe isocratique pour CLHP ; b : vanne 4 voies (relaxation / nettoyage) ; c : vanne d'injection (type Rhéodyne®) ; d : système de protection ; e : joints tournants d'entrée et de sortie ; f : tubulure Peek® d'entrée et de sortie du bol ; g : statif en aluminium ; h : rotor et bol de centrifugation ; i : système de serrage du canal ; j : système canal / contre-canal ; k : bol de centrifugation ; l : engrenages ; m : moteur électrique ; n : détecteur spectrophotométrique UV-Visible de type CLHP.

Le canal n'est plus disposé à plat mais en arc de cercle dans le bol de centrifugation (Figures I-18B et I-19). Sa mise en rotation nécessite la construction d'un appareillage complexe dont les trois parties principales [139] sont **1**) le système de rotation : création et contrôle du champ multigravitationnel = moteur électrique, système de contrôle de la vitesse de rotation (manuel ou informatisé), système de transmission par courroies ou engrenages, arbre de rotation (rotor) qui supporte le bol et les joints tournants, **2**) le bol de centrifugation : maintien constant de la géométrie du canal, prévention des fuites du canal, **3**) les joints tournants : passage de la phase mobile au travers du canal. Ils assurent la transition d'un liquide d'un système immobile (pompe, système d'injection, détecteur, collecteur) à un système en rotation. Ils supportent le maximum de stress mécanique : vitesse de rotation élevée, débit et pression de phase mobile importants. De leur qualité dépend l'absence de fuite de la phase mobile et de l'échantillon.

Les joints tournants sont la pièce maîtresse du dispositif. Le joint permet, sans fuite, le passage de la phase mobile et des échantillons entre un système immobile (pompe, injecteur, détecteur) et un système mobile (bol, canal). Les joints répondent à différentes exigences :

- faible contribution au volume mort extra-canal (tubulures PEEK®),
- facilité de maintenance,
- fiabilité et résistance.

Ce dernier point est crucial. Il dépend de la précision de montage qui est lié à la qualité d'usinage et au dessin du joint. Le but est d'obtenir la plus parfaite planéité au niveau de la zone de contact entre les joints.

Le canal est obtenu par découpe d'une feuille de Mylar® aux dimensions choisies : $L \times l \times w$ (Figure I-20) [129].

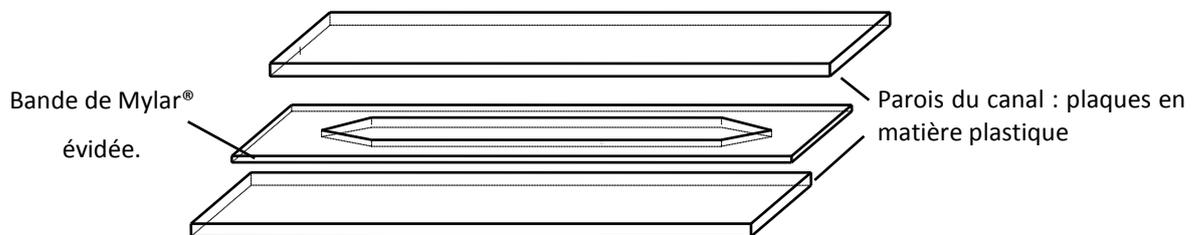


Figure I-20 : Disposition de la feuille de Mylar® entre les parois du canal.

Le canal est ensuite placé entre deux plaques de matières plastiques (polystyrène) qui constituent les parois d'accumulation et de déplétion (Figure I-21) [138].

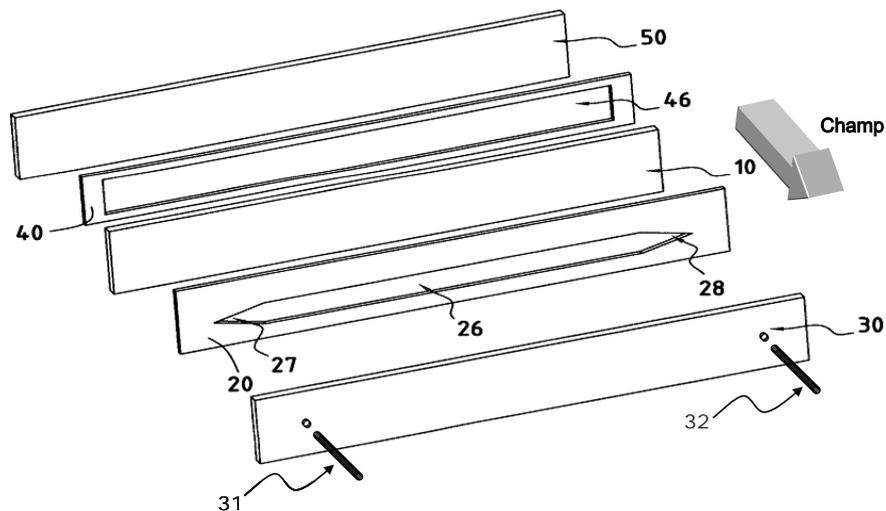


Figure I-21 : Disposition de la feuille de Mylar® entre les parois du canal.

Légendes : 20 : canal / 27-28 : pointes en V d'entrée-sortie du canal / 26 : volume du canal / 30 : paroi d'accumulation percée pour la fixation des tubulures Peek® (31 / 32) au niveau des extrémités du canal / 10 : paroi de déplétion / 40 : contre canal / 46 : volume du contre canal / 50 : paroi de serrage du contre canal (Br1).

La mise en rotation du bol génère un champ multigravitationnel perpendiculaire à la paroi du canal, champ s'exerçant vers l'extérieur du bol, de sorte que la plaque de polystyrène au contact du bol devient la paroi d'accumulation (30, Figure I-21). Des orifices sont usinés dans la paroi du bol pour le passage et la fixation des tubulures Peek® d'entrée et de sortie de la phase mobile. La fixation des tubulures est assurée par un système de serrage manuel biocompatible utilisé en chromatographie basse pression. La paroi d'accumulation est elle-même percée pour la fixation des tubulures Peek® au niveau des extrémités du canal (31-31, Figure I-21). Au contraire des autres appareillages de SdFFF, pour lesquels l'arrivée de la phase mobile et des échantillons se fait par la paroi de déplétion (Figure I-21), nos prototypes permettent l'introduction de la phase mobile directement par la paroi d'accumulation. Ceci favorise l'utilisation de procédures simplifiées, rapides et efficaces d'injection des particules microniques dites "dans le flux", annulant le temps de relaxation τ (Eq. 1) qui représente le temps mis par une particule pour rejoindre sa position d'équilibre [133,138,139].

Pour obtenir l'étanchéité, le serrage est assuré par un système conique tripartite (Figure I-22).

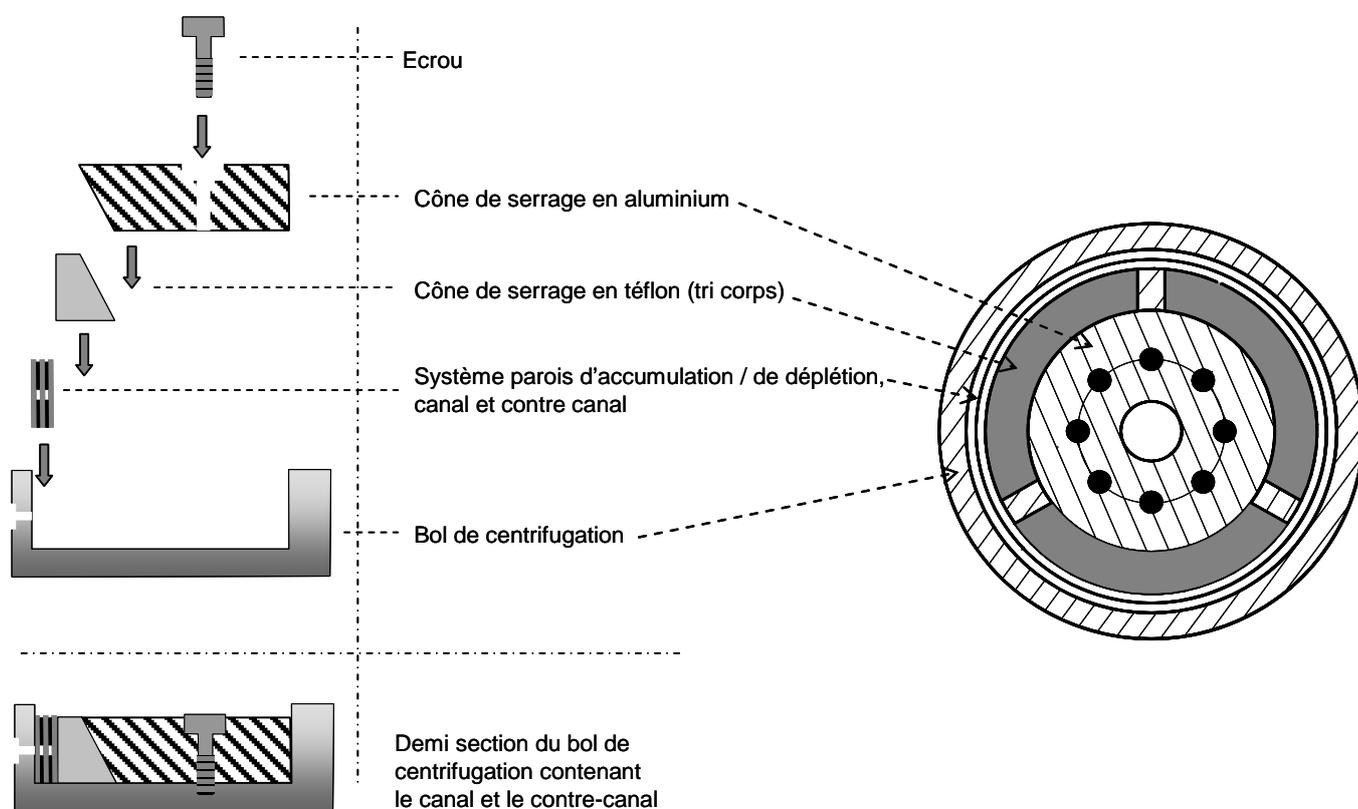


Figure I-22 : Dispositif de serrage du canal et du contre canal dans le bol de centrifugation.

Pour éviter toute fuite au niveau du canal, un serrage suffisant doit être réalisé (15 à 25 nm). Cependant, ce serrage conduit à la déformation de la paroi de déplétion vers l'intérieur du canal. La forme et le temps de rétention des pics sont alors fortement modifiés (Figures I-22, I-23).

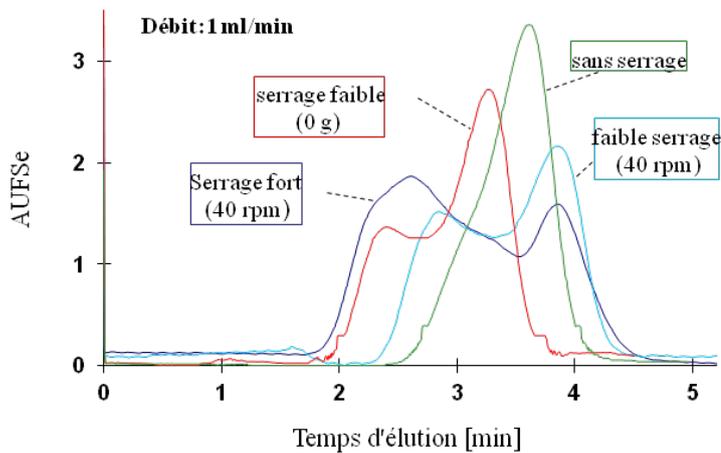


Figure I-23 : Effet du serrage sur la forme des pics du volume mort.

Pour pallier à cet inconvénient, nous avons développé une solution de contre canal (46, Figure I-21) [151]. Placé entre la paroi de déplétion et le système de serrage, il permet d'absorber la déformation liée au serrage au centre du canal, tout en transmettant la pression à l'extérieur afin d'assurer son étanchéité (Figure I-24).

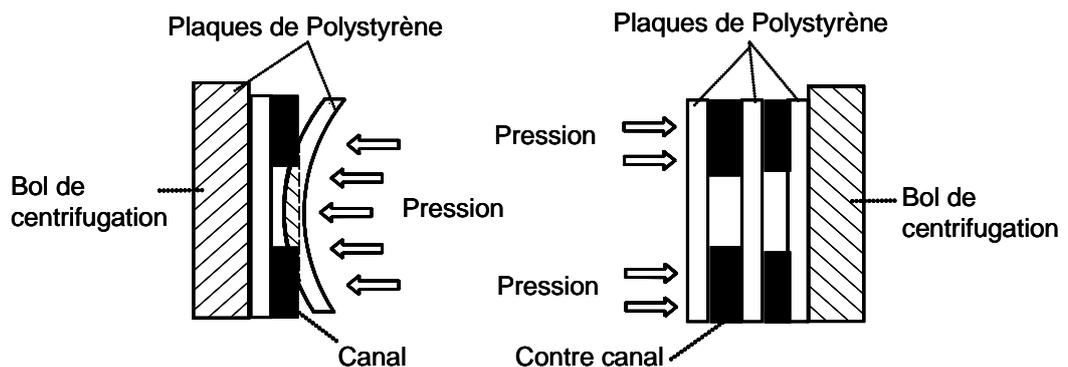


Figure I-24 : Effet du contre canal sur la répartition des forces de serrage.

A gauche en absence de contre canal, à droite en présence du dispositif.

Il a pu être établi que le contre canal devait avoir une forme parallélépipédique comme le canal (sans les pointes en V, Figure I-21) et ne pas être de plus faible largeur, mais de plus grande épaisseur que le canal [151].

L'ensemble de ces développements a permis la conception de prototypes performants, fiables, utilisés pour la séparation d'espèces microniques et sub-microniques de haute densité [133,138,152,153]. Cette phase de développement instrumental a été associée à une adaptation méthodologique pour la mise en œuvre des techniques d'analyses d'échantillons biologiques. Les enseignements recueillis au cours de cette étape de développement, ont permis la production de prototype de phase-2 [137,139] utilisés pour la mise au point des systèmes de splitt de concentration.

IV.3. Développement instrumental de phase-2

Ce nouveau prototype, dit de phase-2 (Figure I-25), a pour objectif de répondre à certaines exigences en termes [137,139]:

- de vitesse de rotation,
- de fiabilité,
- de facilité de manipulation et de maintenance.

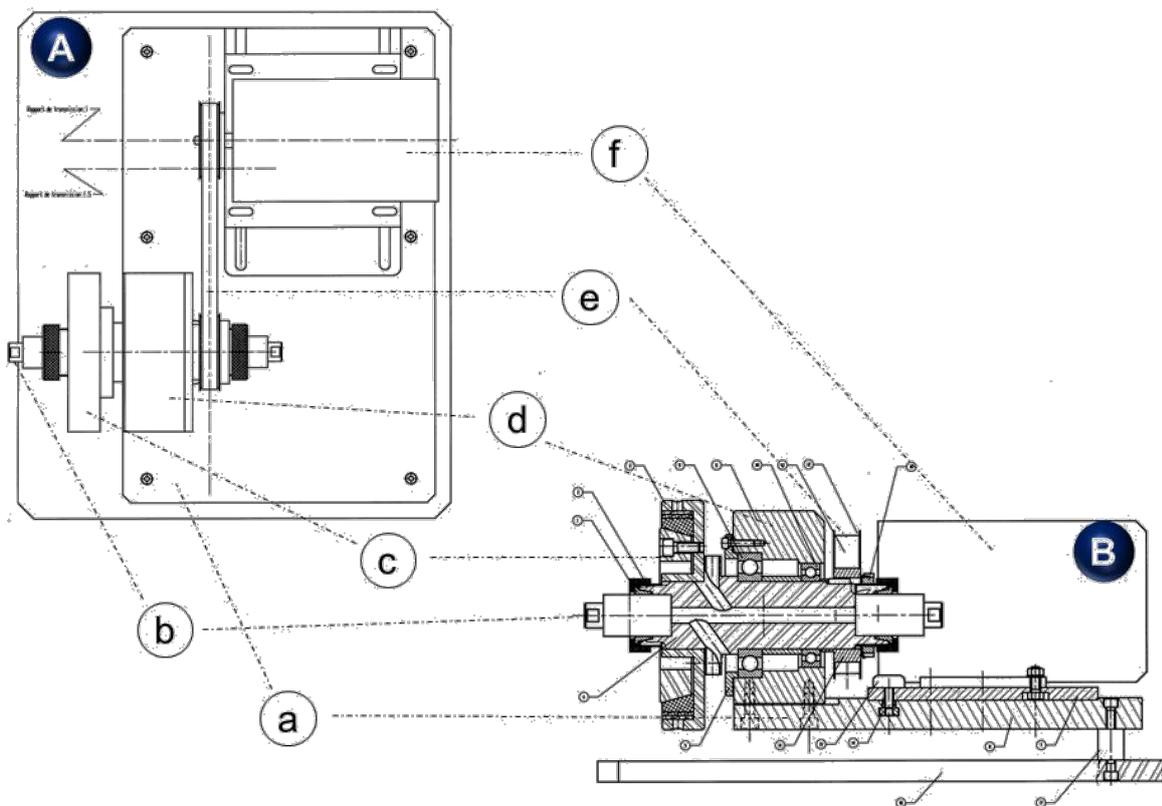


Figure I-25 : Plan du séparateur de phase-2.

Vue de dessus (A) et coupe transversale (B). a : statif en aluminium ; b : joint tournant d'entrée ; c : bol de centrifugation contenant le système de serrage du canal et le système canal-contre-canal ; d : rotor ; e : courroie et poulie ; f : moteur électrique.

Le développement analytique des applications en mode brownien concernant les espèces sub-microniques telles que les organites cellulaires, les colloïdes, les nanoparticules, les particules liposomiques vecteurs de médicaments, les poudres céramiques, nécessite la mise en œuvre de champs gravitationnels importants ($\gg 100$ g). Il en sera de même pour l'élution "inertielle" d'espèces cellulaires au cours d'applications analytiques de type monitoring ou screening sur canaux de volume mort réduit (forces inertielles élevées). Des champs gravitationnels élevés sont obtenus par des vitesses de rotation très élevées (> 1000 tours / min), ceci d'autant plus que la différence de densité phase mobile / particules est faible (cellules, organites). Par l'utilisation de débits importants, on peut alors envisager des analyses à l'échelle de la minute sans dilution excessive de l'échantillon. Ceci représente des vitesses linéaires 2 à 5 fois supérieures aux vitesses atteintes par les prototypes de phase-1. Pour ce faire, l'utilisation de nouveaux moteurs puissants, associés à un système d'entraînement par courroies crantées a été mise en œuvre. Une programmation du contrôle de la vitesse de rotation (force et variation programmées du champ au cours de l'analyse) a été développée. Cependant l'utilisation de vitesses élevées impose de nouvelles contraintes telles que le développement d'un nouveau dessin à propos :

- des joints tournants [154],
- du bol de centrifugation : masse réduite, gorge et masselottes d'équilibrage,
- de l'axe de rotation,

dans le but d'obtenir un usinage précis des pièces ainsi qu'un parfait centrage des masses. A vitesse élevée, un mauvais équilibrage des masses conduit à des vibrations nuisibles à la sécurité du manipulateur, à la fiabilité du séparateur ou à la qualité de la séparation : cavitation et sonication des échantillons cellulaires dans le canal.

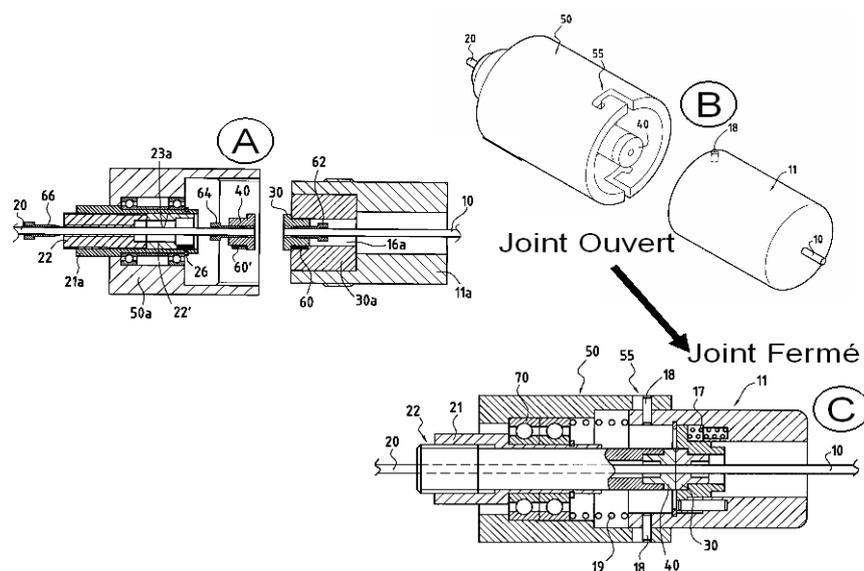


Figure I-26 : Schéma des joints tournants de phase-2 et 3

Phase 2 (A : avec filetage) et phase 3 (B, C : avec baïonnette) [d'après Brevet 2] : tubes d'entrée et de sortie (20, 10) ; semelles (parties en friction) (30, 40) ; ressort de mise en pression des joints (19) ; dispositifs de serrage manuel des tubulures (66,62) ; support d'alignement, de rotation et de mise en pression des joints dans la cage (21-23) ; roulement à bille (70) ; support joint arrière (30) ; cage (11, 50).

Pour ces nouveaux joints tournants (Figure I-26), le choix des matériaux en friction est un élément primordial de fiabilité. De même, il est impératif d'assurer une planéité parfaite de la zone de contact entre les éléments au niveau desquels se produit le passage de la phase mobile. La fiabilité de ces pièces est indispensable à la qualité de la séparation. Les pièces d'usure des joints tournants (semelles) peuvent être changées grâce **1**) au pré alignement des pièces dès leur fabrication; et **2**) à l'utilisation de joint à filetage ou à baïonnettes permettant un accès aisé et rapide aux semelles (3a, 40, Figure I-26) [154].

L'autre innovation concernant la maintenance des joints provient de leur liaison au rotor. Pour les appareils de phase-1, les extrémités du rotor sont usinées de sorte que le joint s'emboîte sur l'axe, le serrage étant assuré par un serrage sur méplat. Malheureusement, ce système de serrage entraîne un décentrage du joint et des vibrations aux fortes vitesses de rotation. Dans les appareils de phase-2, l'extrémité de l'axe est modifiée de sorte que le joint s'emboîte dans celle-ci à l'aide d'un cône de serrage en téflon, le serrage étant assuré par une bague de vissage externe (Figure I-26).

Il en est de même pour le changement du bol de centrifugation et du canal de séparation qu'il contient (géométries différentes, matériaux au contact des échantillons). La maintenance est facilitée par la liaison unique en position centrale de l'axe de rotation sur le statif (Figure I-25). Cette position centrale, au contraire du système en berceau de phase-1

permet une intervention rapide sur les joints tournants où le bol de centrifugation, sans démontage de l'axe de rotation ni de la courroie d'entraînement. Ces améliorations permettent l'utilisation de kits "joints-bol" facilement interchangeables et spécifiques à chaque applications (SdFFF préparative ou analytique).

C'est ce design de joint qui a été retenu pour la fabrication des joints double-voie mis en œuvre pour les prototypes de splitt de concentration qui sera discuté dans la partie Résultats.

V. Adaptation à l'analyse biologique

Parallèlement au développement instrumental de phase-1, la mise en œuvre d'un ensemble d'adaptations instrumentales, méthodologiques, et de procédures a convergée vers l'objectif de l'utilisation de la SdFFF comme outil de tri cellulaire [133,138]. Les méthodes de séparation permettant l'isolement et la purification de sous-populations cellulaire spécifiques à partir de matrices complexes (organes, tissus, cultures cellulaires primaires ou lignées) jouent un rôle croissant dans de nombreux domaines des sciences de la vie tels que la biologie cellulaire, la génétique moléculaire (génomique, protéomique, métabolomique...), la cellulomique, les biotechnologies, les thérapeutiques chimiques et cellulaires (cellules souches et précurseurs), ou le diagnostic clinique [132,133,135,155,156].

A la lumière des récents développements dans ce domaine, les méthodes de tri peuvent être classées en première intention selon leur échelle d'application (Figure I-27). Ainsi les applications concernant **1**) les études fonctionnelles (métabolisme, cycle cellulaire, apoptose, différenciation...), **2**) les biotechnologies, **3**) les études *in vivo*, ou **4**) les thérapies cellulaires, nécessitent la préparation à large échelle (macro-méthodes) de cellules identiques (même clone, même sous-population), présentant un haut degré de pureté, de viabilité et de stérilité. D'autre part, des micro- ou nano-technologies, basées sur les méthodes précédentes, sont des outils performants pour le diagnostic, la recherche de thérapeutiques chimiques, ou la détection d'effecteurs chimiques ou biologiques [132,133,135,155,156].

Les méthodes de séparation cellulaire peuvent être aussi classées selon la nature du principe de séparation mis en jeu (Figure I-27). La première famille de techniques met en jeu les propriétés physiques des espèces (taille, densité,...) parmi lesquelles on peut citer la centrifugation, l'élutriation, la microfluidique, ou bien la famille des méthodes de FFF. La seconde est basée sur l'affinité **1**) chimique ou immunologique : panning, chromatographie

d'affinité, cytométrie en flux (caractérisation et tri des populations : Fluorescent Activated Cell Sorting ou FACS), les aptamères; **2)** électrique : électrophorèse capillaire, diélectrophorèse (DEP) et DEP-FFF; ou **3)** magnétique (Magnetic Activated Cell Sorting ou MACS) [132,133,135,155,156].

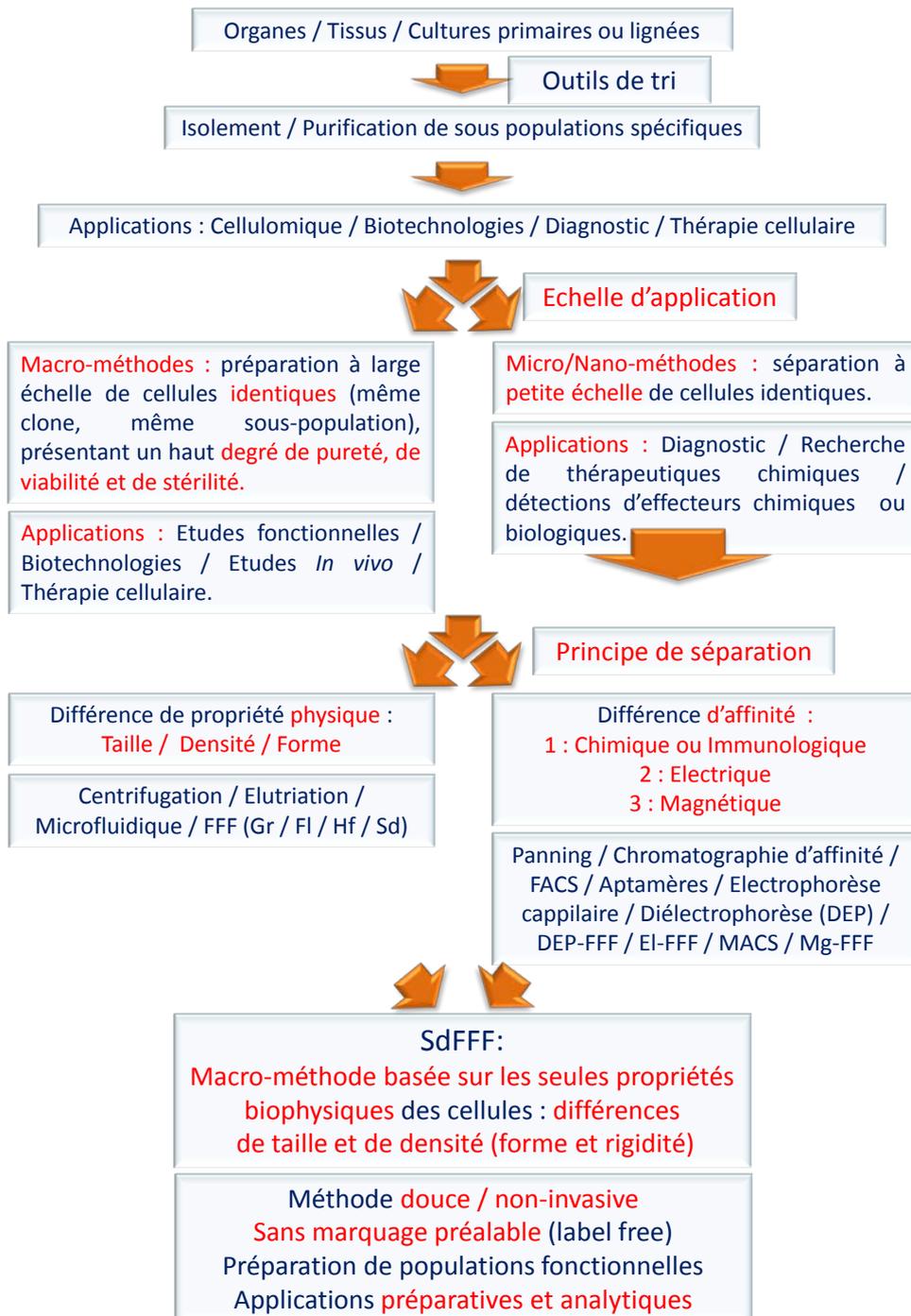


Figure I-27 : Applications et classifications des méthodes de tri cellulaire. Place et intérêts de la SdFFF.

Classiquement, les méthodes de FFF sont décrites comme des méthodes préparatives ou macro-méthodes basées sur les différences de propriétés physiques des particules telles que la taille, la densité, la forme, la rigidité (FFF hydrodynamique ou FIFFF, FFF en fibre creuse HfFFF, FFF gravitationnelle et multigravitationnelle GrFFF et SdFFF). Les FFF électriques, magnétiques ou diélectrophorétiques (MgFFF, EIFFF et DEP-FFF) mettent en jeu les propriétés électriques, magnétiques ou diélectrophorétiques des espèces. Ces dernières sont actuellement développées sous forme de micro- et nano-technologies [133].

Depuis les travaux de K. Caldwell en 1984, qui ont posé les bases du tri cellulaire par SdFFF, la FFF, la SdFFF et les techniques associées ont montré un important potentiel pour le tri et la séparation cellulaires dans le cadre d'applications biologiques majeures incluant l'hématologie, la microbiologie, la cancérologie, la biologie moléculaire, la neurologie ou les cellules souches [131,133,157,158,159,160].

Les travaux de notre laboratoire ont pu démontrer que la SdFFF, en prenant appui sur les seules propriétés biophysiques des cellules (taille, densité, forme, déformabilité ou rigidité), peut être définie comme une méthode douce, non-invasive, ne nécessitant aucun marquage préalable, permettant la préparation de populations fonctionnelles pour des applications préparatives et analytiques.

V.1. Méthodologies, instrumentation et procédures spécifiques

A l'image de l'ensemble des méthodes de tri cellulaire, la SdFFF doit respecter l'intégrité fonctionnelle de la cellule, tout en permettant la collection de fractions purifiées et stériles. A ce titre, le principal avantage de la SdFFF découle de sa capacité à limiter de façon drastique les interactions cellules / surfaces solides par **1**) l'utilisation d'un canal exempt de phase stationnaire ; et **2**) la définition de conditions d'élution (balance champ / débit) favorables à la mise en œuvre du mode Inertiel (taille / densité dépendant) [132,133,138].

Des adaptations instrumentales et méthodologiques ont été développées afin **1**) de protéger l'intégrité fonctionnelle cellulaire ; **2**) d'obtenir une séparation efficace des sous-populations, par une limitation des interactions cellules / paroi [132,133,138].

Les paramètres suivants ont été validés pour limiter ces interactions :

- matériaux constitutifs des parois du canal,
- positionnement des tubulures et mode d'injection,
- débit et composition de la phase mobile,
- force du champ externe, procédures de nettoyage et de décontamination.

a. Parois du canal et composition de la phase mobile

A l'exemple des matériaux préconisés pour les manipulations de biologie moléculaire, des plaques de polystyrène choc de 2 mm d'épaisseur sont à présent utilisées comme parois du canal [133,138,139]. Ce matériau très hydrophobe a démontré toute son efficacité (rendement > 70 %) pour des conditions courantes de tri : cellules nucléées, hématies, levures, algues, bactéries... L'utilisation de ce matériau permet de s'affranchir de l'utilisation de phases enrichies en albumine sérique, réduisant [133,138] :

- l'empoisonnement du canal,
 - les risques de contamination,
- tout en simplifiant :
- la préparation de la phase mobile,
 - les procédures de nettoyage / décontamination.

De plus, comme notre séparateur ne nécessite aucune préparation sélective de surface (dépôt d'anticorps, traitement de surface...), ceci réduit d'autant les risques d'empoisonnement du canal et simplifie, là encore, les procédures de nettoyage / décontamination.

b. La procédure d'injection

La méthode classique d'injection est dite en "arrêt de flux" [128,132,136,138]. Lorsque l'échantillon pénètre dans le canal, le champ est maintenu, mais le flux de phase mobile est stoppé pendant le temps τ (Eq. 1), temps nécessaire pour qu'il atteigne sa position d'équilibre. Ceci conduit les particules microniques au contact de la paroi d'accumulation. A la reprise du flux, elles regagnent rapidement leur position d'équilibre. Cette procédure, très efficace en termes de diminution de temps de rétention et de dispersion de bande, présente un inconvénient majeur pour les cellules où le contact avec la paroi d'accumulation induit un ensemble d'effets néfastes sur l'intégrité cellulaire, l'apoptose, le rendement et la répétabilité

de la méthode [133,138]. La procédure "dans le flux" est à cet égard bien plus intéressante. Pour maintenir un élargissement de bande et des temps de rétention similaires à la procédure "en arrêt de flux", une adaptation instrumentale consistant à l'injection de l'échantillon par la paroi d'accumulation est nécessaire (Figure I-28) [151].

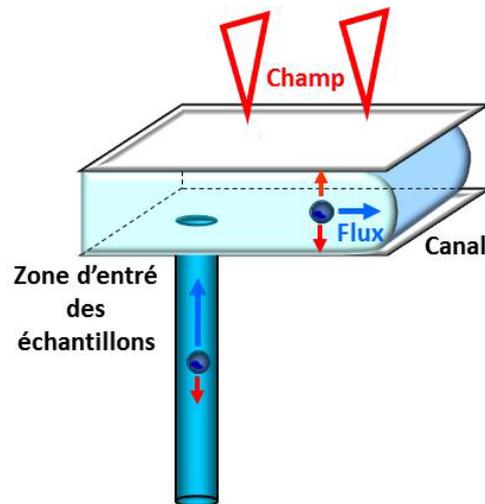


Figure I-28 : Conséquence de l'injection des échantillons par la paroi d'accumulation : effet local d'élutriation avec champ et flux opposés.

Ce dessin particulier produit à petite échelle, au moment de la pénétration des particules dans le canal, un effet semblable à celui de l'élutriation, champ et flux étant opposés et non plus perpendiculaires comme dans le reste du canal [161]. L'échantillon se trouve alors du "bon côté" du canal, il n'a plus à traverser le canal pour rejoindre sa position d'équilibre, annulant de fait la relaxation primaire de la méthode stop-flow (τ , Eq. 1), et limitant l'effet de relaxation secondaire. Cette solution réduit le temps nécessaire pour l'échantillon pour rejoindre sa position d'équilibre, préserve la sélectivité et limite l'élargissement de bande. On pourrait penser que dans ces conditions, une partie des cellules soit piégée dans les lignes de flux à plus haute vitesse du centre du canal et se retrouve éluée dans le pic de volume mort, mais l'utilisation du détecteur PN3000 XPT-C (PostNova), détecteur munie d'une caméra CCD permettant l'observation et la mesure de taille des cellules éluées du canal de SdFFF, nous a permis de vérifier l'absence d'élué de cellules dans le volume mort, validant ainsi notre modèle d'injection (Figure I-29).

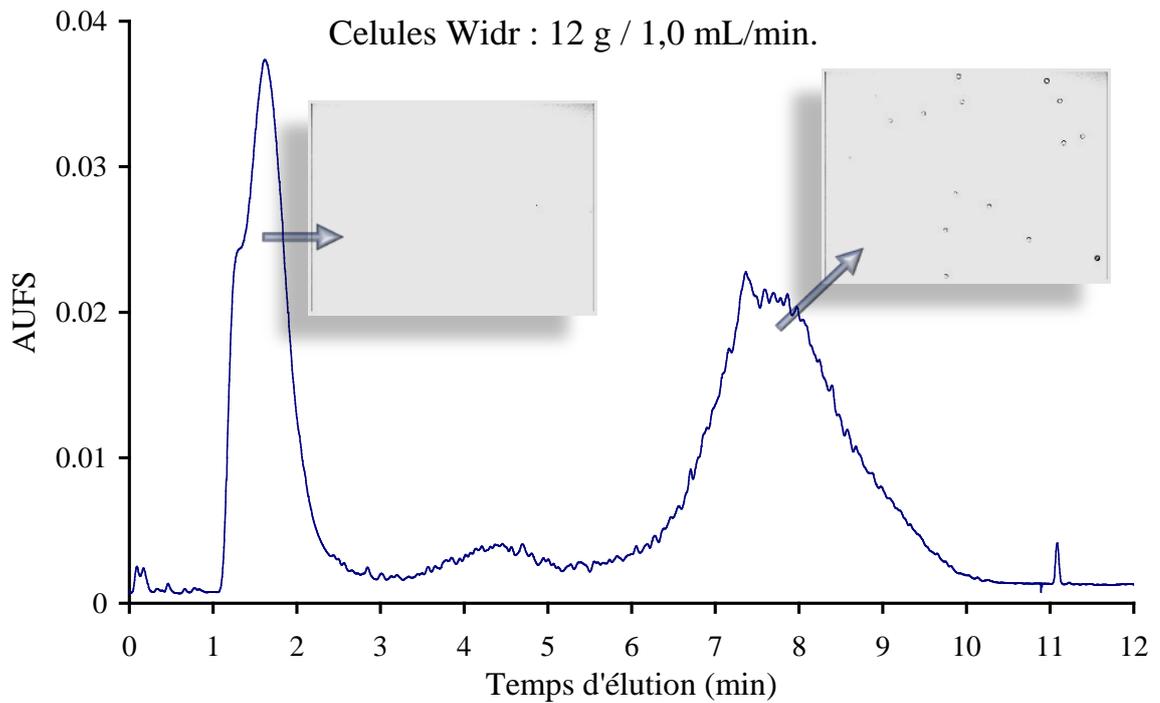


Figure I-29 : Image de l'élué cellulaire dans le volume mort / pic cellulaire.

Conditions d'élué canal 785×8×0.225 mm (parois de polystyrène), injection dans le flux de 100 μ L de d'une suspension cellulaire à $2,5 \cdot 10^6$ cellules / mL, champ : 12,0 G, débit : 1,0 mL / min (phase mobile : PBS stérile pH = 7,4), détection spectrophotométrique $\lambda = 254$ nm / Détection CCD PN-3000 XPT : taux de rafraichissement 80 ms.

c. Conditions optimales d'élué

Le mode d'élué des cellules est le mode Inertiel. Il dépend de la balance force du champ externe / forces hydrodynamiques (flux de phase mobile), afin de focaliser chaque sous-population à son point d'équilibre, occupant une fine couche de liquide dans l'épaisseur du canal située à une hauteur $\delta > a$ (Eq. 5), réduisant le risque d'interaction cellules / paroi présent dans le mode Stérique [132,133,138].

D'un point de vue historique, la FFF a été définie et utilisée comme une méthode de mesure des propriétés physiques des particules éluées, à partir des données expérimentales (R_{obs} et λ notamment) et des équations décrivant les mécanismes de rétention [128,129]. Ainsi, après une calibration adéquate (standard disponible), il est possible de mesurer la taille, la densité, le coefficient de diffusion, la charge électrique,... et leur distribution dans une population hétérogène (polydispersité). Les populations cellulaires issues de tissus, d'organes, ou les lignées d'apparence homogène, montrent une importante dispersité de taille et de densité. Le problème des populations cellulaires est l'absence de standards représentatifs en termes de distributions de taille et de densité pouvant être utilisés pour une calibration adéquate de notre dispositif [133] *A contrario*, pour ce qui concerne le tri cellulaire, la

détermination du mode d'élution pour la mesure de la distribution de taille ou de densité n'a que peu d'intérêt si celui-ci n'est pas corrélé avec l'étude de la distribution des propriétés biologiques ayant motivé la réalisation du tri [133].

Au final, même si le but principal du tri cellulaire par SdFFF n'est pas la détermination du mode d'élution des cellules, où la détermination de leur propriétés biophysiques, il reste néanmoins essentiel de démontrer que celles-ci sont éluées selon le seul mode biocompatible possible : le mode Inertiel.

Pour cela, chaque nouveau projet de tri est initié par une série d'expérimentations dont l'objectif est de déterminer les réglages optimaux de la balance champs externe / débit de phase mobile pour atteindre le mode Inertiel.

Le mode Inertiel est démontré par [133]:

- la dépendance pratique de R_{obs} (Eq. 2) aux variations du champ et du débit de phase mobile. Comme décrit précédemment, en mode Inertiel, R_{obs} est dépendant du champ, de la taille, de la densité des particules et du flux de la phase mobile (forces hydrodynamiques). Ainsi, à champ constant, si le débit de phase mobile augmente, R_{obs} augmente. A débit constant, si le champ augmente, R_{obs} diminue. Pour le mode Stérique, R_{obs} devient totalement indépendant du champ et du débit de la phase mobile. Les particules étant éluées au contact de la paroi, R_{obs} ne dépend plus que de leur diamètre. Pour chaque nouvelle analyse de populations polydisperses, une étude systématique de la variation de R_{obs} du pic d'intérêt est effectuée dans des conditions variables de champs et de débits.

- la détermination de l'élévation moyenne des particules dans la hauteur du canal "s". Selon la description du mode Inertiel, les particules sont éluées au-dessus de la paroi d'accumulation. L'équation suivante :

$$R_{obs} \approx 6 \frac{s}{w} \quad [13]$$

décrit la valeur s : distance centre de la zone de focalisation des particules / paroi d'accumulation, ce qui correspond à l'élévation moyenne des particules dans la hauteur du canal. A partir de R_{obs} , il est facile d'estimer la valeur de s . Si l'on connaît la valeur du diamètre des cellules (Coulter Counter® calibré) pour cette valeur de R_{obs} , et si $s > a$ (rayon), alors le mode Inertiel est mis en œuvre. Si $s \approx a$, alors celles-ci sont éluées au proche contact de la paroi d'accumulation. C'est un cas d'élution en mode stérique.

- un faible niveau de "relargage" cellulaire en fin d'analyse. A la fin de chaque élution, la rotation du canal est stoppée, conduisant à l'obtention d'un champ de gravité moyen = 0 g dans le canal. Il est alors possible d'observer un signal résiduel lié à la libération de cellules à partir du canal.

- la sélectivité S_d qui est la capacité à séparer deux composants d'un mélange en fonction de la taille :

$$S_d = \left| \frac{d \log(\text{tr})}{d \log(d)} \right| \quad [14]$$

S_d , par la valeur de t_r , est directement dépendante de R_{obs} , de α et λ , donc de la nature de la force mise en jeu. Pour la S_{dFFF} , S_d est en théorie voisin de 3, ce qui est remarquable. S_d est alors la pente de la droite $\log(\text{tr}) = f[\log(d)]$. En pratique, les valeurs de cette pente en mode Stérique-Inertiel sont inférieures à 1. Après calibration de la taille des particules éluées, il est facile de tracer cette droite pour avoir une preuve supplémentaire de leur élution en mode Inertiel. Cependant, par l'indisponibilité de standards correspondant au modèle cellulaire, il nous est impossible de calibrer convenablement le fractogramme pour ce type d'application. Pour tracer avec précision cette droite, il faut recueillir un nombre élevé de fractions, compte tenu de l'extrême dispersion de taille d'une population cellulaire.

Le diamètre moyen des cellules de chaque fraction est mesuré (Coulter Counter®), et l'on reconstruit alors le graphique (Figure I-30):

$$\log t_R = -S_d \cdot \log d + \log t_{R1} \quad [15]$$

La pente de cette droite ainsi construite correspond au coefficient de sélectivité apparent ou observé ($S_{d_{obs}}$), qui est proche de la valeur théorique. L'obtention d'une telle droite est un autre témoin de l'élution en mode Inertiel (coefficient de corrélation > 0,990). Cependant l'établissement de cette droite est difficile, voire impossible à réaliser pour des échantillons biologiques dont la quantité est limitée en nombre ou en volume (cellules souches par exemple).

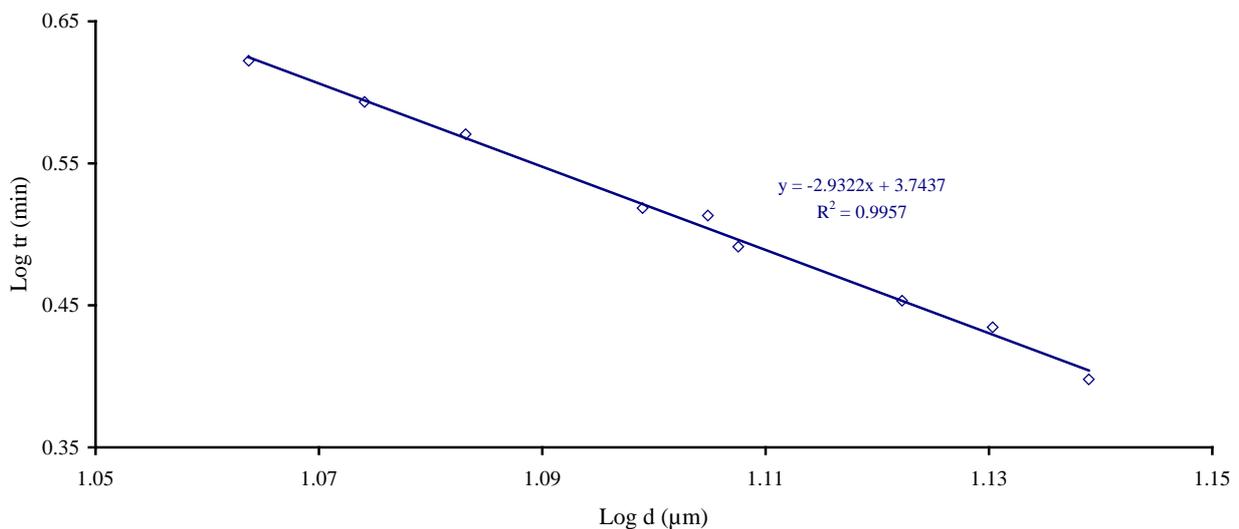


Figure I-30 : Courbe de sélectivité en taille des cellules HEL.

Conditions d'élution canal 785×10×0.125 mm (parois de polystyrène), injection dans le flux de 100 μL d'une suspension cellulaire à 2,5 10⁶ cellules / mL, champ : 40,0 G, débit : 0,5 mL / min (phase mobile : PBS stérile pH = 7,4), détection spectrophotométrique λ = 254 nm.

V.2. Respect de l'intégrité cellulaire

Après l'optimisation de l'instrumentation, des procédures et des conditions d'élution (réduction des interactions cellules / paroi ; séparation des sous-populations), la SdFFF doit faire la preuve de sa capacité à prendre en compte et à respecter les caractéristiques originelles de la population éluee.

Le tri cellulaire doit respecter [133,138]:

- la viabilité. Une viabilité importante (> 90 %), comparable à la population contrôle, est classiquement obtenue après élution (viabilité à court terme). Ceci est la preuve d'une élution optimale en absence d'obstacle mécanique sur le trajet du flux, en particulier au niveau des joints ou du détecteur. L'utilisation des sous-populations nécessitant une caractérisation ou des investigations fonctionnelles requière, le plus souvent, leur remise en culture ou leur transplantation. Dans ce cas, leur viabilité à long terme doit être maintenue sans induction non spécifique ou incontrôlée de mort cellulaire de type nécrose ou apoptose. Cet objectif est largement atteint par l'élution en mode Inertiel associée aux procédures journalières de nettoyage / décontamination,

- l'intégrité fonctionnelle telle que les capacités de croissance, les capacités d'adhésion, les propriétés phénotypiques, génotypiques, protéomiques avec l'expression des récepteurs et des antigènes de surface,

- l'état de maturation, de différenciation ou d'apoptose. La caractérisation de ces processus (voies métaboliques et de signalisation, expressions antigéniques,...), ainsi que la préparation en routine de sous-populations spécifiques requièrent une élution respectant ces états. L'utilisation de ces populations impose qu'aucun signal non spécifique d'activation, de différenciation ou d'apoptose ne soit transmis au cours de l'élution. Ainsi les populations conservent toute leur capacité de différenciation ou d'apoptose et constituent un modèle spécifique d'étude des mécanismes et de la cinétique de ces processus. Dans le cas particulier des cellules souches ou immatures, la SdFFF est une méthode douce et totalement passive en comparaison des méthodes utilisant un pré-marquage fluorescent ou magnétique des cellules. Elle est particulièrement intéressante dans les applications pour lesquelles le marquage peut interférer avec l'utilisation des cellules (culture, transplantation), ou bien si celui-ci risque d'induire une différenciation cellulaire.

- la stérilité. La culture ou la transplantation requière une absolue stérilité des échantillons. Ceci est obtenu par la préparation et la manipulation en conditions stérile des échantillons, de même que par la perfusion de l'appareillage avec des solutions stériles et le respect des procédures de nettoyage / décontamination.

V.3. Pré requis analytiques

Comme pour l'ensemble des autres méthodes séparatives et analytiques, le tri cellulaire par SdFFF doit répondre en terme de qualité aux exigences suivantes [133,138]:

- Haute répétabilité et reproductibilité. Ces critères ont été validés sur des échantillons biologiques de type hématies éluées en mode Inertiel. Concernant les cellules nucléées, le mode Inertiel permet des injections répétables du même échantillon (10-20 injections successives) auxquelles correspondent des fractogrammes similaires en termes d'intensité de signal, de profil et de temps de rétention (CV pour $R_{obs} < 5 \%$, $n = 10$). Concernant la reproductibilité, ou plus exactement la fidélité intermédiaire, malgré l'utilisation par un même opérateur, d'une même machine, mais d'échantillons (source majeur de variabilité) et de jours d'analyse différents, les fractogrammes restent similaires en tous points (CV pour $R_{obs} < 5 \%$, $n \gg 10$), permettant l'utilisation de conditions d'élution constantes pour un même type cellulaire. La variation observée sur la valeur de R_{obs} en termes de fidélité intermédiaire dépend essentiellement, pour un même type cellulaire, de la durée et des conditions de culture.

- Rendement élevé. Ce critère dépend essentiellement de la balance champ / débit utilisée pour produire le mode Inertiel. L'utilisation de faibles champs favorise la viabilité cellulaire, réduit la capture et permet un rendement d'élution couramment compris entre 75 à 80 % pour des cellules non adhérentes. Ce rendement décroît pour des cellules fortement adhérentes telles que des cellules de neuro- et glioblastome. Ceci est particulièrement sensible pour le tri de cellules rares présentes dans des échantillons biologiques complexes (cellules souches des épithéliums par exemple). La perte de rendement est due, malgré la mise en œuvre du mode Inertiel, à l'adhésion réversible ou non des cellules sur la paroi d'accumulation. La cinétique des particules dans le canal n'est pas linéaire, mais oscille toujours autour de la position d'équilibre.

V.4. Méthodologie de mise en œuvre dans le domaine biologique

a. Simplicité, rapidité et faible coût.

Le développement instrumental et la mise en place de méthodologies spécifiques ont transformé l'utilisation de cet outil.

Cette facilité d'accès se vérifie à divers niveaux :

- Mise au point analytique. Pour chaque nouveau type cellulaire étudié, l'appareillage doit être rapidement calibré pour permettre son élution en mode Inertiel.

- Elution. Le temps d'élution des échantillons est couramment compris entre 5 et 10 minutes dans les applications classiques. Ce temps de séjour limité dans le canal permet de réduire le stress cellulaire, d'autant que l'on veille à la mise en œuvre du mode Inertiel à de faibles champs et débits.

- Phase mobile. L'utilisation de matériaux hydrophobes pour les parois du canal (ex. polystyrène) permet l'utilisation de phases mobiles les plus simples : tampon phosphate stérile (PBS, pH = 7,4). La manipulation de certains tissus (épithéliums) requière parfois l'addition d'antibiotiques et d'antifongiques pour prévenir tout risque de contamination. L'addition de toute autre molécule (protéines, tensio-actifs) étant inutile, cela simplifie d'autant la préparation des phases mobiles, leur conservation et leur utilisation. Comme le canal ne requière aucune préparation de surface, ceci réduit le risque d'empoisonnement du canal, accroît l'efficacité des procédures de nettoyage / décontamination et augmente la durée de vie du canal (6-12 mois).

- Préparation de l'échantillon. L'élution requiert une suspension de cellules isolées. Celle-ci est obtenue par les méthodes classiques de récupération des cellules en culture : détachement chimico-enzymatique pour les cellules adhérentes, centrifugation pour les cellules en suspension. Dans tous les cas, les cellules isolées sont finalement resuspendues dans la phase mobile à une densité variant de 1×10^6 à 3×10^6 / mL selon la capacité du canal, pour une quantité injectée variant de 1×10^5 à 3×10^5 cellules. La concentration cellulaire est importante au regard de l'efficacité de séparation, et de la limitation des interactions cellules / cellules et cellules / phase solide.

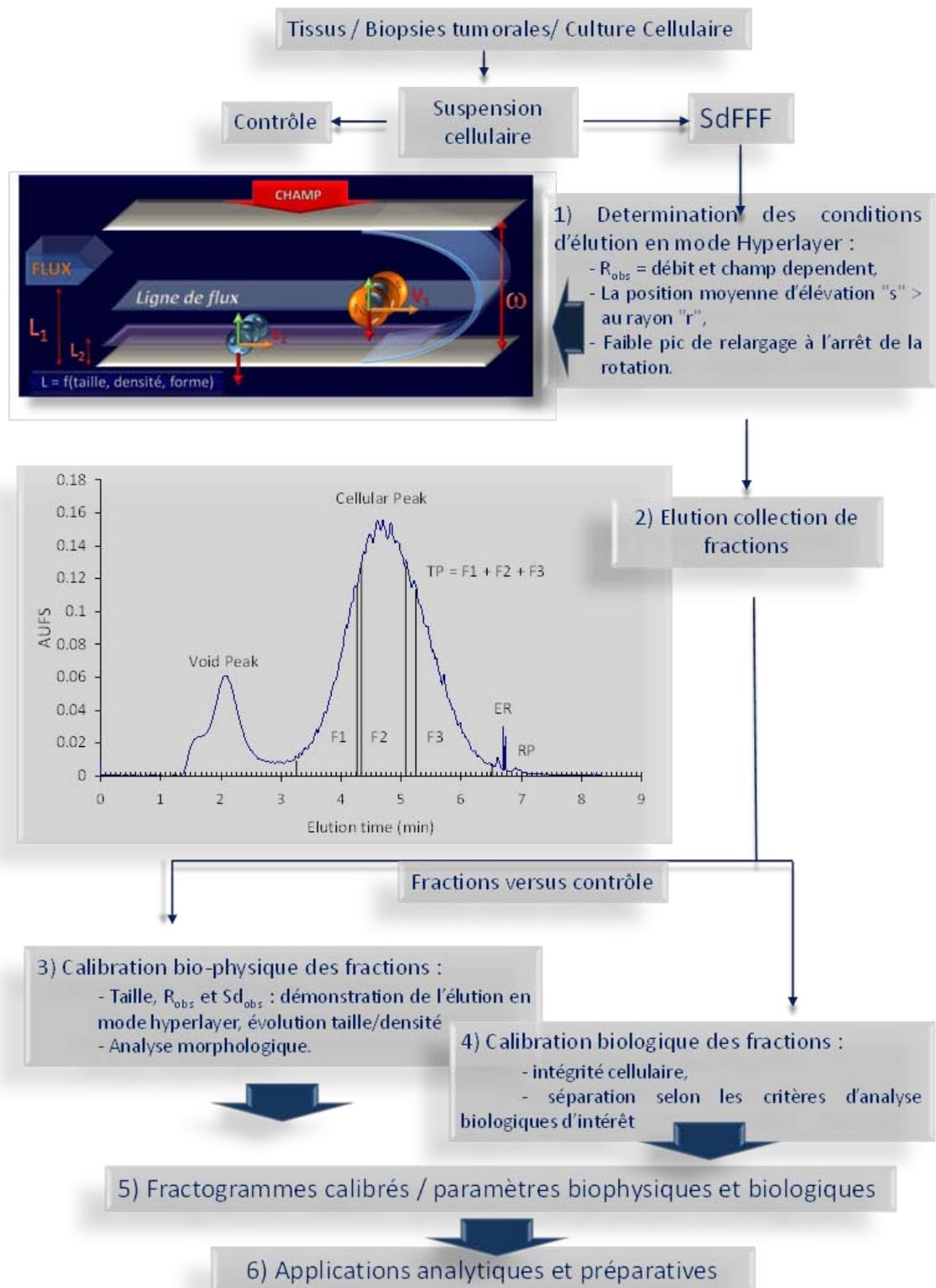


Figure I-31 : Description schématique des étapes de tri cellulaire par SdFFF.

Exemple de fractogramme. Conditions : injection dans le flux de 100 μL de cellules de CCR, WiDr, débit : 0,8 mL / min (PBS stérile pH = 7,4), champ : 8 ± 0.01 g, détection spectrophotométrique $\lambda = 254$ nm. TP et PFn représentent les fractions collectées.

b. De la collection de fraction à la calibration du fractogramme

Même la plus homogène des lignées ne peut être décrite que par l'intermédiaire d'une matrice de polydispersité physique (taille, densité, forme, rigidité,...) et biologique (activité métabolique, cycle cellulaire, ...). On obtient, en mode Inertiel, un pic large correspondant à la juxtaposition des multiples sous-populations présentes. Ce pic peut être calibré en termes de distribution de taille ou de densité par l'intermédiaire des courbes de sélectivité (Eq. 15). Cependant, en l'absence de standard équivalent aux cellules, seule la sélectivité apparente peut être mesurée. Elle suffit à la comparaison d'appareillages, de conditions d'éluion ou d'induction d'événements biologiques. La démonstration du mode Inertiel et la variation de sélectivité montrent une séparation des sous-populations selon des critères biophysiques, mais cela ne donne aucune information quant à la séparation effective selon les critères biologiques d'intérêt. Ceci justifie la collection de fractions et leur caractérisation biologique (Figure I-31) [133,138].

A l'issue de la collection de fractions, de nombreuses techniques analytiques ont été associées à la SdFFF pour caractériser les sous-populations séparées telles que **1)** culture cellulaire, analyse microscopique de la morphologie, distribution de taille; **2)** viabilité et prolifération cellulaire : test au MTT, EdU et BrdU ; **3)** caractérisations immunologiques : expression antigénique et spécificités métaboliques : test ELISA, immunofluorescence, cytométrie en flux, Western-blot, Amnys...; et **4)** biologie moléculaire : RT-PCR semi-quantitative et quantitative [133,138].

Ces études sont réalisées sur chaque fraction collectée, et les résultats comparés à ceux obtenus pour la population contrôle. Deux types de fractions sont collectées et analysées (Figure I-28) [133,138] :

- **1** : la fraction totale (PT ou pic total, Figure I-31), elle correspond à la collection de l'ensemble des cellules éluées dans le pic spécifique hors volume mort et "relargage",
- **2** : les fractions spécifiques (PFn, Figure I-31), qui représentent une part du pic d'éluion des cellules.

Ces analyses opèrent dans deux directions complémentaires :

1) le respect de l'intégrité fonctionnelle. Il est démontré par l'analyse de la mortalité à court et long terme, les propriétés d'adhésion, l'analyse morphologique, phénotypique, génotypique, l'expression antigénique, mais aussi l'état de maturation, de différenciation ou apoptotique. La fraction PT doit être en tout point similaire au contrôle. Ceci démontre que les différences entre les PFn et le contrôle ne sont dues qu'à un effet de tri et non à un quelconque

phénomène non spécifique de mortalité, de capture ou d'adhésion concernant une des sous-populations d'intérêt. La similarité entre le PT et le contrôle démontre aussi que la séparation est uniquement basée sur une différence de propriétés biophysiques tel que le décrit le mode Inertiel.

2) l'isolement des sous-populations. Ceci est déterminé par l'analyse dans chaque fraction des critères biologiques d'intérêt. Le choix des conditions de prélèvement des fractions sera validé lorsqu'il permettra l'obtention de fractions composées de cellules ayant une différence marquée par rapport à celle des autres fractions, et à la population d'origine. L'association des paramètres de rétention et la distribution des marqueurs biologiques conduisent à la définition de fractogrammes calibrés, permettant, du fait de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode, à la préparation en routine de sous-populations spécifiques.

Après avoir défini les conditions d'élutions, de collection et après calibration du fractogramme les applications de la SdFFF peuvent être envisagées selon deux directions (Figure I-31) :

1) Applications analytiques. Elles correspondent à la caractérisation fine et complète des sous-populations, conduisant au concept de cellulomique : tri physique et caractérisation des propriétés biologiques des différentes sous-populations d'intérêt constituant une population polydisperse. Ceci pouvant être réalisé aussi bien **1)** en conditions normales de culture permettant l'étude de l'écologie et des relations phénotypiques au sein des populations complexes ; que **2)** en conditions dynamiques par l'induction d'événements biologiques permettant ainsi de suivre (monitoring) et d'analyser les mécanismes et la cinétique du phénomène.

2) Applications préparatives. Celles-ci sont réservées aux canaux classiques, et permettent après calibration selon un critère biologique défini, la préparation en routine d'une grande quantité de cellules ayant les mêmes caractéristiques. Ces populations peuvent alors être utilisées comme modèles de recherche (ex: anti-cancéreux) ou comme outil de thérapie cellulaire (cellules souches et immatures).

En conclusion, la SdFFF est une technique facile de mise en œuvre, économique en comparaison des autres méthodes de tri cellulaire. Elle reste encore peu développée et diffusée (déficit d'appareillage). D'autre part, comme la SdFFF met en œuvre les seules propriétés biophysiques de l'échantillon (pas de marquage nécessaire), que l'élution est rapide (< 10 min), que les conditions d'élution sont facilement et rapidement déterminées pour

chaque nouveau problème de séparation, elle paraît mieux adaptée que de nombreuses autres méthodes pour la production de sous-populations purifiées, stériles, viables et utilisables.

VI. Applications de la SdFFF au tri cellulaire

Parmi l'ensemble des sous techniques de FFF, la SdFFF est rapidement devenue l'une des méthodes pionnières dans de nombreux domaines, en particulier celui du tri cellulaire depuis les travaux fondateurs de Karin Caldwell [143,162]. Le champ d'application princeps du tri par SdFFF, et surtout par GFFF, a été celui de l'hématologie : caractérisation des sous-populations, suivi de pathologies, de transfusions, isolement de cellules souches hématopoïétiques [133,138,161]. La SdFFF et les techniques associées présentent un fort potentiel de tri cellulaire concernant de nombreux autres domaines : microbiologie, biologie moléculaire, biotechnologies ou cancérologie [133,138,161]. Par ces développements technologiques et méthodologiques, notre laboratoire participe à cette dynamique par le développement de nouveaux champs d'investigation en neurosciences, cancérologie et cellules souches [133,138,161].

Au cours de ces dernières années les travaux du laboratoire ont permis de développer et proposer un ensemble de méthodologies afin d'utiliser les capacités de la SdFFF dans le domaine de l'oncologie (Figure I-32). Ceci se décline en différents points. Les premiers concernent l'étude de l'induction chimique des phénomènes d'apoptose, de différenciation ou d'autophagie (voies complémentaires de thérapies anti-cancéreuses) : **1)** suivi de l'événement biologique induit (monitoring et screening) [132,133,137,139,163,164,165] ; **2)** isolement de sous-populations d'intérêt : cellules pré-apoptotiques / cellules en voie de différenciation / cellules autophagiques [132,133,139,163,166,167,168] ; **3)** étude de la cinétique de l'événement biologique [132,133,137,139,163,166,168]. Les seconds concernent ; **4)** l'étude de la dynamique phénotypique de populations complexes [166,169,170] ; et **5)** l'isolement des cellules souches cancéreuses [169,170,171].

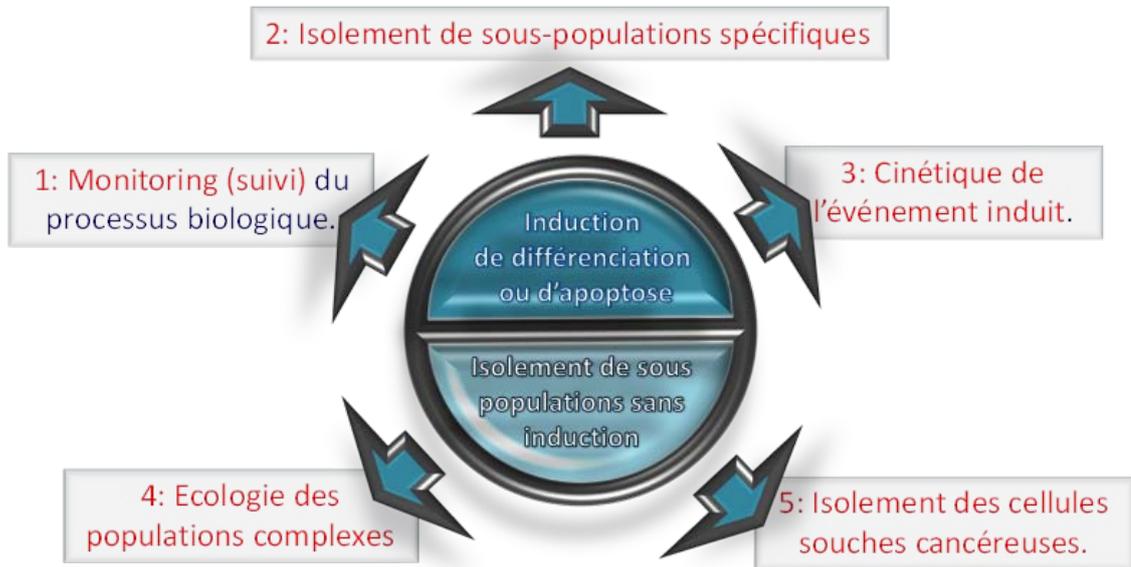


Figure I-32 : Stratégies d'utilisation de la SdFFF en oncologie.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'implication des CIC dans l'émergence et la récurrence tumorales ne fait actuellement plus aucun doute. Bien que ces cellules suscitent un intérêt grandissant dans la communauté scientifique, des travaux visant à améliorer leur caractérisation, à comprendre leur fonctionnement et à développer des thérapies ciblées peinent à émerger. De plus, ces études ne peuvent être envisagées qu'après avoir enrichi les populations étudiées en CIC, leur nombre étant relativement faible. Ainsi, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au développement et à l'utilisation de nouvelles approches de caractérisation et d'isolement des CIC dans le CCR en utilisant entre autres la SdFFF, une technique « Label free » permettant de s'affranchir des immuno-marquages.

La principale partie de ce travail a consisté à développer l'enrichissement en CIC par SdFFF et à caractériser des cellules triées *in vitro*. Cette étude a permis un enrichissement significatif en CIC à partir de différentes lignées de CCR. Cet enrichissement a été vérifié *in vitro* par l'analyse de l'expression des marqueurs de CIC et par différents tests fonctionnels.

Dans un deuxième temps, l'analyse de l'enrichissement a été réalisée *ex ovo* par la technique de la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet (CAM) et *in vivo* par la réalisation de greffes sous-cutanées et orthotopiques (en intra-caecale) chez la souris SCID. La capacité de ces cellules à initier des tumeurs a été confirmée par les résultats préliminaires obtenus sur ces différents modèles.

En parallèle de l'isolement par SdFFF, l'enrichissement en cellules ayant les caractéristiques des CIC a été effectué à l'aide d'un milieu spécifique développé par la société Oncomedics. Ce milieu permet la formation de structures semblables à des colosphères enrichies en cellules ayant les caractéristiques de cellules indifférenciées.

Dans une deuxième partie, le développement d'un nouvel outil instrumental de tri par SdFFF a porté sur l'utilisation d'un split de concentration permettant, de la même manière, un enrichissement en CIC. Cette technique est plus adaptée à l'analyse biologique et au couplage à d'autres techniques : une lame séparatrice, Splitt, a été implantée en fin de canal afin d'éliminer le liquide excédentaire responsable de la dilution importante des cellules en sortie de tri. Ce split de concentration a permis la concentration des cellules et ce, sans modifications de celles-ci avec un tri effectif.

Enfin, dans une troisième partie de la thèse, nous avons mené une étude sur l'effet de nanoparticules sur les cellules, effet « monitoré » par FFF. En collaboration avec le laboratoire LCABIE CNRS UMR5254 de l'Université de Pau, nous nous sommes intéressés aux effets biologiques de nanotubes de carbone, nouveaux nanomatériaux suscitant un intérêt croissant dans de nombreux domaines dont la santé, sur des cellules de CCR. L'hypothèse de travail s'est basée sur le très faible diamètre de ces nanotubes qui pourraient alors pénétrer dans les cellules. Cependant, très peu d'études sont menées actuellement quant à la toxicité des nanotubes de carbone sur les cellules humaines.

RESULTATS

A. Isolement par SdFFF et caractérisation des cellules initiant le CCR

I. ARTICLE 1 : Isolement par SdFFF et caractérisation *in vitro*

Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation

Carole Mélin, Aurélie Perraud, Hussein Akil, Marie-Odile Jauberteau, Philippe Cardot, Muriel Mathonnet, and Serge Battu.

Analytical Chemistry (2012)

(Vol 84, p. 1549-1536)

Récemment les cellules initiant le cancer (CIC) ayant les caractéristiques de cellules indifférenciées ont été identifiées dans un certain nombre de modèles dont le cancer colorectal (CCR). Cette hypothèse de CIC tend à expliquer le phénomène d'échappement thérapeutique des tumeurs ainsi que les mécanismes de récurrence tumorale. Le caractère indifférencié et l'auto-renouvellement sont les critères majeurs de ces cellules. Ces deux caractéristiques conditionnent notamment l'agressivité cellulaire. Ces CIC représentent maintenant de nouvelles cibles thérapeutiques, nécessitant par conséquent le développement de méthodes de tri cellulaire non invasives.

Dans cette étude, nous avons utilisé la SdFFF pour préparer des populations enrichies en CIC à partir de huit lignées cellulaires de CCR. Ces fractions triées ont ensuite été analysées pour leur état de différenciation à l'aide d'un panel de marqueurs (CD44, EpCAM, CD166 et CK20) et par des tests fonctionnels. Les résultats suggèrent un enrichissement en CIC permis par la SdFFF et ce, quel que soit leur état d'activation, qu'elles soient quiescentes ou proliférantes.

L'initiation et le développement tumoral dans le cadre du CCR sont basés sur l'existence de CIC, responsables de la croissance tumorale, de la récurrence et la résistance des tumeurs. Cependant, leur taux au sein de la masse tumorale reste faible et l'absence de marqueurs phénotypiques bien définis rendent leur étude difficiles.

La SdFFF permet ainsi l'enrichissement en CIC en mode Hyperlayer pour huit lignées de CCR (Caco2, WiDr, HT-29, HCT116, SW480, DLD1, SW620 et Colo205). Ces CIC surexpriment les marqueurs CD44, EpCAM et CD166 suggérant un enrichissement d'un facteur 10, voire plus, par rapport à la population initiale. A l'exception de la lignée HCT116, les CIC sont éluées dans la dernière fraction (F3) correspondant aux cellules les plus petites et les plus denses. Comme démontré dans la lignée WiDr, cette population correspond à des cellules relativement quiescentes (bloquées en G0/G1 du cycle cellulaire) et possèdent la capacité d'auto-renouvellement confirmée par des tests de clonogénicité. Cependant, contre toute attente, dans la lignée HCT116, les cellules ayant un caractère indifférencié exprimant le panel des marqueurs spécifiques des CIC sont éluées précocement dans la première fraction (F1) correspondant aux cellules les plus grosses et les moins denses. Ainsi, les cellules de la F1 des HCT116 ne montrent pas de blocage dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire et sont aptes à s'auto-renouveler de façon plus importante que les cellules en F3 de cette même lignée. Ces résultats suggèrent l'existence de deux pools distincts de CIC, un pool de cellules quiescentes permettant le maintien de la population (illustré par la F3 des WiDr) et un pool de cellules proliférantes probablement responsables de la croissance tumorale (illustré par la F1 des HCT116) comme précédemment démontré dans la littérature [172,173].

Cette première étude a permis de valider la SdFFF comme outil d'enrichissement de CIC issues de CCR, correspondant à de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette production de fractions enrichies en CIC permettra ainsi l'analyse de leur potentiel tumorigénique et de leur résistance aux traitements.

II. ARTICLE 2 : Etude de la capacité tumorigénique des différentes populations issues de SdFFF sur le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet

Developping of a new model of colorectal cancer stem cells carcinoma *ex ovo*, using the chick embryo chorioallantoic membrane.

Carole Mélin, Aurélie Perraud, Serge Battu, Marie-Odile Jauberteau and Muriel Mathonnet.

Nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence la capacité de la SdFFF à trier les CIC au sein de différentes lignées de CCR. Ces CIC possèdent les mêmes propriétés que les cellules souches c'est-à-dire le caractère indifférencié et la capacité d'auto-renouvellement. Une autre de leurs principales caractéristiques réside dans leur capacité à initier des tumeurs chez l'animal immunodéprimé, s'inscrivant dans la suite de nos études. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la capacité des populations enrichies en CIC à initier une tumeur sur un modèle particulier : la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet (CAM). Cette approche d'analyse de l'initiation tumorale présente de nombreux avantages : peu onéreux, facilement manipulable, n'induisant pas de réponse immunitaire et offrant la possibilité d'un suivi de l'évolution tumorale aisé.

Au cours de cette étude, les lignées d'intérêt, WiDr et HCT116, ont été triées par SdFFF et analysées pour leur capacité à initier une tumeur sur la CAM. Pour ce faire, une étape préalable de culture en Matrigel a été nécessaire. En effet, afin de favoriser la prise de la greffe et l'initiation tumorale, les cellules triées ont été « piégées » dans le Matrigel, correspondant à un milieu semi-solide composé de l'ensemble des éléments constitutifs de la matrice extra-cellulaire, afin de favoriser leur culture en 3D et donc l'interaction cellulaire indispensable à la formation tumorale. Les colonies cellulaires ainsi obtenues en Matrigel ont pu être récupérées et greffées directement sur la CAM. Trois jours après greffe, des masses tumorales ont pu être observées de manière systématique et ce, quelle que soit la lignée ou la fraction greffées. Les masses tumorales ont été prélevées, analysées par histologie et immunohistochimie afin de mieux comprendre le comportement de celles-ci et l'influence des CIC dans l'initiation tumorale.

Authors: Carole Mélin^{1,2 §}, Aurélie Perraud^{1,2,3 §}, Serge Battu^{1,2,4 *}, Marie-Odile Jauberteau^{1,2} and Muriel Mathonnet^{1,2,3}.

Addresses:

1: Université de Limoges, Laboratoire EA 3842, Homéostasie cellulaire et Pathologies, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges cedex, France.

2: Université de Limoges, Institut Fédératif de Recherche 145 GEIST « Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques », France.

3: CHU de Limoges, Service de chirurgie digestive générale et endocrinienne, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges cedex, France.

4: Université de Limoges, Laboratoire de Chimie Analytique et Chromatologie, EA 3842, “Homéostasie Cellulaire et Pathologies”, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

§ Equal contribution to these two authors

*To whom correspondence should be addressed:

Serge Battu, tel: + 33 555 435 979, mail: serge.battu@unilim.fr

Fundings: This work was supported by Conseil Régional du Limousin. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Key words: cancer stem cells, colorectal cancer, cell sorting, sedimentation field flow fractionation, chorioallantoic membrane.

Afin de poursuivre la caractérisation des CIC, il était indispensable d'analyser leur capacité à initier des tumeurs sur la CAM. Les lignées WiDr et HCT116 ont été triées par SdFFF, cultivées en Matrigel durant 30 jours et les colonies ont été greffées sur la CAM. Les travaux antérieurs [171] ont montré la présence des CIC au sein de la F3 dans le cas des WiDr, caractéristique partagée par la plupart des lignées de CCR analysées. A l'inverse et de façon surprenante, les CIC issues de la lignée HCT116 sont retrouvées dans la F1. Ce résultat original peut être expliqué par le fait qu'il existe des CIC quiescentes et des CIC actives [172] pouvant présenter des différences en termes de taille et de densité, propriétés utilisées pour le tri par SdFFF.

Les résultats obtenus à l'aide du modèle de la CAM confirment cette hypothèse : les CIC retrouvées dans la F3 pour les WiDr sont des cellules possédant une faible prolifération avec une faible expression du Ki-67 ; alors que les CIC retrouvées dans la F1 pour les HCT116 sont capables de réaliser une prolifération active présentant une forte expression du Ki-67. Ces données préliminaires confirment l'hypothèse impliquant l'existence de CIC activées (pour les HCT116) et quiescentes (pour les WiDr).

L'étude par IHC de l'expression du CK20 révèle un marquage positif pour les WiDr et négatif pour les HCT116. Cette hétérogénéité est également retrouvée chez les CCR de patients humains [180] suggérant des caractéristiques différentes pour les 2 lignées étudiées, pourtant issues de stades de CCR comparables, en l'occurrence des stades précoces.

En conclusion, le modèle de la CAM a permis de confirmer notre hypothèse quant à l'existence de CSC quiescentes et activées. Il s'agit d'un modèle simple à mettre en œuvre, rapide, permettant l'obtention de tumeurs facilement accessibles à partir desquelles il sera intéressant d'analyser la vascularisation tumorale et enfin la réponse des masses tumorales à différentes thérapies. De plus, le couplage isolement par SdFFF - culture en Matrigel - greffe sur la CAM a permis de comparer de façon effective différentes sous-populations correspondant à différents stades de différenciation. Cependant, ce modèle reste restreint dans le temps puisque les études ne peuvent pas être menées au-delà de l'ED17, et ne reproduit pas l'environnement initial du développement du CCR.

Aussi, le modèle *in vivo* à l'aide des souris SCID permet l'étude du développement du CCR dans le temps mais aussi la possibilité d'effectuer des tests de molécules anti-cancéreuses pour rechercher de nouveaux traitements thérapeutiques.

III. Etude de la capacité tumorigénique des différentes populations issues de SdFFF chez la souris SCID

III. 1. Introduction

L'hypothèse la plus répandue actuellement quant à l'initiation et au développement tumoral correspond à l'existence de cellules possédant un caractère indifférencié ayant la capacité d'initier la tumeur [10,96]. Afin de comprendre le comportement de ces cellules au sein même de la tumeur, il est désormais important de développer des modèles se rapprochant le plus possible des tumeurs chez le patient atteint d'un CCR.

L'initiation et la croissance tumorales dépendent largement du micro-environnement tumoral. Les études menées actuellement chez la souris SCID se basent essentiellement sur des greffes de fragments tissulaires issus de patients [77,126,181]. Les modèles d'injection de cellules en suspension se révèlent plus rares, alors que ceux-ci présentent l'avantage d'être restreints à une lignée cellulaire voire, comme dans notre cas, à certaines fractions cellulaires [174], possédant une reproductibilité plus importante.

La SdFFF est désormais une technique validée de tri cellulaire permettant l'obtention de populations homogènes à partir de lignées cellulaires [133,166,171]. Nos précédents travaux ont permis l'obtention de populations enrichies en CIC à partir de différentes lignées de CCR [171]. Leur caractérisation a été préalablement effectuée *in vitro* mais il reste désormais à analyser leur capacité à initier une tumeur *in vivo*. A partir de ce constat, les différentes populations d'intérêt après tri par SdFFF ont été greffées chez la souris SCID selon deux modèles :

- Par greffe sous-cutanée au niveau de la patte arrière droite. Ce modèle de greffe est largement utilisé et a permis dans de nombreuses études antérieures de suivre le développement tumoral de cellules ou fragments de tumeurs issues de CCR [68,182,183,184,185,186,187].
- Par greffe orthotopique au niveau de la paroi du caecum. Ce type de greffe correspond à l'injection des cellules dans la région caecale, offrant aux cellules un environnement colique [175,188,189].

Le but de cette étude a été d'une part d'analyser le comportement des tumeurs au niveau macroscopique afin de pouvoir comparer le pouvoir initiateur de tumeur issues des différentes fractions injectées des lignées WiDr et HCT116, dont les CIC semblent posséder des

caractéristiques différentes et, d'autre part de mieux comprendre le comportement des cellules au sein même de la tumeur (analyse histologique et marquages immunohistochimiques).

III.2. Matériel et méthodes

a. Culture cellulaire et tri par SdFFF

Les lignées humaines de CCR, WiDr et HCT116, ont été obtenues par l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, U.S.A.) et maintenues en culture selon leurs recommandations à 37 °C en atmosphère humide à 5% de CO₂ et passées à subconfluence. Les suspensions cellulaires ont été obtenues par incubation avec de la trypsine à 0,5% pendant 5 minutes et 5 minutes de centrifugation à 1500 rpm. Les cellules ont ensuite été triées par SdFFF comme décrit précédemment [171]. Différentes fractions ont été récoltées : F1, F3 et le pic total (PT).

b. Modèles de greffes chez la souris SCID

Les souris SCID (Charles Rivers) ont été greffées à l'âge de 5 semaines avec des cellules non triées ou avec les populations obtenues par SdFFF selon deux modèles. L'ensemble des manipulations ont été réalisées sous hotte à flux laminaire.

Le premier correspond à une greffe en position sous-cutanée. Après remise en suspension et comptage, $5 \cdot 10^5$ cellules sont remises en suspension dans un volume de 20 à 30 µl de PBS. Après anesthésie des souris SCID (Charles Rivers) avec un mélange de Kétamine (10mg/ml ; Imagen 1000 ®) et de Xylazine (4mg/ml ; Rompun 2%) dilué dans du sérum physiologique, la suspension cellulaire a été injectée en sous-cutané au niveau de la patte arrière droite de la souris.

Le second modèle correspond à une greffe en position orthotopique dans la paroi du caecum de la souris. Après anesthésie de l'animal avec le mélange Kétamine / Xylazine, une incision au niveau ventral inférieur gauche a été réalisée, dans la peau puis dans le péritoine. Le caecum a été alors retiré hors de l'abdomen. L'injection de la suspension cellulaire a été réalisée dans l'épaisseur de la paroi caecale à l'aide d'une aiguille à insuline. Le caecum a ensuite été délicatement replacé, et l'animal recousu à l'aide de fil opératoire stérile résorbable au niveau du péritoine puis de la peau. La souris a alors reçu une injection intrapéritonéale supplémentaire d'antalgique (Temgesic 1,5 µg/ml/g) et d'antibiotique (Amoxicilline ou Clamoxyl à 5 µg/ml/g).

Le suivi des souris a été effectué quotidiennement par observation de l'état général de la souris et palpations.

Les souris greffées aussi bien en position sous-cutanée qu'intra-caecale ont été sacrifiées 5 semaines après greffe. Après exsanguination de l'animal, les organes (caecum, intestins, nœuds lymphatiques, rate, foie, reins et poumons) et les tumeurs ont été prélevés (Registry of Industrial Toxicology Animal-data).

c. Analyses histologiques et immunohistochimiques

Les organes et tumeurs ont été fixés dans du formol (10%) avant de subir des cycles de déshydratation et être inclus en paraffine (Département d'anatomopathologie, CHU, Limoges). Après l'inclusion en paraffine, des sections de 4µm ont été effectuées et maintenues à 37°C pendant une nuit pour analyses histologique (HES) et immunohistologiques selon les protocoles décrits précédemment.

III.3. Résultats

a. Greffes hétérotopiques : modèle d'injection sous-cutanée

Afin de poursuivre notre travail portant sur les CIC, nous nous sommes intéressés au pouvoir tumorigénique des différentes fractions obtenues par SdFFF, comme décrit précédemment [171]. Ainsi, le modèle de greffe en sous-cutanée a été mis en place permettant un suivi aisé de l'initiation et du développement tumoral.

Après tri par SdFFF de la lignée WiDr selon les conditions d'élution décrites précédemment, les fractions F1 et F3 ont été récoltées et injectées en sous-cutanée (5.10^5 cellules par fraction) dans la patte arrière droite des souris SCID. Les résultats sont illustrés dans la Figure R-1.

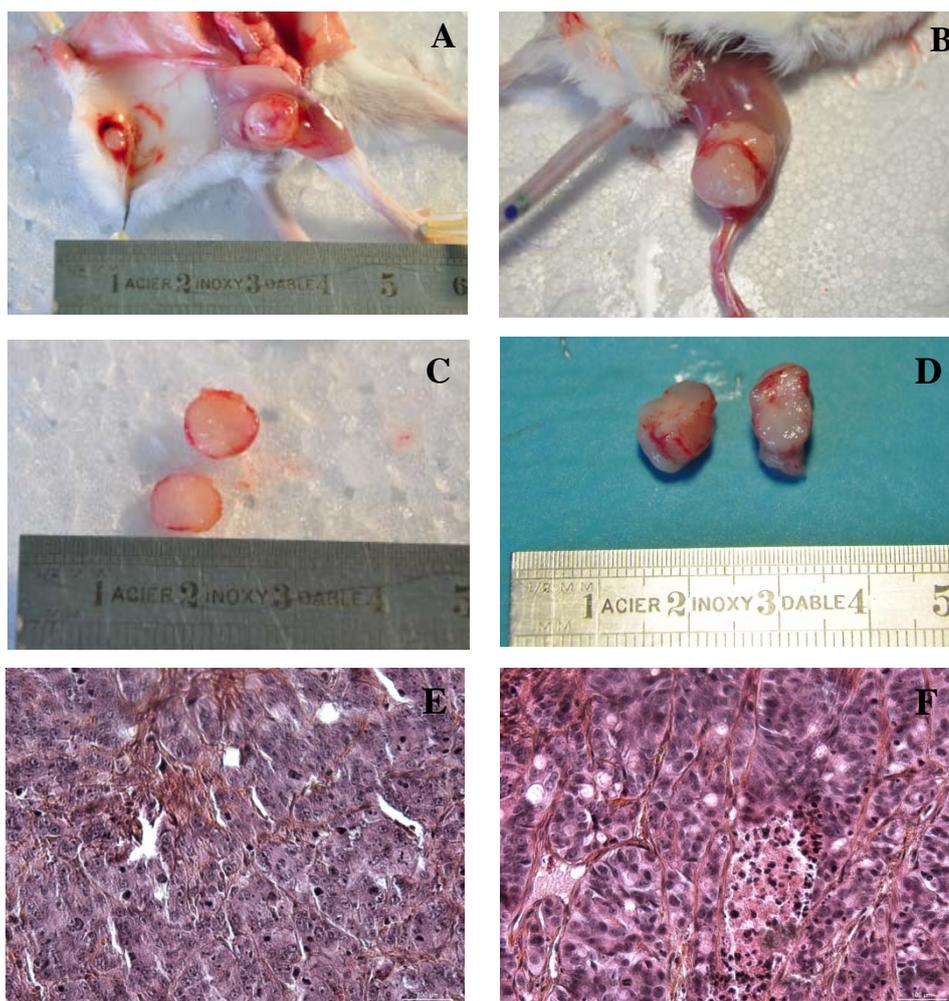


Figure R-1 : Photographies de tumeurs obtenues après greffe des fractions de WiDr obtenues par SdFFF sur souris SCID.

A et B : vue de la patte des animaux sacrifiés (avant récupération de la tumeur) pour la greffe de la F1(A) et de la F3 (B) ; C (F1) et D (F3) : tumeurs récupérées ; E (F1) et F (F3) : coloration HES des tumeurs (grossissement x400).

Il a ainsi pu être observé un développement tumoral plus important de la tumeur issue de la fraction F3 (Figure R-1 B et D) par rapport à celle issue de la fraction F1 des WiDr (Figure R-1 A et C).

Dans le cas de la F1, un second site néoplasique est observé au niveau sous-cutané (Figure R-1 A), caractéristique d'une tumeur multi-focale, avec la masse la plus importante d'un diamètre de 8 mm (Figure R-1 C). Lors de la séparation par coupure au scalpel de la tumeur, une résistance a aussi été constatée et la principale masse tumorale n'a pas présenté de vascularisation interne visible à l'œil nu (Figure R-1 C).

En ce qui concerne la tumeur issue de la F3, la consistance tumorale était semblable à la tumeur précédente. Comme pour la souris correspondant à l'injection de la F1, le processus néoplasique s'était fait au détriment du tissu musculaire (Figure R-1 B). De façon remarquable, la tumeur faisait 12 mm de diamètre (Figure R-1 D), démontrant une taille plus importante que pour la tumeur obtenue après greffe de la F1.

Pour l'ensemble des tumeurs obtenues (n=2 pour chaque condition), la coloration HES nous a permis de constater une hétérogénéité tumorale (Figure R-1 E et F). Il a pu être constaté la présence de cellules atypiques avec des noyaux pléiomorphes, organisées en travées pouvant correspondre à des glandes tumorales malignes et la présence de nombreuses zones de nécrose avec certaines lumières glandulaires visibles. De nombreux faisceaux de fibres de collagène sont aussi visibles.

Ces résultats mettent ainsi en évidence la capacité des cellules issues de la F3 à induire un développement tumoral important, caractéristique des CIC, venant appuyer nos résultats précédents.

Après avoir constaté que l'ensemble des tumeurs obtenues en position sous-cutanée se développaient aux dépens de muscle, elles sembleraient également être irriguées par des vaisseaux sanguins (Figure R-2).

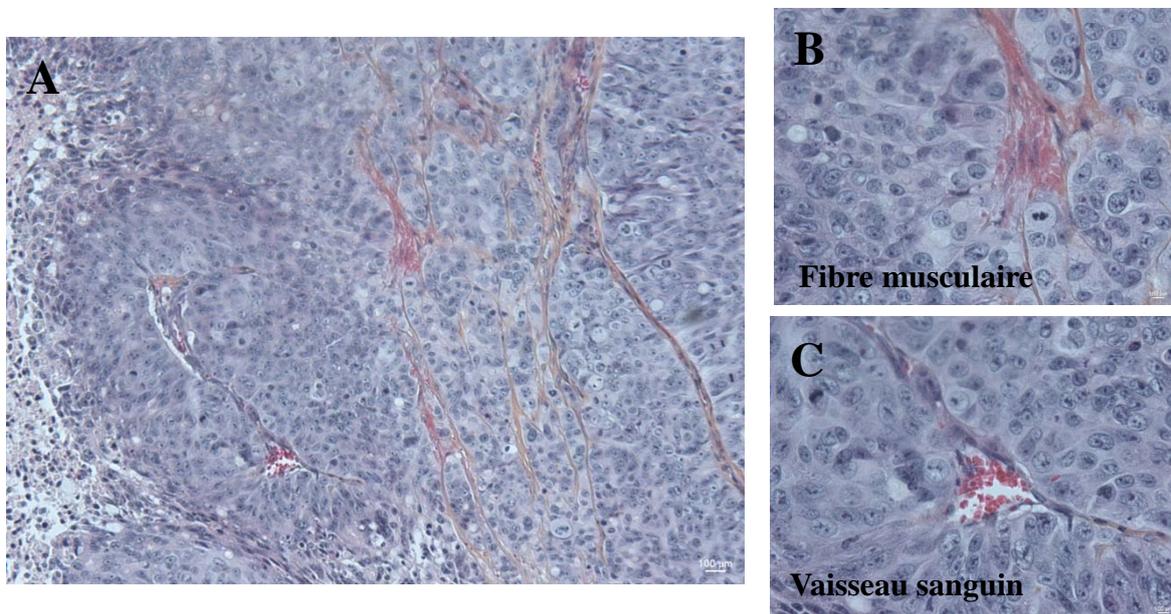


Figure R-2 : Coloration HES d'une tumeur obtenue après greffe en sous-cutanée de la F3 de WiDr obtenue par SdFFF sur souris SCID.

A : coloration HES de la tumeur (grossissement x100) ; **B :** Photographie d'une fibre musculaire enchâssée dans la tumeur après coloration HES ; **C :** Photographie d'un vaisseau sanguin après coloration HES (grossissement x400).

Ainsi, au cœur d'une tumeur issue de la F3 de WiDr, de nombreuses fibres musculaires enchâssées sont visibles par coloration HES (Figure R-2 A et B). Mais il a également pu être observé de petits vaisseaux bien délimités avec présence de globules rouges (Figure R-2 C) suggérant l'existence d'une vascularisation tumorale qui reste à vérifier par immunohistochimie.

Dans un second temps, les organes prélevés chez ces souris greffées en position sous-cutanée ont été analysés par histologie. Les organes les plus susceptibles d'être le siège de développement métastatique, c'est-à-dire principalement le foie et les poumons, ont été analysés en priorité. Macroscopiquement, les organes présentaient un aspect sain. Ces résultats ont été confirmés après analyse de ceux-ci par la coloration HES (Figure R-3).

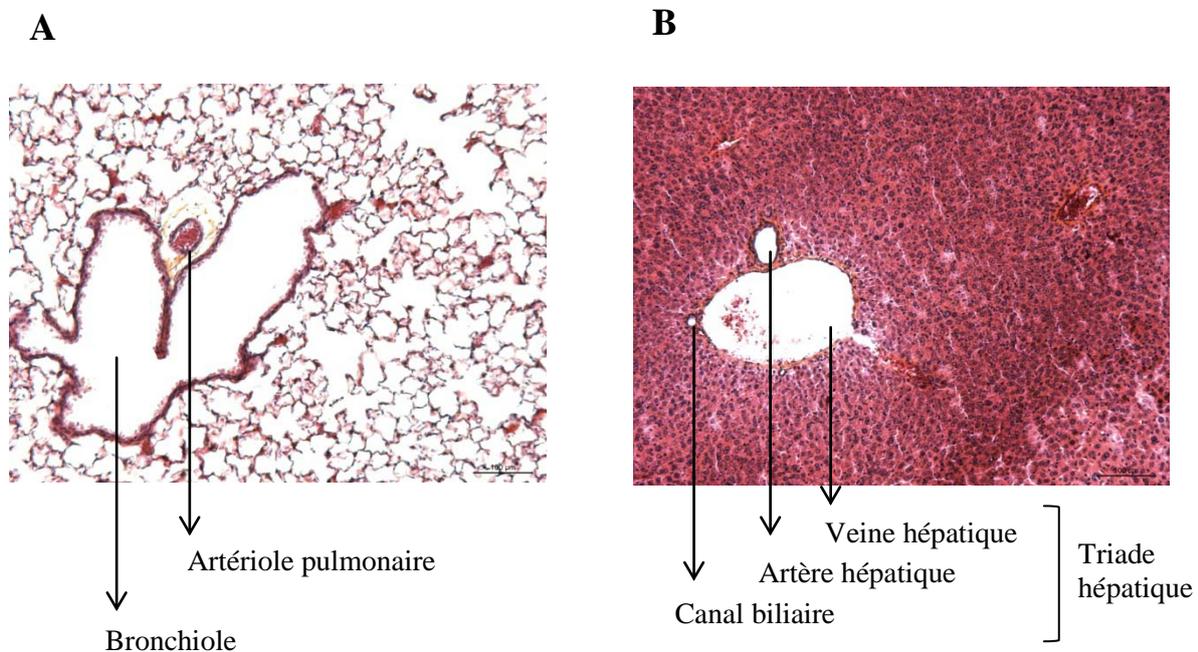


Figure R-3 : Illustrations des colorations HES des organes prélevés chez les souris SCID.
A : Poumons ; B : Foie (Grossissement x100).

Ces données sont en accord avec la littérature : la greffe sous cutanée induit rarement des processus métastatiques [181,189].

De la même manière que la lignée WiDr, la lignée HCT-116 a été triée par SdFFF et les fractions récoltées ont été injectées en sous-cutanée et des tumeurs ont été obtenues 5 semaines après injection (Figure R-3).

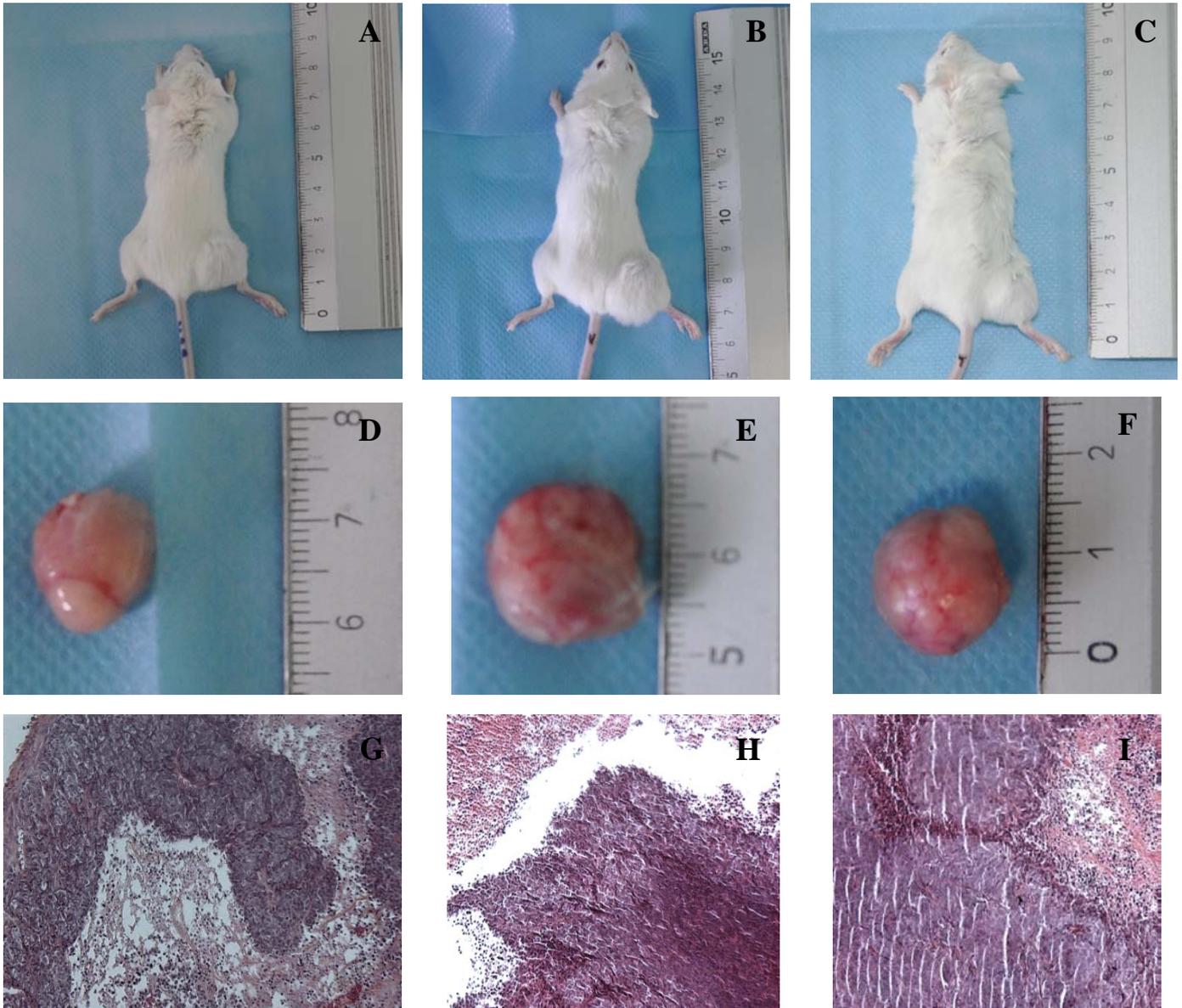


Figure R-4: Photographies de tumeurs obtenues après greffe des HCT116 triées par SdFFF en position sous-cutanée sur la souris SCID.

A, B et C : vue dorsale des animaux sacrifiés (avant récupération de la tumeur) et greffés respectivement avec les cellules des fractions non triées, F1 et F3 ; **D, E et F :** tumeurs récupérées à partir des greffes réalisées avec les cellules des fractions non triées, F1 et F3 ; **G** (non triées), **H** (F1) et **I** (F3) : coloration HES des tumeurs (grossissement x100).

Du point de vue macroscopique, avant même prélèvement de la tumeur, la souris greffée avec les cellules issues de la fraction F1 présentait une masse tumorale bien plus importante (Figure R-4 B) que celles greffées avec le PT (Figure R-4 A) ou la F3 (Figure R-4 C), bien que la souris ne manifestait aucun signe de souffrance. Après prélèvement de la tumeur, le volume de celle issue de la F1 était approximativement 2 fois plus important

(Figure R-4 E ; 1,6 cm de diamètre) que celui de la tumeur issue de la F3 (Figure R-4 F ; 1,4 cm de diamètre) ou du PT (Figure R-4 D ; 1,3 cm de diamètre), ces deux dernières étant comparables. Après coupe transversale de l'ensemble tumeurs, le centre de celles-ci était caractérisé par la présence d'un liquide abondant (non montré), pouvant correspondre soit au résultat de la nécrose cellulaire, soit à du mucus ayant été sécrété par les cellules de la tumeur transformées en cellules sécrétrices. L'analyse histologique (Figure R-4 G, H et I) a montré une hétérogénéité avec présence de zone nécrotique comme préalablement constaté avec la lignée WiDr (Figure R-1).

Ces résultats ainsi obtenus avec la lignée HCT116 après tri valident ainsi la caractéristique si particulière de cette lignée : l'élution précoce des CIC par SdFFF, possédant une prolifération importante contrairement à la lignée WiDr. Cette propriété des CIC au sein de cette lignée conduit à une initiation et un développement très rapide et important. Ces résultats sont à mettre en corrélation avec des résultats obtenus sur la CAM. En effet, nous avons démontré que les masses tumorales issues des colonies à partir de la F1 des HCT116 possédaient une capacité de prolifération importante qui, chez la souris, permet d'obtention d'une tumeur de taille plus importante que pour les autres sous-populations. Il semblerait donc que quelques soient les étapes intermédiaires avant l'obtention d'une tumeur (Matrigel, CAM, micro-environnement chez la souris), les cellules issues de SdFFF conservent leurs caractéristiques initiales d'après tri.

b. Greffes orthotopiques : modèle d'injection en position intra-caecale

Après 5 semaines de développement tumoral, les souris greffées en intra-caecale avec la lignée WiDr non triée (n = 3) ont été sacrifiées et les résultats sont présentés dans la Figure R-4. Après ouverture de l'abdomen, un développement tumoral intra-péritonéal a pu être constaté avec la formation de petites masses cancéreuses sur la paroi interne du péritoine (Figure R-5 A et B). Quant au caecum, lieu d'injection des cellules, il semblait macroscopiquement sain, sans formation tumorale, résultats qui ont été confirmés après prélèvement de celui-ci, réalisation de coupes et analyse histologique par la coloration HES (résultats non montrés).

Après prélèvement des masses tumorales intrapéritonéales, les analyses histologiques (Figure R-5 C) ont montré une hétérogénéité tumorale importante de la même manière qu'avec les greffes sous-cutanées.

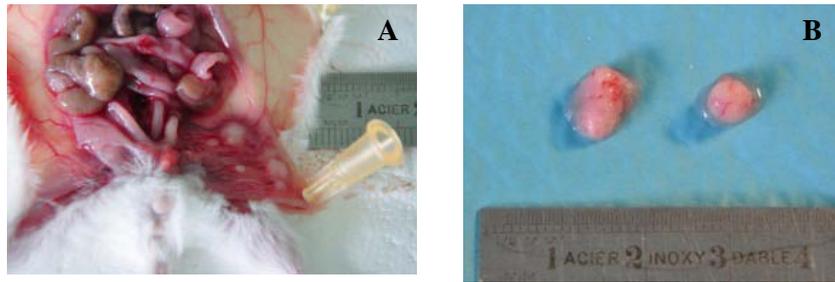


Figure R-5 : Photographies de tumeurs obtenues après greffe des WiDr non triées en position intra-caecale chez la souris SCID.

A : vue ventrale des animaux sacrifiés ; B : tumeurs récupérées.

La formation des tumeurs hors du site de greffe suggère une dissémination des cellules immédiatement après l'injection. Ces résultats nous ont donc amenés à rechercher des techniques pour améliorer la prise de greffe au niveau du site d'injection, c'est-à-dire la paroi du caecum.

Préalablement à la greffe intra-caecale, les cellules ont été remises en suspension dans 30 μ L de Matrigel afin d'obtenir une solution cellulaire plus compacte, immédiatement après l'injection, due à la polymérisation de celui-ci à la température corporelle des animaux (38-39°C). Cette technique de reprise en milieu semi solide permet l'implantation d'une suspension compacte qui permet d'éviter la dissémination des cellules en intra-péritonéal. Les résultats présentés dans la Figure R-6 ont été obtenus.

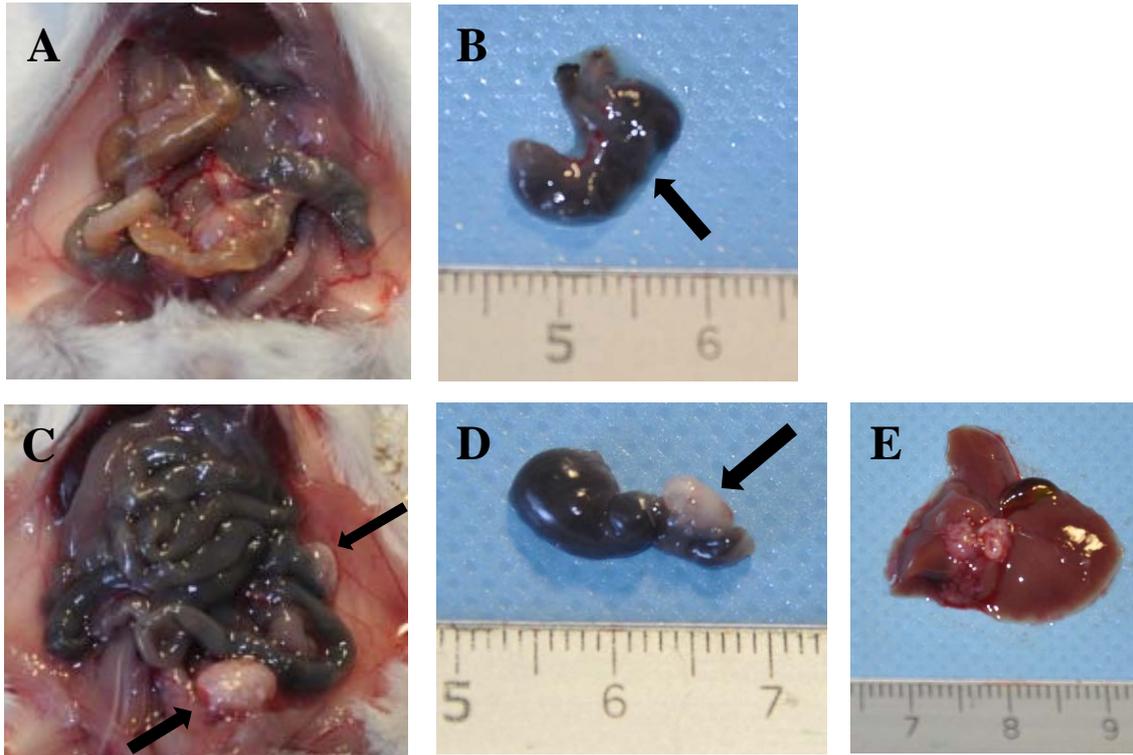


Figure R-6 : Photographies de tumeurs obtenues après greffe des WiDr et HCT116 non triées reprises dans du Matrigel en position intra-caecale sur la souris SCID.

A et C : vue ventrale des animaux sacrifiés, respectivement WiDr et HCT116, les flèches noires indiquent des masses tumorales ; B et D : caecums présentant une masse tumorale, respectivement WiDr et HCT116 ; E : foie prélevé sur la souris greffée avec les HCT116.

Cinq semaines après l'injection des cellules WiDr et HCT116 reprises en Matrigel en position orthotopique, les souris ont été sacrifiées. L'observation macroscopique a permis de mettre en évidence aucune dissémination des cellules au niveau du péritoine (Figure R-6 A et C) mais la présence de différentes anomalies. Pour la souris greffée avec la lignée WiDr, une petite masse blanchâtre, qui reste à analyser, a pu être observée dans la paroi du caecum (Figure R-6 B).

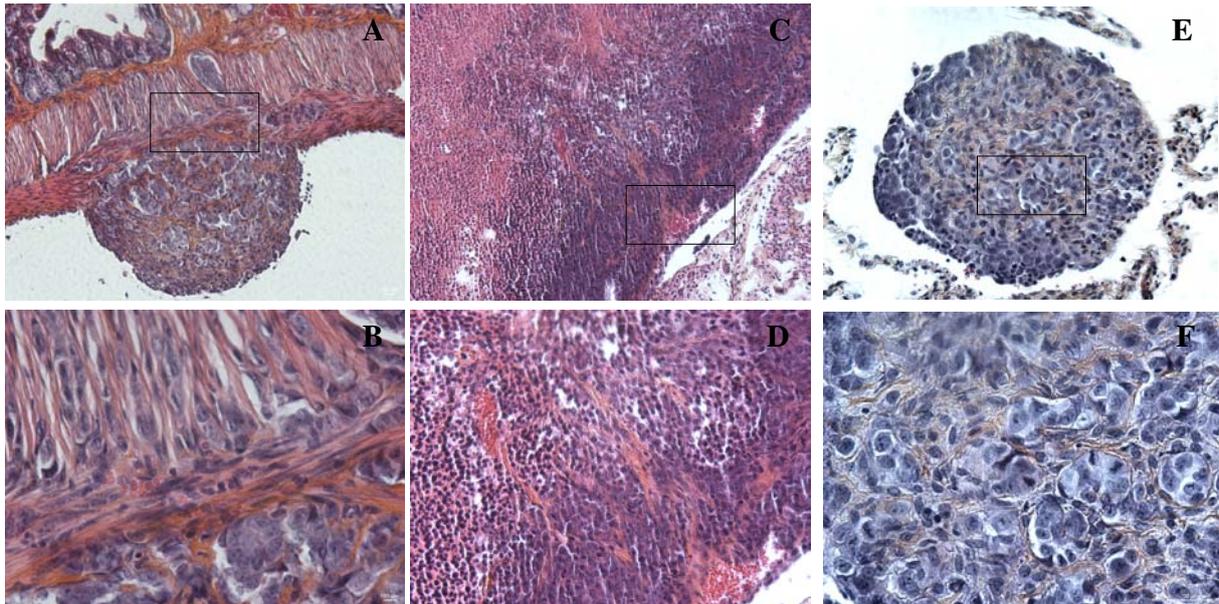


Figure R-7 : Coloration HES des organes et nodules prélevés chez la souris greffée en intra-caecale avec la lignée HCT116 reprise dans du Matrigel.

A et B : Coloration HES du caecum (grossissement x100 et x400) ; **C et D :** Coloration HES de la tumeur obtenue dans le bas-ventre de l'animal (grossissement x100 et x400) ; **E et F :** Coloration HES d'un nodule carcinomateux obtenu au voisinage des nœuds lymphatiques (grossissement x100 et x400).

Quant à l'animal greffé avec les HCT116, ses intestins étaient d'un noir intense pouvant laisser penser à une hémorragie intestinale (Figure R-6 C). De plus, une masse tumorale de 4 mm de longueur localisée au niveau de la paroi du caecum entre la musculuse et la séreuse (Figure R-6 C flèche du haut et D) a été décelée. Une seconde masse s'est également développée dans le bas ventre de l'animal indépendamment de tout organe (Figure R-6 C flèche du bas). De plus, le foie présentait un aspect anormal, avec différentes petites zones blanchâtres pouvant provenir de métastases tumorales (Figure R-6 E). Après analyse histologique des différents organes prélevés, il a tout d'abord été constaté la présence de masses tumorales qui se sont développés dans la paroi du caecum entre la séreuse et la musculuse (Figure R-7 A et B). Les cellules de la tumeur s'infiltrèrent de façon très importante dans la profondeur de la musculuse (Figure R-7 B). De plus, différents nodules de carcinose ont pu être observés. Le premier correspond à la masse qui s'est développée de manière indépendante de tout organe présentant un centre nécrotique important (Figure R-7 C et D). Le deuxième correspond à un nodule retrouvé à proximité des nœuds lymphatiques (Figure R-7 E et F). Enfin, différents petits nodules bien délimités ont pu être observés à la périphérie de l'intestin grêle et du pancréas (non montré).

III.4. Conclusions

Bien que l'ensemble de ces résultats restent à reproduire et à affiner, ceux-ci confirment l'enrichissement en cellules capable d'initier et de participer au développement des tumeurs par la technique de SdFFF. En ce qui concerne les deux lignées d'intérêt, ces CIC possèdent des caractéristiques qui leur sont propres, en accord avec les résultats obtenus sur la CAM, mais ont en commun un potentiel tumorigénique plus important. En effet, les fractions enrichies en CIC aussi bien au niveau de la lignée WiDr que HCT116 sont aptes à produire des tumeurs de taille bien plus importante que les autres populations.

Afin de mieux comprendre le comportement de ces CIC, il est maintenant important d'analyser finement les différents marqueurs au sein de l'ensemble ces tumeurs (marqueurs de CIC, caspase-3 clivée pour étudier l'apoptose, Ki-67 pour étudier la prolifération).

Bien que le modèle de greffe en sous-cutanée permette un suivi aisé du développement tumoral, le modèle orthotopique est un meilleur modèle pour l'étude de la formation et du développement tumoral *in vivo*. En effet, 5 semaines après injection, des masses tumorales sont obtenues aussi bien avec la lignée WiDr que la lignée HCT116, et des nodules carcinomateux ont été obtenus. L'optimisation de ce modèle avec reprise des cellules dans du Matrigel afin de les piéger et de limiter leur dissémination leur a permis l'obtention de tumeurs au sein même de la paroi caecale, mimant ainsi l'environnement tumoral du CCR.

Afin de poursuivre ce modèle, les fractions cellulaires issues de SdFFF seront greffées de la même manière, ainsi que la lignée de CCR Colo205 correspondant à un stade avancé de CCR, dérivant des ascites, pouvant peut-être favoriser le développement de métastases. Le but final reste d'étudier dans le détail la croissance tumorale en fonction des CIC et leur comportement *in situ* vis-à-vis des thérapies.

L'ensemble de cette première partie de résultats a mis en évidence la capacité de la SdFFF à trier des CIC à partir d'une population hétérogène. La caractérisation de ces CIC a été ainsi effectuée *in vitro*, *ex ovo* et *in vivo*.

Cependant, d'autres techniques peuvent être utilisées afin d'enrichir des populations en CIC. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à d'autres manières d'obtenir des populations homogènes en parallèle de l'utilisation de SdFFF comme technique de tri.

B. Méthode d'enrichissement en cellules initiant le cancer par un milieu spécifique

Article 3 :

Colorectal cancer-specific defined medium enables *in vitro* enrichment in cancer stem cells within complex populations.

Carole Mélin, Aurélie Perraud, Christophe Bounaix Morand du Puch, Elodie Loum, Stephanie Giraud, Marie.Odile Jauberteau, Christophe Lautrette, Serge Battu and Muriel Mathonnet

Soumis dans Stem Cell Research

Le développement de méthodes d'enrichissement en CIC *in vitro* est actuellement une nécessité pour faciliter l'étude de ces nouvelles cibles thérapeutiques. C'est dans ce contexte que le milieu OncoMiD (développé par la société Oncomedics), un milieu spécifiquement utilisé dans le cadre de cultures primaires de CCR, a été utilisé dans le but d'enrichir *in vitro* les cultures de lignées cellulaires en CIC. Ce milieu a induit une perte d'adhérence des cellules qui ont formé des sphères flottantes associée à un équilibre entre prolifération et apoptose et surtout une augmentation de l'expression des marqueurs des CIC.

Comme nous l'avons démontré auparavant [133], la SdFFF a été utilisée pour le monitoring de l'impact des conditions de culture sur les profils d'élution, dont l'évolution est le reflet des importantes modifications des propriétés biophysiques cellulaires (taille/densité) induites par le milieu OncoMid.

Colorectal cancer-specific defined medium enables *in vitro* enrichment in cancer stem cells within complex populations

Carole Mélin¹, Aurélie Perraud^{1,2}, Christophe Bounaix Morand du Puch³, Elodie Loum³, Stéphanie Giraud³, Marie-Odile Jauberteau¹, Christophe Lautrette³, Serge Battu^{1,4*} and Muriel Mathonnet^{1,2}

¹ Université de Limoges, Institut FR3503 GEIST, EA 3842 "Homéostasie cellulaire et pathologies", Faculté de Médecine, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges cedex, France.

² CHU de Limoges, Service de chirurgie digestive générale et endocrinienne, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges cedex, France.

³ Oncomedics, 1 Avenue d'Ester, 87069 Limoges, France.

⁴ Université de Limoges, Institut FR3503 GEIST, EA 3842 "Homéostasie cellulaire et pathologies", Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, 87025 Limoges Cedex, France.

* Corresponding author: Dr Serge Battu, Tel: +33 5 55 43 59 79, Email: serge.battu@unilim.fr

Key words: cell enrichment, colorectal cancer, defined medium, cancer stem cells.

Etant donné la difficulté pour isoler et étudier les CIC, le développement de méthodes permettant leur enrichissement est devenu une priorité. Le milieu OncoMiD a ainsi été testé sur des lignées humaines de CCR. Ce milieu induit une augmentation de la prolifération cellulaire jusqu'à l'obtention de sphères flottantes type colosphères [190] caractérisées par un taux de prolifération faible. De plus, ces sphères sont composées de cellules surexprimant les marqueurs d'indifférenciation caractéristiques des CIC. En parallèle, la SdFFF a permis de montrer un décalage du profil d'élution des cellules cultivées dans les différents milieux. En effet, alors qu'une augmentation du temps de rétention des populations cultivées dans le milieu OncoMiD était attendue, elles sont au contraire éluées plus rapidement. Ce résultat original peut être expliqué par la modification directe du phénotype cellulaire induite par le milieu ou bien par l'existence de différents pools de CIC comme démontré précédemment [171].

Ce milieu semble donc être un réel outil d'enrichissement en CIC *in vitro*, via un phénomène de dédifférenciation cellulaire qui peut être suivi par la technique de SdFFF.

Le développement de cette méthode d'enrichissement pourra permettre d'appréhender de nouvelles approches afin de mieux caractériser et étudier ces CIC afin de développer à terme des thérapies les ciblant spécifiquement.

Parallèlement à ces travaux portant sur l'étude et la caractérisation des CIC *in vitro*, tant à l'aide de la SdFFF qu'à l'aide du milieu OncoMid, j'ai aussi participé à l'amélioration de la technique de SdFFF par le développement instrumental d'un nouveau prototype portant notamment sur l'utilisation d'un splitt de concentration.

C. Développement d'un nouvel outil instrumental de tri par SdFFF

Article 4 :

Insertion of a Splitt Output Device in a Sedimentation Field Flow Fractionation Channel.

Carole Mélin, Aurelie Lacroix, Fabrice Lalloué, Arnaud Pothier, L. Y. Zhang, Aurelie Perraud, Claire Dalmay, Christophe Lautrette, Philippe Cardot, Muriel Mathonnet and Serge Battu

Soumis dans le journal Journal of Chromatography A

L'ensemble du travail de tri cellulaire a montré l'importance du développement méthodologique et instrumental réalisé. Il indique également les perspectives, non seulement en termes biologiques, mais aussi en termes de développements instrumentaux. Ceux-ci sont représentés par le développement de micro-canaux et l'implantation de lame séparatrice en bout de canal ou "splitt de concentration". Il répond aux exigences de préparation de cellules rares telles que les cellules souches. En effet, la séparation par SdFFF, comme toute séparation en phase liquide fait intervenir un effet de dilution péjoratif pour la récupération de ces sous-populations.

La séparation et l'isolement d'espèces par des méthodes telles que la chromatographie liquide ou la SdFFF, s'associent toujours à la dilution des populations éluées. Dans le cadre du tri cellulaire par SdFFF, cette dilution est un facteur limitant pour la caractérisation et l'utilisation des populations d'intérêt. Si le rendement brut à l'issue de l'élution est souvent supérieur à 80 %, les centrifugations nécessaires à la récupération des échantillons ont des rendements plus faibles, et ce d'autant plus que les cellules seront diluées. De sorte que si un volume de phase mobile important est nécessaire à la séparation des espèces, celui-ci n'est plus nécessaire au moment de la collection des fractions, il ne conduit qu'à la dilution des échantillons. L'utilisation de cette lame séparatrice du flux (« splitt ») permet en fin de canal

de séparer en deux le flux (Figure R-8) : une partie basse correspondant à la partie proche de la paroi d'accumulation et contenant les populations cellulaires ; et une partie haute, correspondant à la partie en regard de la paroi de déplétion et constituée de phase mobile excédentaire.

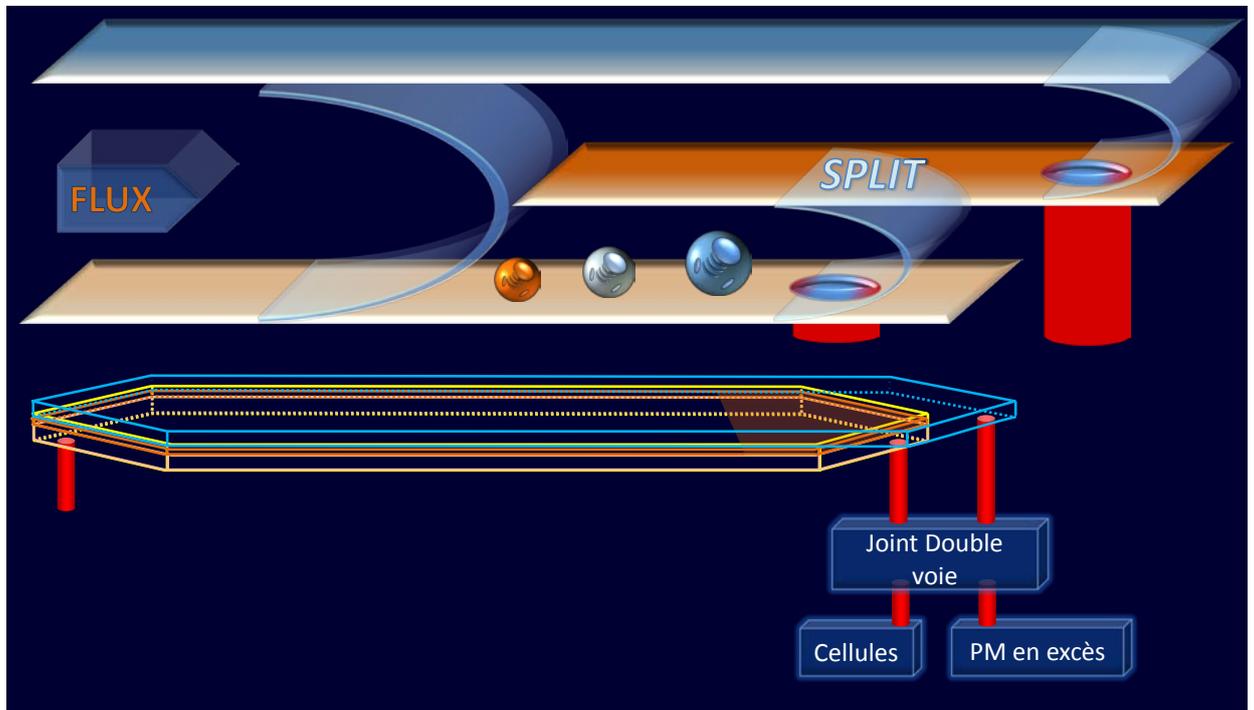


Figure R-8 : Schéma général du système « split » de concentration sur un canal de SdFFF.
PM : Phase Mobile

Un système de double détection / acquisition est également mis en place pour l'enregistrement du fractogramme des espèces éluées, et l'absence d'échantillon sur la voie de dérivation. Nous utilisons pour ce faire à la fois un détecteur UV classique et un détecteur CCD PN3000 XPT (PostNova) permettant d'observer les cellules éluées et d'en enregistrer la distribution de taille.

L'autre point important du dispositif « split » est le développement du joint double voie. Les modifications portant sur les joints doubles voies ont été modélisées (Figure R-9). D'un point de vue pratique, ces 2 voies sont extraites du bol de centrifugation à l'aide de joints tournants double-voies spécifiques.

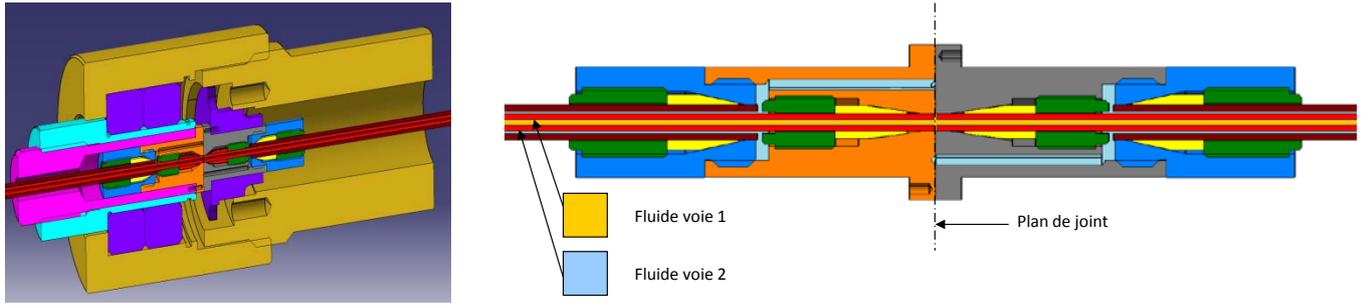


Figure R-9 : Schéma global du joint doubles voies pour système « split » et détail des connexions sur les semelles doubles-voies.

Le fluide voie 1 contient les cellules, et la voie 2 permet l'élimination de l'excédent de phase mobile.

Insertion of a Splitt Output Device in a Sedimentation Field Flow Fractionation Channel.

Carole Mélin¹, Aurélie Lacroix¹, Fabrice Lalloué¹, Arnaud Pothier², L. Y. Zhang²,
Aurélie Perraud¹, Claire Dalmay², Christophe Lautrette³, Philippe Cardot^{1,5}, Muriel
Mathonnet^{1,4} and Serge Battu^{1,5*}

¹ Université de Limoges, Institut 145 GEIST, EA 3842 "Homéostasie cellulaire et pathologies", Faculté de Médecine, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges cedex, France.

² XLIM, UMR CNRS 6172, Université de Limoges, 123, avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France

³ Oncomedics, 1 Avenue d'Ester, 87069 Limoges, France.

⁴ CHU de Limoges, Service de Chirurgie Digestive Générale et Endocrinienne, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges cedex, France.

⁵ Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

* Corresponding author: Dr Serge Battu, Tel: +33 5 55 43 59 79, Email: serge.battu@unilim.fr

Key words: Sedimentation Field Flow Fractionation; Instrument development; Splitt; Hyperlayer elution mode; Cancer Stem Cells.

Le « Splitt » de concentration avait pour but de réduire de manière conséquente le volume dans lequel les cellules sont éluées lors du tri afin de concentrer les cellules tout en respectant le mode de tri en Hyperlayer.

Une fois les différents paramètres de tri évalués et calibrés, les cellules de la lignée WiDr ont été injectées dans le canal. L'évolution de la taille des cellules au cours de leur élution a pu être suivie avec un détecteur muni d'une caméra (Postnova PN3000 XPT). La diminution du diamètre cellulaire au fur et à mesure de l'élution a ainsi confirmé la mise en œuvre du mode Hyperlayer.

Une proportion importante de cellules (jusqu'à 95 %) sont éluées dans un volume final diminué de moitié par rapport à un canal classique. Cette concentration des cellules dans le fluide a ainsi permis l'utilisation directe de celles-ci sans nécessité au préalable d'une étape de centrifugation. Ainsi, les cellules WiDr ont été triées et les fractions ont été directement testées pour leur capacité à reformer des colonies (auto-renouvellement). De même que préalablement démontré à l'aide un canal classique [171], ce test clonogénique a permis de démontrer l'élution des CIC dans la dernière fraction, la F3, confirmant l'efficacité du tri opéré par SdFFF.

Finalement, dans une dernière partie de mon travail de thèse, nous avons participé à un projet innovant de suivi à l'aide de la SdFFF des effets biologiques induits par des nanotubes de carbone sur les cellules de CCR.

D. Suivi de modifications biologiques induites par des nanotubes de carbone sur des cellules de CCR par SdFFF

Les nanotubes de carbone (NTC) font l'objet d'un intérêt croissant dans les domaines de la chimie et de la biologie de par leurs propriétés mécaniques, thermiques et électriques. Dans le secteur du biomédical, ces nanoparticules pourraient avoir de nombreuses applications en tant que vecteur de traitements. En effet, lorsqu'ils sont fonctionnalisés, ces NTC auraient la possibilité de délivrer des traitements directement aux tissus voire aux cellules cibles [191,192].

Il est possible de décrire un NTC comme un feuillet de graphène enroulé sur lui-même. Deux types de CNT existent : les monoparois (SWCNT) et les multiparois (MWCNT) (Figure R-10).

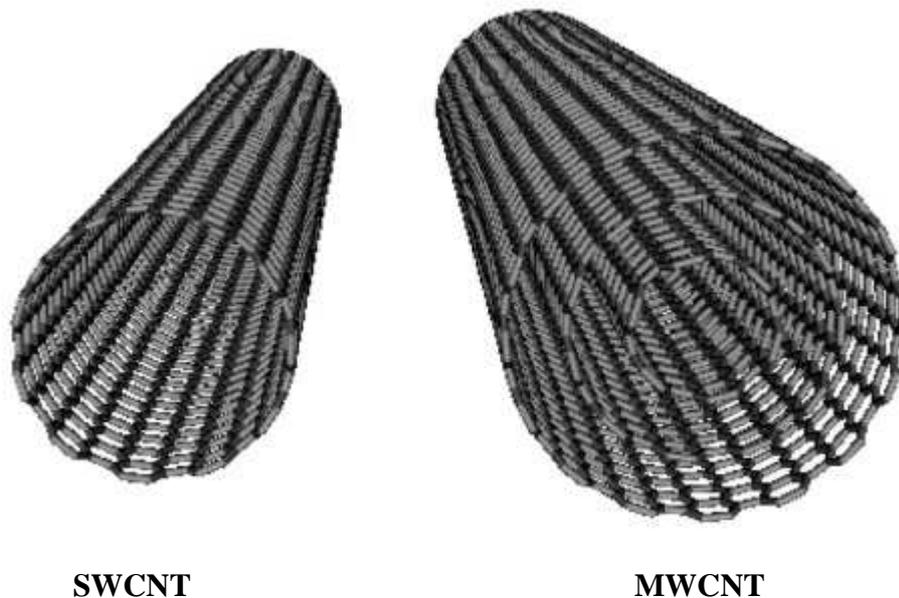


Figure R-10 : Représentation de la structure tubulaire des SWCNT et MWCNT.

Malgré toutes les applications potentielles de NTC, la toxicité de ces particules sur l'homme n'a été, jusqu'à aujourd'hui, que peu étudiée. Très récemment et plus précisément au cours de cette dernière année, il a été démontré que les SWCNT sont capables de rentrer dans les cellules HeLa par endocytose [193] soulevant ainsi la question sur l'effet de ceux-ci sur l'homéostasie cellulaire. Il semble que la pénétration de ces NTC dans les cellules induit une déstabilisation de la membrane lysosomale conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène puis à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose [194]. De la même manière, il a

été démontré que l'exposition aux NTC provoquerait des perturbations mitotiques associées à une accumulation d'anomalies génétiques [195]. De plus, étant donné leur petite taille, les NTC auraient la possibilité de se disséminer dans l'intégralité du corps via le système sanguin et le système lymphatique. Une étude menée sur des cellules endothéliales humaines a montré une forte toxicité des SWCNT sur celles-ci [196]. Sur des lignées cellulaires de poumons et pharynx, ces NTC ont un effet sur le métabolisme et la viabilité cellulaires [197]. Enfin, ces NTC ont été démontré comme inducteur d'une réponse immunitaire associée à la sécrétion de nombreuses cytokines [198,199,200].

Malgré ces quelques études, le manque de connaissances concernant ces NTC et leur comportement reste important. C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés, en collaboration avec le laboratoire LCABIE CNRS UMR5254 de l'Université de Pau, à l'étude et au suivi de l'effet des NTC sur une de nos lignées cellulaires de CCR, les Colo205.

Dans un premier temps, les différents types de NTC (SWCNT, MWCNT), fournis dans un milieu de dispersion, ont été testés sur nos cellules à différentes concentrations. Un test de métabolisme, MTT, a été réalisé après différents temps de traitements à différentes concentrations afin de suivre l'effet cytotoxique des NTC. Notre attention s'est arrêtée sur l'effet des SWCNT en particulier (Figure R-11)

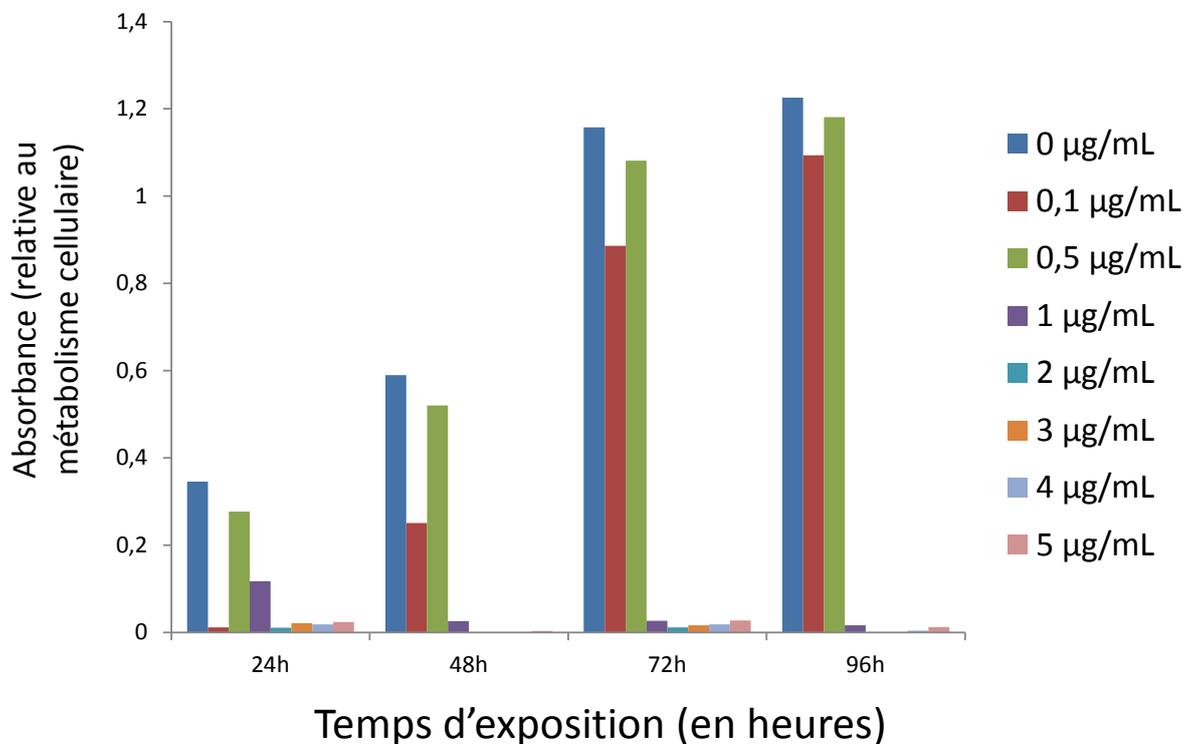


Figure R-11 : Effet des SWCNT sur les cellules Colo205 par test de métabolisme cellulaire.

Ces résultats suggèrent une toxicité des SWCNT sur les cellules dès la concentration de $1\mu\text{g/mL}$, concentration très faible au vue de ce qui est utilisé dans la littérature ($50\text{-}100\mu\text{g/mL}$). Le milieu de dispersion seul, sans NTC, a également été testé sur les cellules et aucune toxicité n'a été observée. Ce milieu particulier permet une dispersion importante des NTC pouvant expliquer l'effet des NTC à une si faible concentration.

Afin d'effectuer un suivi de l'effet des NTC sur les cellules, elles ont été injectées dans la SdFFF afin d'observer leur profil d'éluion (Figure R-12) après 24 et 48 heures d'exposition aux SWCNT à différentes concentrations (de $0,1$ à $1\mu\text{g/mL}$).

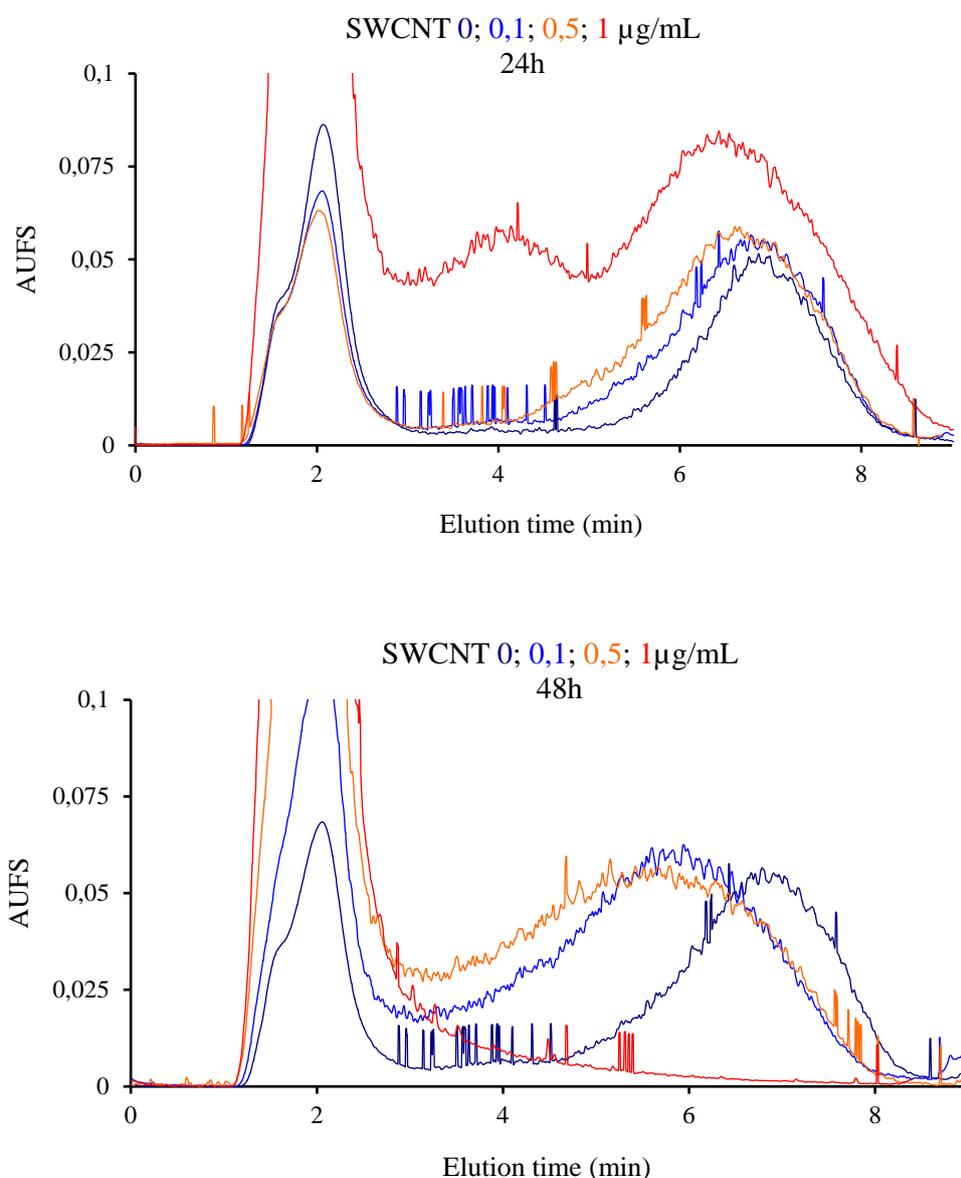


Figure R-12 : Fractogrammes des Colo205 traitées 24 et 48h avec différentes concentration de SWCNT ($0,1$; $0,5$ et $1\mu\text{g/mL}$).

Dès 24h d'exposition aux SWCNT, un décalage de pic vers la gauche peut être observé, décalage qui augmente avec la concentration en SWCNT. A la concentration de 1µg/mL, deux pics sont visibles, caractéristique d'une entrée en apoptose des cellules. Ceci est confirmé à 48h d'exposition : le temps de rétention est largement diminué pour les cellules traitées à 0,1 et 0,5 µg/mL et aucun pic d'élution n'est observable pour les cellules traitées à une concentration de 1µg/mL avec un volume mort largement augmenté.

Ces résultats sont à corrélés avec les analyses de viabilité / métabolisme cellulaire (Figure R-11). Ainsi, les SWCNT semblent avoir un effet largement cytotoxique à une concentration de 1µg/mL, effet confirmé par l'analyse par SdFFF, ce qui n'est pas observé pour les concentrations plus faibles à 0,1 et 0,5 µg/mL. Cette diminution du temps de rétention pourrait donc être caractéristique d'une incorporation des SWCNT par les cellules.

Afin de vérifier cette hypothèse et d'analyser l'incorporation des SWCNT dans les différentes fractions obtenues par SdFFF, un tri a été effectué, les fractions récoltées et envoyées au laboratoire LCABIE CNRS UMR5254. Ces derniers sont aptes à caractériser les NTC par la technique de FFF asymétrique (A4F) couplée à une détection de type MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering). Les résultats sont actuellement en cours d'analyse.

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence la cytotoxicité des SWCNT sur des cellules humaines de CCR. Cette cytotoxicité a pu être suivie par SdFFF. De plus, étant donné la diminution du temps de rétention en SdFFF, nous avons émis l'hypothèse que ces cellules seraient capables de fixer voire d'incorporer les SWCNT ce qui pourrait avoir diverses effets sur l'homéostasie cellulaire de celles-ci. Les modifications physico-chimiques des cellules ont pu également être suivies par SdFFF qui est, une fois de plus, une technique de choix dans le suivi d'évènements biologiques.

Enfin, le tri par SdFFF et l'analyse de SWCNT incorporés par A4F - MALLS pourraient être un couplage de techniques judicieux pour l'étude des phénomènes aboutissant à la toxicité des SWCNT sur les cellules humaines.

DISCUSSION GENERALE

Le CCR est le premier des cancers et son incidence devrait augmenter dans les prochaines années [10]. Malgré les progrès thérapeutiques réalisés au cours de la dernière décennie, liés, avant tout, à l'utilisation des thérapies ciblées [43,49,50], son pronostic reste réservé, la survie spécifique, tout stade confondu, n'excédant pas 35%. Bien que l'origine des CCR ne soit pas encore clairement défini, il semblerait que les cellules qui l'initient, les CIC, soient situées comme les cellules souches coliques, à la base des cryptes intestinales. Leur prolifération serait à l'origine de la masse et de la progression tumorales. En effet, les CIC proviendraient de la transformation des CS intestinales qui, suite à une accumulation de mutations, acquerraient une capacité tumorigénique [10,61]. Du fait de leur origine, les CIC possèderaient un ensemble de caractéristiques communes avec les CS saines dont certains marqueurs ainsi que les capacités d'auto-renouvellement, de multipotentialité, leur propriété principale étant leur potentiel tumorigénique chez des animaux immunodéprimés. De plus, ces mêmes cellules seraient impliquées dans de nombreux mécanismes telle la diffusion métastatique ou la résistance aux traitements [107,108,111]. Leur proportion au sein de la masse tumorale est faible, inférieure à 5%. L'objectif principal de cette thèse était de mettre au point des outils de tri permettant d'isoler à partir de lignées cellulaires de CRC, des fractions cellulaires homogènes et viables qui pouvaient être remises en culture permettant ainsi d'étudier de manière séparée l'homéostasie des diverses cellules contenues dans les CCR. La caractérisation des cellules contenues dans ces fractions a démontré que pouvaient ainsi être isolées non seulement les cellules les plus indifférenciées, mais également des cellules ayant incorporé des particules étrangères. La mise au point de différents modèles de greffes de CIC *in vivo*, l'isolement de cellules infectées par des particules étrangères ouvrent la voie à l'analyse ciblée des phénomènes de prolifération et résistance aux thérapies.

A. Le tri cellulaire par SdFFF

I. Obtention de fractions homogènes à partir de lignées humaines de CCR

Les travaux réalisés ont permis dans un premier temps de mettre au point des outils d'enrichissement cellulaire en CIC à partir de populations hétérogènes, correspondant à des lignées de différents stades de CCR.

L'outil de tri a été la SdFFF, une technique de tri efficace, rapide, reproductible, n'interférant pas avec la physiologie initiale des cellules [139,159,163,167,169,179]. Cette

technique ne nécessite aucun marquage au préalable des cellules, le tri reposant sur leurs propriétés biophysiques intrinsèques. La SdFFF permet d'obtenir des sous-populations homogènes de cellules à partir de populations hétérogènes telles que des lignées cellulaires [171]. Un panel de 8 lignées cellulaires a été trié et différentes sous-populations (PT, F1 et F3) ont été récoltées. Les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont montré que les cellules ayant les caractéristiques les plus indifférenciées sont éluées tardivement par SdFFF, classiquement dans la F3 [166], ce qui a été constaté pour la plupart des lignées étudiées, dont la lignée WiDr, après analyse phénotypique. Mais, ces cellules sont éluées dans la F1 pour seulement une des lignées de CCR, la lignée HCT116. Les cellules de la F1 ne présentaient pas de blocage en G0/G1 et ne semblaient pas plus quiescentes que la population globale. Enfin, les cellules de la F1 des HCT116 et de la F3 des WiDr possédaient toutes deux une capacité à former des colonies *in vitro* (tests de clonogénicité) bien supérieure à la population originale, confirmant donc leur propriété d'auto-renouvellement, une des caractéristiques clé des CIC.

Cette première étude a permis l'obtention de résultats originaux démontrant l'existence de différents stades d'activation des CIC, un pool peu proliférant et un pool activé, ceci étant en accord avec la littérature [172,173]. L'existence des cellules souches dormantes en rapport avec la division asymétrique cellulaire permet d'expliquer le renouvellement des épithelia cellulaires tout au long de la vie de l'individu. Dans les tissus cancéreux, l'existence de ces cellules était suspectée mais pas réellement prouvée. Cette méthode permet la mise en place d'un modèle préclinique d'analyse de sensibilité / résistance aux thérapies des différentes populations non seulement en fonction de leur état de différenciation mais aussi en fonction de leur état d'activation.

De nombreux travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont permis de proposer de nombreux champs d'application à la SdFFF, que ce soit dans le tri cellulaire [132,133,139,160,166,170] ou alors dans le suivi d'évènements biologiques [159,164,165,169,179]. Dans ce cadre, notre étude s'est portée en parallèle sur le suivi et le tri de cellules traitées par des particules étrangères, les nanotubes de carbone.

II. Suivi par SdFFF d'évènements biologiques induits par les nanotubes de carbone *in vitro*

La capacité de monitoring par SdFFF associée au tri cellulaire a été utilisée dans un autre volet correspondant au suivi de modifications induites par une exposition des cellules de CCR à des NTC. Ces nanoparticules font l'objet d'intérêt dans de nombreux domaines notamment du fait de leur résistance mécanique (300 fois plus résistants que l'acier mais 6 fois plus léger). Ces NTC sont désormais envisagés comme étant des matériaux de choix dans les secteurs de l'aéronautique mais également de la santé. De plus, étant donné leur taille infime, ce sont des particules candidates pour vectoriser des médicaments [191,192]. Cependant, la connaissance actuelle de ces NTC reste très limitée, aussi bien au niveau de leur propre caractérisation que leur effet sur les cellules humaines. C'est l'effet potentiel de ces NTC sur les cellules de CCR a fait l'objet de cette présente étude.

Dans un premier temps, après avoir testé la cytotoxicité des NTC fournis par le laboratoire LCABIE CNRS UMR5254 de l'Université de Pau, l'exposition aux SWCNT a induit une toxicité bien plus importante que celle attendue et ce, à des concentrations plus faibles que celles décrites dans la littérature [195,197]. Cet effet serait dû à l'augmentation de la dispersion des NTC dans le milieu de suspension des NTC, milieu n'ayant lui-même aucun effet toxique sur les cellules en culture.

Les cellules traitées à différentes concentrations ont été injectées dans la SdFFF après 24 et 48 heures d'exposition afin de suivre l'effet des NTC sur les cellules. La rétention dans le canal était plus faible pour les cellules exposées aux NTC à des concentrations non délétères que les cellules non traitées. L'hypothèse expliquant cette diminution de rétention serait que les cellules incorporeraient les NTC sans entrer dans la voie de mort. Afin de vérifier cette hypothèse, des cellules ont été traitées pendant 48 heures à une concentration de 0,5 µg/mL et triées par SdFFF. Deux fractions, F1 et F3, ont été récoltées, de même que le pic total et la population contrôle. Les échantillons ont été envoyés au laboratoire LCABIE CNRS UMR5254 afin de caractériser les NTC éventuellement incorporés dans les cellules par A4F, un outil de séparation de nanoparticules par FFF, couplé une détection de type MALLS. Les premiers résultats tendent à montrer que les NTC seraient rentrés dans les cellules et que la SdFFF serait capable de discriminer différentes populations cellulaires ayant incorporé des NTC possédant des caractéristiques différentes en termes de taille. En effet, des résultats préliminaires montreraient que la population F3 correspondrait à des cellules ayant incorporé des NTC de plus petite taille que les cellules de la F1.

Le couplage entre ces deux techniques de FFF, une de séparation d'espèces microniques et la deuxième de nanoparticules, pourrait permettre de faciliter la compréhension de phénomènes physiologiques induits par les NTC. L'utilisation de ces particules en recherche translationnelle en vue de vectorisation de médicaments semble compromise du fait de la toxicité importante des NTC sur les cellules humaines.

III. Amélioration de l'outil technique de SdFFF : le Splitt

L'objectif principal étant de mettre en place de nouveaux supports d'études des CIC, il a été nécessaire de faire évoluer l'outil de tri afin de l'adapter au tri de cellules présentes en faible proportion au sein d'une population.

Une des priorités actuelles dans l'optimisation de la technique de tri par SdFFF est de réduire le volume de récupération des cellules éluées. En effet, le tri par SdFFF conduit systématiquement à des échantillons dilués dans un grand volume imposant alors une étape de centrifugation afin de concentrer les cellules. Afin de minimiser ce problème de dilution, un nouveau prototype de SdFFF a été mis en place, avec implantation en fin de canal d'un « splitt » ou lame de séparation. Une fois les cellules séparées dans le canal en fonction de leurs propriétés biophysiques, le « splitt » permet une séparation du fluide en 2 parties : la partie contre la paroi d'accumulation est éluée par une première sortie et contient les cellules tandis que l'autre part du fluide situé du côté de la paroi de déplétion correspond au fluide excédentaire et est élué par une seconde sortie. De plus, ce système a été couplé à un détecteur muni d'une caméra permettant de visualiser les cellules au fur et à mesure de leur élution. Le logiciel de la caméra a également permis de mesurer les variations de diamètre des cellules au cours de l'élution. Afin de mettre en place ce système, il a été nécessaire de s'interroger quant à l'impact de l'implantation du splitt sur la géométrie du canal et sur la répartition des flux. Une fois le canal implémenté de la lame de splitt et le volume du canal étant réduit, l'analyse des volumes morts a été réalisée montrant une élution dans de bonnes conditions, avec un volume mort symétrique.

Afin de valider cette méthode d'un point de vue biologique, les cellules WiDr ont été utilisées. Quel que soit le champ appliqué (entre 5 et 15 g), le diamètre des cellules mesuré diminue au fur et à mesure de l'élution, validant ainsi l'utilisation du mode en Hyperlayer. Plus le champ appliqué est fort, plus la variation de diamètre entre le début et la fin de l'élution est importante. Lors de l'utilisation du champ le plus fort (15 g), jusqu'à 95 % des cellules sont éluées dans un volume diminué de moitié.

Enfin, après tri, les fractions récoltées possèdent bien les mêmes caractéristiques que celles obtenues précédemment avec un tri par SdFFF classique, les cellules ayant la capacité de reformer des colonies se trouvant dans la F3. Cependant, afin de réaliser ce test biologique, aucune centrifugation n'a été nécessaire, les cellules étant concentrées dans un petit volume de liquide.

Ainsi validé, ce nouveau prototype pourra être affiné par l'utilisation de nouveaux matériaux biocompatibles dans la construction du canal.

Après la mise au point de cet outil de tri sur des lignées cellulaires de CCR, il a été nécessaire de poursuivre leur caractérisation et de mettre en place des supports d'étude des CIC se rapprochant de l'environnement physiopathologique du CCR. Le but initial étant de faciliter l'étude des CIC, afin de mieux comprendre leur fonctionnement, leur comportement et donc de pouvoir à terme élaborer des stratégies les ciblant directement, la capacité principale des CIC, l'initiation et le développement tumoral, ont été analysés par différentes méthodes.

B. Obtention de tumeurs à partir de populations homogènes

I. Intérêts d'utilisation de milieux spécifiques

I.1 Le milieu défini OncoMid

Dans une seconde partie de la mise au point de techniques d'enrichissement et d'amplification des CIC, la suite des travaux s'est portée sur l'utilisation de milieux dits « définis », dépourvus de SVF, en collaboration avec la société Oncomedics. L'effet du milieu « OncoMiD for colon », breveté dans le cadre de cultures primaires issues de tumeurs de patients atteints de CCR, a été analysé sur des lignées de CCR. La culture des cellules dans le milieu OncoMiD induit, à partir de lignées cellulaires adhérentes, la formation de sphères flottantes *in vitro* après trois jours de culture. Ces sphères flottantes de type colosphères ont alors été caractérisées phénotypiquement avec l'analyse par immunofluorescence indirecte des marqueurs des cellules indifférenciées, le CD44 et l'EpCAM. Ces cellules composant ces sphères ont montré une expression de ces marqueurs augmentée par rapport à la culture en milieu basal (10 % SVF). De plus, afin de mieux comprendre le comportement et la mise en place de ces sphères, la prolifération et l'apoptose cellulaire ont été étudiées *in vitro*. Le milieu OncoMiD augmente la prolifération des cellules adhérentes, qui se décollent ensuite de

leur support de culture pour former des sphères. Une fois en suspension, les cellules ont une prolifération diminuée, suggérant une quiescence des cellules composant les sphères. En ce qui concerne l'apoptose cellulaire dans le milieu OncoMiD, les lignées WiDr et SW480 correspondant à des stades précoces de CCR ne semblent pas affectées par ce milieu tandis que le ratio apoptotique augmente pour la lignée Colo205 qui correspond à un stade avancé de CCR. Ceci peut être expliqué de par une prolifération accrue de ces cellules par rapport aux deux autres lignées, correspondant à un « turn-over » plus important de la population.

Enfin, le suivi par la technique de SdFFF a permis de mettre en évidence une rétention des cellules cultivées dans le milieu OncoMiD moins importante que pour les cellules cultivées en milieu basal. En mode hyperlayer, l'ordre d'éluion est taille et densité dépendant. Cependant, peu de variation du diamètre cellulaire n'a pu être observée. La diminution de la rétention serait donc due à une diminution de la densité cellulaire. Cette éluion plus rapide des cellules pourrait être due à des modifications morphologiques induites par la formation de ces sphères. Ce résultat surprenant met en évidence que l'évolution biologique induite par ce milieu ne se fait pas dans la même direction que celle dans le milieu classique de culture. Les CIC obtenues avec ce milieu ne possèderaient donc pas les mêmes caractéristiques que celles obtenues en culture classique après SdFFF. Ce temps de rétention plus court est également à mettre en parallèle de l'hypothèse des CIC activées qui seraient éluées plus précocement par SdFFF (la F1 des HCT116). Une caractérisation biologique plus poussée de ces cellules ayant le phénotype des CIC reste à effectuer entre autres par des greffes des sphères flottantes sur la CAM ou chez la souris SCID.

En conclusion, le milieu OncoMiD a permis l'obtention de sphères surexprimant les marqueurs des CIC. Cependant, cet enrichissement pourrait s'effectuer via une dédifférenciation des cellules, induisant donc des modifications physiologiques de la population initiale. En effet, ce milieu a permis l'obtention de CIC mais n'ayant pas les mêmes caractéristiques et phénotype (organisation en sphères flottantes) que celles obtenues par SdFFF. Il ne s'agit plus de CIC natives mais plutôt de CIC « induites ». A l'opposé, cette constatation n'est pas applicable au tri par SdFFF qui permet d'obtenir des populations homogènes en termes de différenciation et de phénotype, sans induire aucune modification physiologique de celles-ci. Dans le cadre de l'étude et de la caractérisation des CIC, il est important de travailler sur les cellules « originales » présentes initialement dans une

population complexe et non pas d'en induire la formation via des systèmes de production par modification de l'état de différenciation cellulaire.

C'est pourquoi la SdFFF reste la technique de tri optimale pour l'étude de sous-populations.

I.2. Le Matrigel

La matrice de membrane basale Matrigel est une préparation solubilisée extraite du sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), une tumeur riche en protéines de matrice extracellulaire. Ses principaux composants sont la laminine, suivie du collagène IV, de l'entactine et de l'héparane sulfate protéoglycane. Elle contient également des facteurs de croissance naturellement présents dans la tumeur EHS. A température ambiante, la matrice Matrigel se polymérise pour produire une matrice biologiquement active semblable à la matrice basale des mammifères. Ces propriétés ont été exploitées dans deux cadres distincts :

- Avant greffes sur la CAM, en tant que support de culture en 3 dimensions. Le Matrigel a permis d'apporter une base solide au développement cellulaire facilitant ainsi l'interaction entre cellules. Après 5 semaines de culture *in vitro* dans cette matrice, des colonies cellulaires visibles à l'œil nu ont pu être récupérées et greffées.
- Lors de la greffe chez la souris SCID, en tant que matrice se solidifiant lors de l'injection afin d'éviter la dissémination des cellules isolées.

Bien que ce milieu offre de nombreux avantages quant à la possibilité de culture en 3D avec la présence d'une matrice extra-cellulaire proche de celle de la tumeur chez l'homme, il présente comme principal inconvénient l'absence totale de contrôles quantitatifs des composants et facteurs de croissance présents dans la matrice. En effet, cette matrice provenant de sarcomes murins, une grande variabilité entre lots ne peut pas être contrôlée.

II. Le modèle de la CAM d'embryon de poulet

Le premier support d'étude pour l'initiation tumorale a été la CAM d'embryon de poulet. Cette technique a pour avantage d'être rapide, peu onéreuse, et permet une accessibilité aisée à la tumeur puisqu'elle se développe à l'interface de l'embryon et de l'air. Ce modèle, ne faisant pas intervenir de système immunitaire, est largement utilisé pour l'obtention de tumeurs de façon reproductible, notamment dans le cadre du glioblastome, une tumeur richement vascularisée [176]. Il sert également de support de tests de différents types de molécules qu'elles soient pro- ou anti-angiogéniques soit directement sur la CAM soit sur les tumeurs formées sur la CAM [201,202].

Différentes techniques de greffes sur la CAM ont été réalisées. Dans un premier temps, les suspensions cellulaires de différentes lignées de CCR ont été déposées directement sur la CAM. Malgré la mise en place d'un anneau pour contenir la suspension cellulaire, aucune tumeur n'a pu être obtenue quelle que soit la lignée utilisée. Une fois déposées, les cellules ne formaient pas de masses compactes et la cohésion entre les cellules restait insuffisante pour la formation d'une tumeur. C'est pourquoi, afin de favoriser ces phénomènes de cohésion et d'interactions cellulaires, les cellules ont été cultivées dans un second temps en 3D dans du Matrigel afin d'obtenir des colonies cellulaires. Une fois les colonies formées *in vitro*, elles ont été greffées directement, après élimination de la matrice mais sans dissociation des colonies cellulaires, sur la CAM. Cette étape supplémentaire a permis l'obtention de masses tumorales compactes, avec cette fois-ci la possibilité de les prélever et de les analyser dans leur ensemble. Le dépôt de colonies cellulaires, obtenues par une culture pendant une longue période en Matrigel, sur la CAM n'avait été jamais réalisé jusqu'alors. En effet, généralement les cellules en suspension sont directement déposées sur la CAM. Cette étape de culture intermédiaire semblerait faciliter la prise de greffe sur la CAM, la cohésion entre cellules étant ainsi amorcée. Cette technique pourrait correspondre à une étape de « pré-initiation tumorale ».

Deux lignées cellulaires d'intérêt, les WiDr et les HCT116, ont alors été greffées. Ces cellules, issues de deux lignées différentes de stade précoce / intermédiaire, sont caractérisées par un comportement différent après tri par SdFFF. Après analyses histologique et immunohistochimique, il a pu être observé une importante hétérogénéité tumorale, aussi bien au niveau de son aspect histologique que des marquages de prolifération et d'apoptose. En effet, en particulier pour la lignée HCT116, la périphérie possède un indice de prolifération important et un marquage complètement inversé au niveau de l'apoptose. Ces caractéristiques

reproduisent celles des CCR les plus volumineux où un centre nécrotique en corrélation avec l'hypoxie tumorale est présent. De plus, les masses tumorales obtenues à partir de la lignée WiDr expriment la CK-20 au contraire de celles obtenues avec la lignée HCT116. La CK-20 est classiquement utilisée comme marqueur de cellules cancéreuses du CCR [203,204]. Cependant, il a été démontré que son expression par des cellules du CCR n'est pas retrouvée chez tous les patients [205]. Il semblerait donc que l'absence d'expression de la CK-20 dans les tumeurs obtenues sur la CAM serait spécifique des tumeurs provenant de la lignée HCT116. En effet, toutes les tumeurs provenant de cette lignée ont montré une absence totale de ce marqueur, au contraire de la lignée WiDr. La CK-20 peut être également considérée comme un marqueur de cellules différenciées de CCR. Une hypothèse serait donc que la lignée HCT116 correspondrait à une lignée composée de cellules globalement peu différenciées et donc potentiellement plus agressives [87].

Après avoir effectué l'ensemble des mêmes tests à partir de colonies issues de fractions obtenues par SdFFF, des différences majeures de comportement des masses tumorales ont pu être observées. Tout d'abord, quelle que soit la fraction greffée, des masses tumorales se sont développées sur la CAM. Cependant, après analyse par immunohistochimie, l'ensemble des résultats sont en accord avec ceux obtenus *in vitro* directement après tri par SdFFF. En effet, les masses obtenues à partir de la F3 des WiDr enrichie en CIC présentent un indice de prolifération faible (environ 15 % de cellules marquées au Ki-67) par rapport à la F1 (75%). Nous avons démontré *in vitro*, directement après tri par SdFFF, que les cellules de la F3 exprimant les marqueurs des CIC sont préférentiellement bloquées en G0/G1. Dans le cadre de cette présente étude, les masses obtenues sur la CAM, et ce après une culture des cellules de F3 pendant 5 semaines en Matrigel, présentent des caractéristiques comparables puisque leur indice de prolifération reste faible. De la même manière concernant les masses obtenues à partir de la F1 des HCT116 enrichies en CIC, elles sont composées d'une quantité importante de cellules en prolifération (environ 70%).

Nous avons ainsi donc pu mettre au point un nouvel outil basé sur le couplage SdFFF – Matrigel – CAM qui a ainsi permis l'obtention de masses tumorales aisément analysables. Il a également pu être démontré que l'étape de culture intermédiaire en Matrigel a permis une amplification cellulaire en 3D sans modifier les caractéristiques initiales des cellules après tri. En effet, l'effet du tri cellulaire par SdFFF n'est pas perdu puisque les masses tumorales obtenues à partir des différentes fractions possèdent un comportement qui leur est propre. Les

différentes masses tumorales obtenues sur la CAM grâce à la SdFFF et à l'étape intermédiaire de culture en Matrigel conservent leurs caractéristiques fonctionnelles initiales quant à leur comportement prolifératif.

Dans les perspectives immédiates, il est important d'étudier l'expression des marqueurs des CIC au sein même de ces masses tumorales et la vascularisation de celles-ci. De plus, ce support offrant une accessibilité à la masse tumorale bien plus aisée que sur l'animal, il est désormais possible de tester des traitements directement sur les tumeurs obtenues sur la CAM, le but étant de comprendre le comportement des différentes populations triées par SdFFF en réponse à des thérapies. Il sera également intéressant de retrier par SdFFF les cellules composant la masse tumorale. En effet, une caractéristique essentielle des CIC est leur capacité à redonner des cellules différenciées et fonctionnelles. Les masses tumorales obtenues pourraient être, de la même manière que chez le patient, hétérogènes, composées de CIC et de cellules différenciées fonctionnelles. A partir de ces tumeurs, un des objectifs principaux sera donc de réaliser un tri sur les cellules dissociées obtenues à partir des tumeurs et de les greffer afin de comprendre le comportement des différentes populations tumorales.

Cependant, ce modèle d'étude reste très éloigné de l'environnement physiopathologique de la tumeur chez l'homme, le micro-environnement étant totalement absent, et les temps d'étude étant très courts (3 jours de développement tumoral). En effet, le micro-environnement tumoral est essentiel pour la compréhension de la tumorigenèse et de la progression tumorale et, par conséquent, pour les approches thérapeutiques à mettre en œuvre. Le micro-environnement tumoral, constitué de cellules non tumorales et du stroma, est déterminant dans l'évolution moléculaire des cascades de signaux cellulaires ; les cellules tumorales épithéliales et les cellules stromales exercent des effets réciproques sur le comportement cellulaire de chacune. Ces interactions tissulaires entraînent une activation cellulaire et favorisent la formation d'un micro-environnement qui conditionne la croissance des cellules tumorales, détermine leur potentiel métastatique et, éventuellement, la localisation tissulaire des métastases.

Ce modèle de la CAM reste donc un modèle d'étude intermédiaire entre l'*in vitro* et l'*in vivo*, ce qui nous a amené à poursuivre nos études chez le mammifère.

III. Le modèle mammifère : souris SCID

Le second modèle d'étude a été la greffe chez des souris immunodéprimées de type SCID. Deux techniques ont été réalisées : la greffe en sous-cutanée (hétérotopique), un modèle permettant un suivi aisé du développement tumoral, et en intra-caecale (orthotopique), un modèle plus lourd à mettre en place mais permettant de mimer le micro-environnement physiopathologique de la tumeur chez le patient atteint d'un CCR.

Dans un premier temps, le premier modèle a consisté à réaliser des injections en sous-cutanée des cellules non triées et triées par SdFFF respectivement. Ces résultats préliminaires sont encourageants en terme de taille et donc de croissance tumorale : les cellules issues de la F3 des WiDr permettent un développement tumoral bien plus important que celles issues de la F1 (n=2 pour chaque population). De même pour les HCT116, les cellules de la F1 permettent le développement de tumeurs de diamètre supérieur à celles de la F3 (n=2). Il est à noter également que la lignée HCT116 a permis un développement tumoral plus rapide que la lignée WiDr (non montré), soulignant leur importante agressivité qui sera à corrélérer avec l'expression de la CK-20 comme nous l'avons montré sur la CAM.

L'ensemble de ces résultats confirment la caractérisation de la population cellulaire obtenue par SdFFF, population enrichie en CIC. La greffe chez l'animal de sous-populations homogènes obtenues par SdFFF a été réalisée pour la première fois et a permis l'obtention de tumeurs. Ce nouvel outil ainsi créé permet désormais de posséder un réel support d'étude des CIC natives sans modifications de celles-ci et de leur comportement *in vivo*. Cependant, ils restent à être reproduits sur un nombre plus important de souris et l'analyse des marqueurs des CIC reste à effectuer.

Dans un second temps, la mise au point d'un modèle orthotopique par injection de suspensions cellulaires dans la paroi du caecum a été réalisée. Afin d'optimiser le système d'injection, les cellules ont été reprises dans un petit volume de Matrigel, permettant alors la polymérisation de la suspension cellulaire, une fois l'injection dans la paroi du caecum réalisée. Contrairement à l'emploi du Matrigel dans le cadre des greffes sur la CAM où le Matrigel sert de support de culture cellulaire sur une longue période pour permettre l'obtention de colonies cellulaires, l'ajout de Matrigel pour la remise en suspension des cellules isolées, plutôt que la reprise en PBS, pour les greffes en intra-caecale, permet de leur apporter une base solide, une matrice extra-cellulaire dans le but d'éviter la dissémination des cellules en dehors du caecum. Cette technique nous a permis d'obtenir la formation de

tumeurs dans la paroi même du caecum, entre la séreuse et la musculieuse. Ces tumeurs, qu'elles soient localisées au niveau du péritoine, lorsqu'il y a un envahissement péritonéal loco-régional ou au niveau du caecum, possèdent des caractéristiques identiques à celles observées chez le patient : une hétérogénéité tumorale importante avec la présence d'une matrice extra-cellulaire très développée et riche en fibres de collagène. De plus, dans le cas de la lignée HCT116, il a pu être observé la formation de nodules de carcinose à la périphérie de différents organes. Ce modèle désormais mis en place, il est maintenant nécessaire d'effectuer des injections en position intra-caecale de l'ensemble des fractions issues de SdFFF pour les différentes lignées d'intérêt. Une troisième lignée de CCR sera également analysée, la lignée Colo205 correspondant à un stade métastatique de CCR. Cette technique sera également optimisée afin d'obtenir une tumeur entre la muqueuse et la sous-muqueuse, position d'intérêt pour se rapprocher du micro-environnement tumoral observé chez le patient.

Pour conclure sur ces deux modèles *in vivo*, les greffes en position sous-cutanées présentent de nombreux avantages : facilité de mise en œuvre, pas de nécessité d'anesthésie lourde, suivi aisé de la croissance tumorale... Cependant, au contraire des greffes intra-caecales, plus difficiles à mettre en œuvre, le modèle hétérotopique ne permet pas de prendre en compte l'environnement tumoral. Néanmoins, dans le cadre de greffes chez des souris SCID, le micro-environnement tumoral reste incomplet, puisque le système immunitaire de ces souris est immature et est donc éloigné de l'environnement du CCR chez le patient où ne nombreuses infiltrations immunitaires peuvent être observées. En effet, il est désormais connu que certains lymphocytes sont capables de cibler directement les CIC et d'engager une réponse cytotoxique contre celles-ci [206]. Enfin, le principal inconvénient du modèle de greffe orthotopique reste la difficulté du suivi d'où la nécessité de mettre en place des techniques de visualisation et d'imagerie pour faciliter le suivi du développement tumoral, par PET-SCAN ou échographie du petit animal.

Ces modèles permettent l'obtention d'un réel support d'étude. Une fois ces modèles validés et des tumeurs intra-caecales obtenues à partir de fractions de SdFFF, différentes thérapies pourront alors être testées sur ce modèle d'étude, aussi bien de manière systémique chez la souris que des traitements localisés au niveau de la tumeur [207]. D'autres types de modèles pourront également être testés telle que l'injection de cellules en intra-splénique permettant d'obtenir un support d'étude pour les CCR métastasés [208].

En conclusion, nous avons pu mettre en place différents outils de tri et de caractérisation des CIC. En effet, ces nouvelles méthodes innovantes ont permis l'obtention, à partir de l'outil de base correspondant à des lignées de CCR, de tumeurs qui deviennent maintenant le support de base de nouvelles études des CIC : leur réponse aux chimiothérapies, leurs interactions avec le micro-environnement tumoral et enfin, la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les CIC.

CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

La compréhension du comportement des CIC dans le cadre de nombreux cancers dont le CCR est désormais un réel enjeu pour l'adaptation des thérapies actuelles. Dans ce cadre, nous avons pu mettre en place de nouvelles méthodes d'isolement et de caractérisation de ces CIC.

Dans un premier temps, la SdFFF, technique innovante de tri cellulaire a permis l'obtention des populations enrichies en CIC à partir de lignées humaines de CCR qui ont ensuite pu être caractérisées *in vitro* mettant en évidence deux pools potentiels de CIC : un ayant les caractéristiques de cellules quiescentes et l'autre, proliférant, possédant néanmoins les marqueurs de cellules indifférenciées [171]. Ces deux populations distinctes restent encore à étudier de manière fonctionnelle *in vivo* pour comprendre le comportement de celles-ci au sein même d'une tumeur. Cette technique de tri *in vitro* pourra être par la suite couplée à d'autres techniques d'enrichissement en CIC telles que des milieux définis ou encore la culture en hypoxie favorisant l'émergence de clones ayant les caractéristiques des CIC.

Afin de valider la caractérisation des CIC issues de lignées cellulaires et triées par SdFFF, le premier modèle d'étude de l'initiation tumoral a été un modèle *ex ovo* basé sur le couplage de trois techniques : la SdFFF, la culture en Matrigel et la greffe sur la CAM. Cette méthode innovante a validé la capacité de ces CIC, qu'elles soient quiescentes ou proliférantes, à initier une tumeur sur la CAM. Une fois initié, le développement tumoral est défini par le pool de cellules dont il est formé : des masses tumorales ayant un faible taux de prolifération pour les CIC issues des WiDr ou au contraire un taux de prolifération important pour celles issues des HCT116. Il reste désormais important d'analyser les marqueurs des CIC au sein même de la tumeur afin de les mettre en relation avec l'environnement de celle-ci. En effet, la corrélation entre ces marqueurs et les zones hypoxiques de la tumeur sera un point important à déterminer. De la même manière, il sera capital d'étudier la capacité invasive des cellules greffées sur la CAM [209] ainsi que la présence ou non de réseaux vasculaires à l'intérieur des masses tumorales et de comprendre, si la vascularisation a bien lieu, les événements aboutissant à l'angiogenèse tumorale soit par détournement de la vascularisation de l'hôte soit par néo-angiogenèse se déroulant au sein même de la tumeur. Pour analyser ces phénomènes, il est possible de discriminer les vaisseaux d'origine humaine en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre les cellules endothéliales humaines ou provenant de l'embryon de poulet par des marqueurs spécifiques de poulet (SNA-lectine). La mesure de l'hypoxie pourra également être réalisée par l'utilisation de sondes à hypoxie. De plus, les

masses tumorales semblant être hétérogènes, il sera très intéressant de les dissocier et de les trier à nouveau par SdFFF pour les greffer à nouveau afin de comprendre le comportement des différentes populations composant la tumeur.

Afin de rapprocher notre modèle d'étude de l'environnement physiopathologique du CCR, l'étude de ces CIC issues du tri par SdFFF a été menée *in vivo* chez la souris immunodéprimée. L'ensemble des résultats obtenus ont confirmé la capacité des CIC obtenues par SdFFF à initier et à participer au développement tumoral de façon plus importante que les autres populations cellulaires. En parallèle, un modèle de greffe orthotopique a été mis en place, modèle se rapprochant du micro-environnement tumoral. Cette étude se poursuivra par l'analyse sur un nombre plus important de souris afin de reproduire les résultats obtenus, aussi bien au niveau des greffes hétérotopiques qu'orthotopiques, et ce, sur cellules triées et non triées par SdFFF. De la même manière pour les tumeurs issues de la CAM, il sera important d'étudier la localisation de cellules exprimant les marqueurs des CIC et de les mettre en relation avec l'environnement hypoxique.

Après avoir mis en place ces différents modèles d'études et optimiser des méthodes biologiques, il a été nécessaire de d'optimiser l'outil technique afin de mieux l'adapter au tri de populations rares. C'est ainsi que nous avons également pu mettre un place un nouveau prototype de tri cellulaire par SdFFF : le « Splitt » de concentration. Il a permis le tri effectif de CIC dans un volume réduit et donc de s'affranchir des étapes de centrifugation normalement nécessaires à la concentration des cellules. La priorité dans l'amélioration de ce canal reste l'utilisation de nouveaux matériaux bio-compatibles permettant une faible interaction avec les cellules et facilitant la mise en place de la lame séparatrice. Ce nouveau prototype trouvera de nombreuses applications, notamment dans le cadre de couplage à d'autres techniques où la concentration des échantillons est une nécessité.

Ce travail de thèse sera poursuivi par l'étude des relations entre la tumeur, les CIC, et l'interaction avec le micro-environnement tumoral *in vivo*. En effet, le développement de la tumeur reste un processus complexe qui ne tient pas seulement compte de l'hétérogénéité tumorale mais aussi de la niche. Ce micro-environnement est caractérisé par un milieu extracellulaire complexe, riche en nombreux facteurs de croissance mais également par l'infiltration de diverses cellules dont des cellules du système immunitaire. De plus, les CAF (Carcinoma Associated Fibroblasts) joueraient un rôle considérable dans la croissance et

l'invasion tumorale [210]. Le dialogue entre ces différents types cellulaires, cellules cancéreuses, CAF et cellules immunitaires devient un domaine d'étude primordial dans le cadre du CCR. Afin de comprendre l'interaction avec cette niche, il sera important de mettre en place un modèle de CCR induit, chez des souris possédant un système immunitaire effectif.

De plus, au sein même d'une tumeur, l'hétérogénéité est caractérisée par la diversité des cellules composant la tumeur, par la matrice extra-cellulaire donnant sa structure à la tumeur mais également par tout un environnement qui peut varier selon la zone tumorale observée. En effet, la périphérie tumorale peut être définie comme une zone vascularisée, ayant à disposition tous les nutriments nécessaires à sa survie et sa progression. Au contraire, au centre de la tumeur, des zones hypoxiques peuvent être observées, nécessitant une adaptation cellulaire importante [211]. C'est pourquoi les CIC, qui peuvent posséder les caractéristiques des cellules souches en ce qui concerne la quiescence, peuvent être retrouvées au centre de la tumeur de par leur capacité à entrer dans un état « dormant », donc avec un métabolisme réduit [120]. Il reste alors particulièrement intéressant d'analyser cette corrélation entre CIC et hypoxie dans les tumeurs que nous avons obtenues en particulier chez la souris. Pour ce faire, des co-marquages avec les marqueurs spécifiques de l'hypoxie et ceux des CIC seront effectués. Comme il a été démontré dans la littérature [172,173], les CIC peuvent osciller entre deux états, un état dormant et un autre activé. Ces variations de comportement seraient largement dépendantes de l'interaction avec l'environnement tumoral.

En parallèle, il est désormais bien connu que l'hypoxie, via l'activation du facteur HIF-1 α , induit l'activation de nombreuses voies de signalisation pouvant aboutir soit à la mort soit à la survie cellulaire [120]. Une des voies activées par l'hypoxie correspond au phénomène d'autophagie. L'autophagie est un mécanisme de recyclage cellulaire possédant un rôle dual dans l'homéostasie cellulaire puisque, selon les conditions, elle peut induire la mort ou la survie. Son implication dans les cancers reste jusqu'à maintenant largement controversé. Cependant, dans le cadre d'une tumeur solide, la privation en nutriments (reproduit en culture par des milieux sans SVF) ou la culture en conditions hypoxiques vont induire l'activation de l'autophagie et conduira à la survie des cellules [212]. La boucle hypoxie – autophagie – CIC est désormais un élément particulièrement important à analyser. En effet, l'interaction de ces phénomènes n'a pas été décrite dans le CCR. Cependant, quelques rares études ont été menées dans le cancer du sein. En effet, les cellules CD44⁺ / ALDH⁺ dans ce cancer semblent être capables d'activer la voie de l'autophagie pour leur survie [213]. De plus, il a été démontré que les voies de signalisation menant à l'autophagie,

dont l'expression de la protéine Beclin 1, une protéine phare de l'autophagie, seraient également impliquées dans le maintien de l'état « souche » de ces cellules cancéreuses [214,215]. Toujours dans le cadre du cancer du sein, une corrélation entre l'expression de Beclin 1 et la tumorigénicité des cellules a été démontrée [215]. Chez des patients atteints d'un cancer du pancréas, les marqueurs de l'autophagie et de l'hypoxie ont pu être corrélés à l'expression des CIC [123]. Enfin, il semblerait exister un lien entre l'autophagie et la résistance aux traitements : le traitement au 5FU activerait l'autophagie, qui elle-même permettrait de protéger contre la toxicité de ce traitement [216].

De plus, au sein de notre laboratoire, il a été mis en évidence que les cellules de CCR expriment des facteurs de croissance particuliers, les neurotrophines ainsi que leurs récepteurs [217]. Les neurotrophines, en particulier le BDNF, sont exprimées au sein de nos lignées et sont fonctionnelles, capables de se fixer à leurs récepteurs, et d'activer des voies de signalisations impliquées dans l'homéostasie cellulaire. En effet, la fixation du BDNF à son récepteur de haute affinité, le Trk B, induit la survie cellulaire. Cet effet est accentué lorsque les cellules sont placées en condition de stress telle que la privation sérique. L'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs sera donc une voie d'étude particulièrement intéressante dans le cadre des CIC, celles-ci subissant de nombreux stress (hypoxie, traitements...), permettant l'exploration des mécanismes expliquant la survie de ces cellules dans les conditions les plus drastiques.

L'ensemble de ces études menées au cours de ces dernières années montrent la nécessité de comprendre les voies qui sont activées au sein de ces CIC dans le cadre du CCR pour permettre leur survie dans des conditions « extrêmes » dues au micro-environnement tumoral mais aussi aux thérapies.

Le but de cette étude à terme reste de comprendre les phénomènes de résistances des CIC aux traitements, afin de pouvoir élaborer des thérapies les ciblant directement, éliminant alors les risques de métastases et de récurrence des tumeurs.

ANNEXE : Neurotrophines et CCR

BIBLIOGRAPHIE

References

1. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, et al. (2005) Colorectal cancer. *Lancet* 365: 153-165.
2. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E (2008) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46: 765-781.
3. Gingras D, Beliveau R (2011) Colorectal cancer prevention through dietary and lifestyle modifications. *Cancer Microenviron* 4: 133-139.
4. Lynch HT, de la Chapelle A (2003) Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348: 919-932.
5. Goss KH, Groden J (2000) Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 18: 1967-1979.
6. Pineda M, Gonzalez S, Lazaro C, Blanco I, Capella G (2010) Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. *Mutat Res* 693: 19-31.
7. Lynch PM (2008) Standards of care in diagnosis and testing for hereditary colon cancer. *Fam Cancer* 7: 65-72.
8. Radtke F, Clevers H (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307: 1904-1909.
9. Bjercknes M, Cheng H (2005) Gastrointestinal stem cells. II. Intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G381-387.
10. Boman BM, Huang E (2008) Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol* 26: 2828-2838.
11. Humphries A, Wright NA (2008) Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 8: 415-424.
12. Brabletz S, Schmalhofer O, Brabletz T (2009) Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol* 217: 307-317.
13. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386: 623-627.
14. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppede F (2010) Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011: 792362.
15. Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009) Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 361: 2449-2460.
16. Pino MS, Chung DC (2010) The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138: 2059-2072.
17. Boland CR, Goel A (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138: 2073-2087 e2073.
18. Velho S, Haigis KM (2011) Regulation of homeostasis and oncogenesis in the intestinal epithelium by Ras. *Exp Cell Res* 317: 2732-2739.
19. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S (2011) KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 12: 594-603.
20. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, et al. (2008) Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 5705-5712.
21. Minde DP, Anvarian Z, Rudiger SG, Maurice MM (2011) Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer* 10: 101.
22. Fearon ER (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 6: 479-507.
23. Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137: 413-431.
24. Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, Kostakis A, Nikiteas N, et al. (2012) TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 314: 1-7.
25. Akhurst RJ, Derynck R (2001) TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11: S44-51.
26. Goel V, Gray R, Chart P, Fitch M, Saibil F, et al. (2004) Perspectives on colorectal cancer screening: a focus group study. *Health Expect* 7: 51-60.

27. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, et al. (2004) PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6: 117-127.
28. Bowen KA, Doan HQ, Zhou BP, Wang Q, Zhou Y, et al. (2009) PTEN loss induces epithelial--mesenchymal transition in human colon cancer cells. *Anticancer Res* 29: 4439-4449.
29. Obrocea FL, Sajin M, Marinescu EC, Stoica D (2011) Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. *Rom J Morphol Embryol* 52: 537-544.
30. de Gramont A, Chibaudel B, Larsen AK, Tournigand C, Andre T (2011) The evolution of adjuvant therapy in the treatment of early-stage colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* 10: 218-226.
31. Michel P, Di Fiore F (2011) [Chemotherapy and rectal cancer]. *Cancer Radiother* 15: 436-439.
32. Sharif S, O'Connell MJ, Yothers G, Lopa S, Wolmark N (2008) FOLFOX and FLOX regimens for the adjuvant treatment of resected stage II and III colon cancer. *Cancer Invest* 26: 956-963.
33. Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, Nautiyal J, Sarkar FH, et al. (2009) Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin and FOLFOX. *Transl Oncol* 2: 321-328.
34. Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R (2007) EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control* 14: 295-304.
35. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, et al. (2005) Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 16: 102-108.
36. Iqbal S, Lenz HJ (2004) Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 54 Suppl 1: S32-39.
37. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, et al. (2005) Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7: 301-311.
38. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalberg JR, Tu D, et al. (2007) Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357: 2040-2048.
39. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, et al. (2008) EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 2311-2319.
40. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, et al. (2011) Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 22: 1535-1546.
41. Krejsa C, Rogge M, Sadee W (2006) Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov* 5: 507-521.
42. Okines A, Cunningham D, Chau I (2011) Targeting the human EGFR family in esophagogastric cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 492-503.
43. Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Gan HK, Murone C, et al. (2005) Treatment of human tumor xenografts with monoclonal antibody 806 in combination with a prototypical epidermal growth factor receptor-specific antibody generates enhanced antitumor activity. *Clin Cancer Res* 11: 6390-6399.
44. Arteaga CL (2003) ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* 284: 122-130.
45. Winder T, Lenz HJ (2010) Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat Rev* 36: 550-556.
46. Rad FH, Le Buanec H, Paturance S, Larcier P, Genne P, et al. (2007) VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2837-2842.
47. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441: 437-443.
48. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, Shaheen RM (2000) Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 5 Suppl 1: 11-15.
49. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W (2005) Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 328-335.
50. Konno H, Yamamoto M, Ohta M (2010) Recent concepts of antiangiogenic therapy. *Surg Today* 40: 494-500.

51. Rodriguez (2007) Biology and Clinical Applications of Angiogenesis Inhibition in Malignant Disease. *The Molecular Oncology Report* 1.
52. Anderson EC, Hessman C, Levin TG, Monroe MM, Wong MH (2011) The Role of Colorectal Cancer Stem Cells in Metastatic Disease and Therapeutic Response. *Cancers (Basel)* 3: 319-339.
53. Buczacki S, Davies RJ, Winton DJ (2011) Stem cells, quiescence and rectal carcinoma: an unexplored relationship and potential therapeutic target. *Br J Cancer* 105: 1253-1259.
54. Scoville DH, Sato T, He XC, Li L (2008) Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 134: 849-864.
55. Ricci-Vitiani L, Fabrizio E, Palio E, De Maria R (2009) Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)* 87: 1097-1104.
56. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5: 691-701.
57. Abdul Khalek FJ, Gallicano GI, Mishra L (2010) Colon cancer stem cells. *Gastrointest Cancer Res: S16-23*.
58. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, et al. (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449: 1003-1007.
59. Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, et al. (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of *EphB/ephrinB*. *Cell* 111: 251-263.
60. He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, et al. (2004) BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 36: 1117-1121.
61. Ieta K, Tanaka F, Haraguchi N, Kita Y, Sakashita H, et al. (2008) Biological and genetic characteristics of tumor-initiating cells in colon cancer. *Ann Surg Oncol* 15: 638-648.
62. Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737.
63. Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-174.
64. Overall CM, Kleinfeld O (2006) Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6: 227-239.
65. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867.
66. Botchkina G (2012) Colon cancer stem cells - From basic to clinical application. *Cancer Lett*.
67. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, et al. (2004) Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306: 1568-1571.
68. Tsai KS, Yang SH, Lei YP, Tsai CC, Chen HW, et al. (2011) Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice. *Gastroenterology* 141: 1046-1056.
69. Schatton T, Frank NY, Frank MH (2009) Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioessays* 31: 1038-1049.
70. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, et al. (2009) Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 383: 157-162.
71. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A (2009) Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest* 27: 844-850.
72. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, et al. (2009) Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 69: 3382-3389.
73. Jelski W, Zalewski B, Chrostek L, Szmitkowski M (2007) Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the sera of patients with colorectal cancer. *Clin Exp Med* 7: 154-157.
74. Horn PA, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, et al. (1999) Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood* 93: 1435-1437.
75. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, et al. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-5828.

76. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, et al. (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111-115.
77. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445: 106-110.
78. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, et al. (2008) CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118: 2111-2120.
79. Meng X, Li M, Wang X, Wang Y, Ma D (2009) Both CD133+ and CD133- subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. *Cancer Sci* 100: 1040-1046.
80. LaBarge MA, Bissell MJ (2008) Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? *J Clin Invest* 118: 2021-2024.
81. Botchkina IL, Rowehl RA, Rivadeneira DE, Karpeh MS, Jr., Crawford H, et al. (2009) Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis. *Cancer Genomics Proteomics* 6: 19-29.
82. Yang K, Chen XZ, Zhang B, Yang C, Chen HN, et al. (2011) Is CD133 a biomarker for cancer stem cells of colorectal cancer and brain tumors? A meta-analysis. *Int J Biol Markers* 26: 173-180.
83. Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, Matsuzaki S, Tanaka F, et al. (2008) CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Ann Surg Oncol* 15: 2927-2933.
84. Yang ZL, Zheng Q, Yan J, Pan Y, Wang ZG (2011) Upregulated CD133 expression in tumorigenesis of colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 17: 932-937.
85. Kemper K, Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, et al. (2010) The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res* 70: 719-729.
86. Taieb N, Maresca M, Guo XJ, Garmy N, Fantini J, et al. (2009) The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. *Cancer Lett* 278: 164-173.
87. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF (2010) Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3722-3727.
88. Zoller M (2011) CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* 11: 254-267.
89. Singh R, Campbell BJ, Yu LG, Fernig DG, Milton JD, et al. (2001) Cell surface-expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44. *Glycobiology* 11: 587-592.
90. Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, et al. (2008) CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 14: 6751-6760.
91. Chu P, Clanton DJ, Snipas TS, Lee J, Mitchell E, et al. (2009) Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer* 124: 1312-1321.
92. Lee JL, Wang MJ, Chen JY (2009) Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44. *J Cell Biol* 185: 949-957.
93. Orian-Rousseau V (2003) [CD44 involvement as a regulator of cell proliferation]. *Med Sci (Paris)* 19: 405-407.
94. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, et al. (2011) CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 19: 387-400.
95. Munz M, Baeuerle PA, Gires O (2009) The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 69: 5627-5629.
96. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, et al. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10158-10163.
97. Patel BB, Yu Y, Du J, Levi E, Phillip PA, et al. (2009) Age-related increase in colorectal cancer stem cells in macroscopically normal mucosa of patients with adenomas: a risk factor for colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 344-347.
98. Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, et al. (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 11: 162-171.

99. Levin TG, Powell AE, Davies PS, Silk AD, Dismuke AD, et al. (2010) Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 139: 2072-2082 e2075.
100. Ofori-Acquah SF, King JA (2008) Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res* 151: 122-128.
101. Weichert W, Knösel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G (2004) ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol* 57: 1160-1164.
102. Wiiger MT, Gehrken HB, Fodstad O, Maelandsmo GM, Andersson Y (2010) A novel human recombinant single-chain antibody targeting CD166/ALCAM inhibits cancer cell invasion in vitro and in vivo tumour growth. *Cancer Immunol Immunother* 59: 1665-1674.
103. Carpentino JE, Hynes MJ, Appelman HD, Zheng T, Steindler DA, et al. (2009) Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer Res* 69: 8208-8215.
104. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, et al. (2008) Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 3: e2428.
105. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, et al. (2008) Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13427-13432.
106. Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, Muraro MG, Mele V, et al. (2010) Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 103: 382-390.
107. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, et al. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760.
108. Tang C, Ang BT, Pervaiz S (2007) Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J* 21: 3777-3785.
109. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, et al. (2007) WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 618-623.
110. Chen T, Zhang Y, Guo WH, Meng MB, Mo XM, et al. (2010) Effects of heterochromatin in colorectal cancer stem cells on radiosensitivity. *Chin J Cancer* 29: 270-276.
111. Mo W, Zhang JT (2012) Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol* 3: 1-27.
112. Xu J, Peng H, Zhang JT (2007) Human multidrug transporter ABCG2, a target for sensitizing drug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Med Chem* 14: 689-701.
113. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183: 1797-1806.
114. Mayol JF, Loeuillet C, Herodin F, Wion D (2009) Characterisation of normal and cancer stem cells: one experimental paradigm for two kinds of stem cells. *Bioessays* 31: 993-1001.
115. Winquist RJ, Boucher DM, Wood M, Furey BF (2009) Targeting cancer stem cells for more effective therapies: Taking out cancer's locomotive engine. *Biochem Pharmacol* 78: 326-334.
116. Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, et al. (2006) Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 12: 4147-4153.
117. Fan X, Ouyang N, Teng H, Yao H (2011) Isolation and characterization of spheroid cells from the HT29 colon cancer cell line. *Int J Colorectal Dis* 26: 1279-1285.
118. Dong TT, Zhou HM, Wang LL, Feng B, Lv B, et al. (2011) Salinomycin selectively targets 'CD133+' cell subpopulations and decreases malignant traits in colorectal cancer lines. *Ann Surg Oncol* 18: 1797-1804.
119. Bose D, Zimmerman LJ, Pierobon M, Petricoin E, Tozzi F, et al. (2011) Chemoresistant colorectal cancer cells and cancer stem cells mediate growth and survival of bystander cells. *Br J Cancer* 105: 1759-1767.
120. Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, et al. (2010) Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 102: 789-795.

121. Keith B, Simon MC (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 129: 465-472.
122. Vessoni AT, Muotri AR, Okamoto OK (2012) Autophagy in stem cell maintenance and differentiation. *Stem Cells Dev* 21: 513-520.
123. Rausch V, Liu L, Apel A, Rettig T, Gladkikh J, et al. (2012) Autophagy mediates survival of pancreatic tumour-initiating cells in a hypoxic microenvironment. *J Pathol* 227: 325-335.
124. Galavotti S, Bartesaghi S, Faccenda D, Shaked-Rabi M, Sanzone S, et al. (2012) The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene*.
125. Mai TT, Moon J, Song Y, Viet PQ, Phuc PV, et al. (2012) Ginsenoside F2 induces apoptosis accompanied by protective autophagy in breast cancer stem cells. *Cancer Lett* 321: 144-153.
126. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.
127. Giddings JC (1966) New separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities. *Sep Sci* 1: 123-125.
128. Giddings JC (1993) Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science* 260: 1456-1465.
129. Giddings JC (2000) The Field-Flow Fractionation Family: Underlying Principles, in *Field-Flow Fractionation Handbook*. John Wiley & Sons, Inc: New York: 3-30.
130. Kowalkowski T, Buszewski B, Cantado C, Dondi F (2006) Field-flow fractionation: theory, techniques, applications and the challenges. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 36: 129-135.
131. Reschiglian P, Zattoni A, Roda B, Michelini E, Roda A (2005) Field-flow fractionation and biotechnology. *Trends Biotechnol* 23: 475-483.
132. Micallef L, Battu S, Pinon A, Cook-Moreau J, Cardot PJP, et al. (2010) Sedimentation field-flow fractionation separation of proliferative and differentiated subpopulations during Ca^{2+} -induced differentiation in HaCaT cells. *J Chromatogr B* 878: 1051-1058.
133. Bégaud-Grimaud G, Battu S, Leger DY, Cardot PJP (2012) Mammalian Cell Sorting with Sedimentation Field Flow Fractionation. In: Williams SKR, Caldwell KD, editors. *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis*. Wien: Springer-Verlag.
134. Myers MN (1997) Overview of field-flow fractionation. *J Microcolumn Sep* 9: 151-162.
135. Borland LM, Kottegoda S, Phillips KS, Allbritton NL (2008) Chemical analysis of single cells. *Annu Rev Anal Chem* 1: 191-227.
136. Caldwell KD (2000) Steric field-flow fractionation and steric transition. In: Schimpf ME, Caldwell KD, Giddings JC, editors. *Field-flow fractionation handbook*. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 79-94.
137. Bégaud-Grimaud G, Battu S, Liagre B, Beneytout JL, Jauberteau MO, et al. (2009) Development of a downscale sedimentation field flow fractionation device for biological event monitoring. *J Chromatogr A* 1216: 9125-9133.
138. Battu S (2002) Sedimentation field-flow fractionation: methodological basis and applications for cell sorting. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 25 2193-2210.
139. Bégaud-Grimaud G, Battu S, Liagre B, Léger DY, Beneytout JL, et al. (2006) Pre-apoptotic subpopulation cell sorting from diosgenin apoptosis induced 1547 cells by Sedimentation Field-Flow Fractionation. The effect of channel thickness on sorting performance. *J Chromatogr A* 1128: 194-202.
140. Chmelik J (1999) Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation; I. A theoretical approach. *J Chromatogr A* 845: 285-291.
141. Davis JM (1986) General retention theory for sedimentation field-flow fractionation. ***Anal Chem*** 58 161-164.
142. Schure MR, Schimpf ME, Schettler PD (2000) Retention - Normal Mode. In: Schimpf ME, Caldwell KD, Giddings JC, editors. *Field-Flow Fractionation handbook*. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 31-48.
143. Caldwell KD, Cheng ZQ, Hradecky P, Giddings JC (1984) Separation of human and animal cells by steric field-flow fractionation. *Cell Biophys* 6: 233-251.
144. Caldwell KD, Nguyen TT, Murray TM, Myers MN, Giddings JC (1979) Observations on anomalous retention in steric field-flow fractionation. *Sep Sci Technol* 14: 935-946.

145. Martin M, Williams PS (1992) Theoretical basis of field-flow fractionation. In: Dondi F, Guiochon G, editors. *Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques*. Dordrecht: Kluwer. pp. 513-580.
146. Giddings JC (1992) Hyperlayer field-flow fractionation. *Am Lab (Shelton, Conn)* 24: 20D, 20F-20M.
147. Williams PS, Lee S, Giddings JC (1994) Characterization of hydrodynamic lift forces by field-flow fractionation. Inertial and near-wall lift forces. *Chem Eng Commun* 130: 143-166.
148. Davis JM (2000) Band broadening and plate height. In: Schimpf ME, Caldwell KD, Giddings JC, editors. *Field flow fractionation handbook*. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 49-70.
149. (2012) *Field-Flow Fractionation in biopolymer analysis.*; Williams SKR, Caldwell KD, editors. Wien: Springer-Verlag. 305 p.
150. Plockova J, Matulik F, Chmelik J (2002) Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation IV. Field programming achieved with channels of non-constant cross-sections. *J Chromatogr A* 955: 95-103.
151. Cardot P, Battu S, Sarrazin R (2006) Field flow fractionation separation device with a separation channel and a counter channel. *Eur Pat Appl. Ep: (Universite de Limoges, Fr.)*. pp. 20 pp.
152. Rasouli S, Assidjo E, Chianea T, Cardot PJP (2001) Experimental design methodology applied to the study of channel dimensions on the elution of red blood cells in gravitational field flow fractionation. *Journal of Chromatography B* 754: 11-21.
153. Van-Quynh A, Blanchart P, Battu S, Cledat D, Cardot P (2006) Analytical scale purification of zirconia colloidal suspension using field programmed sedimentation field flow fractionation. *J Chromatogr A* 1108: 90-98.
154. Cardot P, Battu S, Sarrazin R (2006) Swivel joint for conduits used in analytical chemistry. *Fr Demande. Fr: (Universite De Limoges, Fr.)*. pp. 25 pp.
155. Gossett DR, Weaver WM, Mach AJ, Hur SC, Tse HTK, et al. (2010) Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*: 1-19.
156. Mattanovich D, Borth N (2006) Applications of cell sorting in biotechnology. *Microb Cell Fact* 5: 1-12.
157. Roda B, Zattoni A, Reschiglian P, Moon MH, Mirasoli M, et al. (2009) Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends. *Anal Chim Acta* 635: 132-143.
158. Williams SKR, Lee D (2006) Field-flow fractionation of proteins, polysaccharides, synthetic polymers, and supramolecular assemblies. *Journal of Separation Science* 29: 1720-1732.
159. Cailleteau C, Micallef L, Lepage C, Cardot PJ, Beneytout JL, et al. (2010) Investigating the relationship between cell cycle stage and diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells using sedimentation field-flow fractionation. *Anal Bioanal Chem* 398: 1273-1283.
160. Leger DY, Battu S, Liagre B, Beneytout JL, Cardot PJP (2006) Megakaryocyte cell sorting from diosgenin-differentiated human erythroleukemia cells by sedimentation field-flow fractionation. *Anal Biochem* 355: 19-28.
161. Chianea T, Assidjo NE, Cardot PJP (2000) Sedimentation field-flow-fractionation: emergence of a new cell separation methodology. *Talanta* 51: 835-847.
162. Schallinger LE, Kaminski LA (1985) Sedimentation field-flow fractionation: a promising new bioseparations technique. *BioTechniques* 3: 124-128, 130-121, 134-125.
163. Bertrand J, Liagre B, Bégaud-Grimaud G, Jauberteau MO, Cardot P, et al. (2008) Study of diosgenin-induced apoptosis kinetics in K562 cells by Sedimentation Field-Flow Fractionation. *J Chromatogr B* 869: 75-78.
164. Corbière C, Battu S, Liagre B, Cardot PJP, Beneytout JL (2004) SdFFF monitoring of cellular apoptosis induction by diosgenin and different inducers in the human 1547 osteosarcoma cell line. *J Chromatogr B* 808: 255-262.
165. Leger DY, Liagre B, Cardot PJP, Beneytout JL, Battu S (2004) Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in HEL cell line and SdFFF monitoring. *Anal Biochem* 335: 267-278.
166. Bertrand J, Bégaud-Grimaud G, Bessette B, Verdier M, Battu S, et al. (2009) Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to Fas-induced apoptosis. *Int J Oncol* 34: 717-727.

167. Cailleteau C, Liagre B, Battu S, Jayat-Vignoles C, Beneytout JL (2008) Increased cyclooxygenase-2 and thromboxane synthase expression is implicated in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells. *Anal Biochem* 380: 26-34.
168. Leger DY, Battu S, Liagre B, Cardot PJP, Beneytout JL (2007) Sedimentation field flow fractionation to study human erythroleukemia cell megakaryocytic differentiation after short period diosgenin induction. *J Chromatogr A* 1157: 309-320.
169. Bégaud-Grimaud G, Battu S, Lazcoz P, Castresana JS, Jauberteau MO, et al. (2007) Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by sedimentation field flow fractionation. *Int J Oncol* 31: 883-892.
170. Lautrette C, Cardot PJP, Vermot-Desroche C, Wijdenes J, Jauberteau MO, et al. (2003) SdFFF purification of immature neural cells from a human tumor neuroblastoma cell line. *J Chromatogr B* 791: 149-160.
- , Perraud A, Akil H, Jauberteau MO, Cardot P, et al. (2012) Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation. *Anal Chem* 84: 1549-1556.
172. Kuranda K, Berthon C, Lepretre F, Polakowska R, Jouy N, et al. (2011) Expression of CD34 in hematopoietic cancer cell lines reflects tightly regulated stem/progenitor-like state. *J Cell Biochem* 112: 1277-1285.
173. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, et al. (2008) Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135: 1118-1129.
174. Bhullar JS, Subhas G, Silberberg B, Tilak J, Andrus L, et al. (2011) A novel nonoperative orthotopic colorectal cancer murine model using electrocoagulation. *J Am Coll Surg* 213: 54-60; discussion 60-51.
175. Cespedes MV, Espina C, Garcia-Cabezas MA, Trias M, Boluda A, et al. (2007) Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol* 170: 1077-1085.
176. Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, et al. (2005) Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1643-1648.
177. Dumartin L, Quemener C, Laklai H, Herbert J, Bicknell R, et al. (2010) Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. *Gastroenterology* 138: 1595-1606, 1606 e1591-1598.
178. Balke M, Neumann A, Szuhai K, Agelopoulos K, August C, et al. (2011) A short-term in vivo model for giant cell tumor of bone. *BMC Cancer* 11: 241.
179. Bertrand J, Liagre B, Bégaud-Grimaud G, Jauberteau MO, Beneytout JL, et al. (2009) Analysis of relationship between cell cycle stage and apoptosis induction in K562 cells by sedimentation field-flow fractionation. *J Chromatogr B* 877: 1155-1161.
180. Bayrak R, Yenidunya S, Haltas H (2011) Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in colorectal adenocarcinomas. *Pathol Res Pract* 207: 156-160.
181. Bumpers HL, Alosco TR, Wang HQ, Petrelli NJ, Hoover EL, et al. (1996) Consistent hepatic metastasis of human colorectal cancer in severe combined immunodeficient mice. *J Surg Res* 61: 282-288.
182. Chao C, Carmical JR, Ives KL, Wood TG, Aronson JF, et al. (2012) CD133+ colon cancer cells are more interactive with the tumor microenvironment than CD133- cells. *Lab Invest* 92: 420-436.
183. Fang DD, Kim YJ, Lee CN, Aggarwal S, McKinnon K, et al. (2010) Expansion of CD133(+) colon cancer cultures retaining stem cell properties to enable cancer stem cell target discovery. *Br J Cancer* 102: 1265-1275.
184. Kim MK, Osada T, Barry WT, Yang XY, Freedman JA, et al. (2012) Characterization of an oxaliplatin sensitivity predictor in a preclinical murine model of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 11: 1500-1509.
185. Lin L, Liu Y, Li H, Li PK, Fuchs J, et al. (2011) Targeting colon cancer stem cells using a new curcumin analogue, GO-Y030. *Br J Cancer* 105: 212-220.

186. Pang R, Law WL, Chu AC, Poon JT, Lam CS, et al. (2010) A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* 6: 603-615.
187. Uronis JM, Osada T, McCall S, Yang XY, Mantyh C, et al. (2012) Histological and molecular evaluation of patient-derived colorectal cancer explants. *PLoS One* 7: e38422.
188. Thalheimer A, Otto C, Bueter M, Illert B, Gattenlohner S, et al. (2009) Tumor cell dissemination in a human colon cancer animal model: orthotopic implantation or intraportal injection? *Eur Surg Res* 42: 195-200.
189. de Jong GM, Aarts F, Hendriks T, Boerman OC, Bleichrodt RP (2009) Animal models for liver metastases of colorectal cancer: research review of preclinical studies in rodents. *J Surg Res* 154: 167-176.
190. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, Patel BB, Majumdar AP (2010) The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer* 9: 212.
191. Sahoo NG, Bao H, Pan Y, Pal M, Kakran M, et al. (2011) Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study. *Chem Commun (Camb)* 47: 5235-5237.
192. Liu Z, Chen K, Davis C, Sherlock S, Cao Q, et al. (2008) Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res* 68: 6652-6660.
193. Yaron PN, Holt BD, Short PA, Losche M, Islam MF, et al. (2011) Single wall carbon nanotubes enter cells by endocytosis and not membrane penetration. *J Nanobiotechnology* 9: 45.
194. Tahara Y, Nakamura M, Yang M, Zhang M, Iijima S, et al. (2012) Lysosomal membrane destabilization induced by high accumulation of single-walled carbon nanohorns in murine macrophage RAW 264.7. *Biomaterials* 33: 2762-2769.
195. Sargent LM, Hubbs AF, Young SH, Kashon ML, Dinu CZ, et al. (2012) Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat Res* 745: 28-37.
196. Gutierrez-Praena D, Pichardo S, Sanchez E, Grilo A, Camean AM, et al. (2011) Influence of carboxylic acid functionalization on the cytotoxic effects induced by single wall carbon nanotubes on human endothelial cells (HUVEC). *Toxicol In Vitro* 25: 1883-1888.
197. Hitoshi K, Katoh M, Suzuki T, Ando Y, Nadai M (2011) Differential effects of single-walled carbon nanotubes on cell viability of human lung and pharynx carcinoma cell lines. *J Toxicol Sci* 36: 379-387.
198. Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Kim YA, Park KC, et al. (2011) Effect of dispersants of multi-walled carbon nanotubes on cellular uptake and biological responses. *Int J Nanomedicine* 6: 3295-3307.
199. Qu C, Wang L, He J, Tan J, Liu W, et al. (2012) Carbon nanotubes provoke inflammation by inducing the pro-inflammatory genes IL-1beta and IL-6. *Gene* 493: 9-12.
200. He X, Young SH, Schwegler-Berry D, Chisholm WP, Fernback JE, et al. (2011) Multiwalled carbon nanotubes induce a fibrogenic response by stimulating reactive oxygen species production, activating NF-kappaB signaling, and promoting fibroblast-to-myofibroblast transformation. *Chem Res Toxicol* 24: 2237-2248.
201. Bikfalvi A, Moenner M, Javerzat S, North S, Hagedorn M (2011) Inhibition of angiogenesis and the angiogenesis/invasion shift. *Biochem Soc Trans* 39: 1560-1564.
202. Soulet F, Kilarski WW, Antczak P, Herbert J, Bicknell R, et al. (2010) Gene signatures in wound tissue as evidenced by molecular profiling in the chick embryo model. *BMC Genomics* 11: 495.
203. Sack MJ, Roberts SA (1997) Cytokeratins 20 and 7 in the differential diagnosis of metastatic carcinoma in cytologic specimens. *Diagn Cytopathol* 16: 132-136.
204. Wildi S, Kleeff J, Maruyama H, Maurer CA, Friess H, et al. (1999) Characterization of cytokeratin 20 expression in pancreatic and colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 5: 2840-2847.
205. Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, et al. (2012) Keratin 20 - a diagnostic and prognostic marker in colorectal cancer? *Histol Histopathol* 27: 347-356.
206. Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, Iovino F, Francipane MG, et al. (2009) Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *J Immunol* 182: 7287-7296.
207. Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, Pocard M, Goere D, et al. (2012) Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res*.

208. Audollent R, Eveno C, Contreres JO, Hainaud P, Rampanou A, et al. (2010) Bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursors cells enhance the metastasis of colon cancer in an orthotopic murine model. *Int J Cancer*.
209. Subauste MC, Kupriyanova TA, Conn EM, Ardi VC, Quigley JP, et al. (2009) Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems. *Clin Exp Metastasis* 26: 1033-1047.
210. Xing F, Saidou J, Watabe K (2010) Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci* 15: 166-179.
211. Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, et al. (2009) Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15: 35-44.
212. Sanchez CG, Penforinis P, Oskowitz AZ, Boonjindasup AG, Cai DZ, et al. (2011) Activation of autophagy in mesenchymal stem cells provides tumor stromal support. *Carcinogenesis* 32: 964-972.
213. Chatterjee M, van Golen KL (2011) Breast cancer stem cells survive periods of farnesyl-transferase inhibitor-induced dormancy by undergoing autophagy. *Bone Marrow Res* 2011: 362938.
214. Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Martin-Castillo B, Vellon L, et al. (2011) Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle* 10: 3871-3885.
215. Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Delomenie C, et al. (2012) Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*.
216. Bijnsdorp IV, Peters GJ, Temmink OH, Fukushima M, Kruyt FA (2010) Differential activation of cell death and autophagy results in an increased cytotoxic potential for trifluorothymidine compared to 5-fluorouracil in colon cancer cells. *Int J Cancer* 126: 2457-2468.
217. Akil H, Perraud A, Melin C, Jauberteau MO, Mathonnet M (2011) Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One* 6: e25097.

Titre : Stratégies d'isolement et de caractérisation des cellules initiatrices de cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est le cancer le plus fréquent en Europe et la deuxième cause de décès par cancer dans le monde. Il est caractérisé par sa résistance aux traitements et sa capacité à récidiver suggérant la présence de cellules initiant le cancer (CIC) au sein de la tumeur. Ces cellules sont considérées comme cible majeure pour éradiquer la tumeur mais restent encore mal connues. La principale difficulté reste leur isolement et leur caractérisation afin de développer des thérapies ciblées. Dans ce sens, nous avons développé de nouveaux outils d'isolement et de caractérisation des CIC au sein de lignées humaines de CCR. Le tri cellulaire repose sur la SdFFF qui a permis un enrichissement en CIC à partir d'un panel de lignées. Leur capacité à initier des tumeurs a été testée sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet (CAM) ainsi que chez la souris SCID. Le couplage de différentes techniques d'isolement et de caractérisation nous a permis de mettre en évidence différentes sous-populations correspondant à des états de différenciation variables. Nous avons de même amélioré l'outil d'isolement, la SdFFF, par l'implantation d'une lame séparatrice, le « Splitt » qui a favorisé l'élution de ces populations rares sans dilution excessive de celles-ci. Un deuxième outil d'enrichissement en CIC a été le milieu défini d'OncoMid favorisant l'émergence de sphères flottantes ayant les caractéristiques des CIC. Dans ce cadre, la SdFFF a été utilisée pour suivre les modifications biologiques induites, tout comme elle a permis dans une dernière partie de suivre des événements induits par l'exposition de cellules à des nanotubes de carbone.

Mots clés : Cancer colorectal, Cellules Initiatrices de Cancer, SdFFF, outils d'enrichissements, outils de caractérisation

Title: Colorectal Cancer Initiating Cells isolation and characterization strategies

Colorectal cancer (CRC) is the most common cancer in Europe and the second leading cause of cancer death worldwide. CRC is characterized by treatment resistance and cancer recurrence suggesting cancer initiating cells (CIC) existence within the tumor. These cells are considered as target for eradicating the tumor but are little known. The main difficulty is CIC isolation and characterization to develop targeted therapies and discover new markers. In this sense, we have developed new tools for isolation and characterization of CIC in human CRC cell lines. The first is based on SdFFF cell sorting which CIC enrichment from a panel of human cell lines of CRC. To further characterize collected populations, capacity to initiate tumors was analyzed onto the chorioallantoic membrane of chick embryo (CAM) and in SCID mice. Coupling different techniques to isolate and characterized CIC permit to identify specific behavior between different subpopulations based on their differentiation state. Parallel optimization of characterization tools, SdFFF was improved by implementing a "Splitt" which promoted the elution of these rare populations without cells excessive dilution. A second tool enrichment CIC has been defined medium OncoMid of encouraging the emergence of floating spheres having CIC characteristics. In this context, SdFFF was used to monitor biological changes induced by this medium, just as it has in the last part of track events induced by exposure of cells to carbon nanotubes.

Keywords: Colorectal Cancer, Cancer initiating cells, SdFFF, enrichment and characterization tools