Title : Rôle Du Stroma Et La Cicatrisation En Réponse De Carcinome À Des Rayonnements Ionisants

INTRODUCTION

La cicatrisation et la carcinogenèse sont définis comme étant des processus complexes adaptatifs, qui sont commandés par des complexes communications entre l'hôte et le micro-environnement tissulaire. Au cours d'un processus de cicatrisation normal, la régénération et la réparation d'une plaie, dépend d'une variété de signaux qui coordonnent la réponse à la lésion. Ces procédés impliquent la prolifération cellulaire, la survie, la migration et qui sont contrôlées par des facteurs de croissance, les cytokines, ainsi que des signaux inflammatoires et angiogéniques. Ces signaux sont dérivés de multiples intra et extracellulaires des composants intégrés dans le micro-environnement de plaies et sont également impliqués dans le cancer. Par conséquent, un certain nombre de similitudes phénotypiques sont partagés par les plaies et les cancers dans la signalisation cellulaire et l'expression des gènes. Ces similitudes entre la cicatrisation et la cancérogenèse ont été reconnus par Haddow, et l'idée que «le cancer sont les plaies qui ne guérissent pas» a été défini par Dvorak. Plus récemment, des approches de génomique a révélé que la cicatrisation des plaies et signatures stromales ont été en mesure de prédire la progression métastatique et résistance à la chimiothérapie néoadjuvante dans les cancers du sein. Ceci souligne l'importance du microenvironnement dans la progression tumorale et la réponse aux traitements antitumoraux et suggère que la plaie induite par un rayonnement réponse de cicatrisation pourrait être responsable de la résistance à la radio de la tumeur.

La radiothérapie est la seconde modalité la plus efficace du traitement du cancer après la chirurgie et peut être utilisé soit seul, soit en association avec une chimiothérapie. Le principal effet anti-tumorale de la thérapie par rayonnement est l'induction de la mort des cellules tumorales, mais les découvertes récentes suggèrent que la radiothérapie aussi rapidement et de façon persistante modifie le micro-environnement tissulaire. Ces modifications affectent le phénotype cellulaire, le métabolisme des tissus, des échanges bidirectionnels et les événements de signalisation entre les cellules. Bien qu'il existe des preuves indiquant que ces changements pourraient contribuer aux effets antitumoraux de la radiothérapie, des observations cliniques et expérimentales indiquent que stroma irradié pourrait exercer des effets tumorigènes.

Groupe de MH.Barcellos-Hoff a montré une contribution majeure de TGF-β 1 produit par le stroma irradié à la cancérogenèse, comme dose plus élevée de la radiothérapie est connu pour stimuler le TGF-β 1 production. TGF-β 1 est le prototype de molécules pro-blessant avérés l'inducteur principal de stroma réactif, non seulement par la chimiotaxie affectant des fibroblastes, mais aussi de leur trans-différenciation des fibroblastes en réactifs, appelé myofibroblastes. TGF-β 1 réglemente également phénotype épithélial et a été spécialement décrit

comme une molécule stimulatrice puissant pendant la phase tardive de la cancérogenèse et la diffusion des métastases.

A côté de signal de TGF−β 1, la contribution de la voie Rho de réponse de rayonnement a été proposé par notre groupe et les autres. Rho GTPases sont une famille de médiateurs impliqués dans la signalization régulation dynamique du cytosquelette, la motilité, la division cellulaire et la régulation transcriptionnelle. Entre diverses Rho GTPases, RhoB a été décrite comme un déterminant de la radiosensibilité tumorale intrinsèque; qui agit en aval des intégrines alpha 3, 5 et HIF-1 α dans les cellules tumorales. Plus spécifiquement, l'expression de RhoB est augmentée par une variété de stimuli extracellulaires qui comprennent l'irradiation, EGF et TGF-β. La plupart des protéines Rho sont modifiés par l'attachement covalent d'un groupe de géranylgéranyle, mais RhoB peuvent exister sous une géranylgéranylées (RhoB-GG) ou un (RhoB-F) forme farnésylée. RhoB-F se localise dans la membrane cellulaire, le cytosquelette d'actine module, active le facteur nucléaire kappa B et favorise la croissance cellulaire. En revanche, RhoB-GG se localise dans les endosomes et induit l'apoptose des cellules. Un rôle pour RhoB en TGF−β réponses cellulaires induites telles que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et l'apoptose a été suggéré par une série d'études de puces à ADN, qui a montré que l'expression de RhoB a été régulée à la hausse par le TGF-β dans une variété de types de cellules tels que les kératinocytes, les cellules épithéliales de la glande mammaire de souris, des cellules d'hépatome et les fibroblastes dermiques. TGF-β stimule également la formation de fibres de stress actine dans les cellules transformées par Ras d'une manière qui est associée à la régulation positive de RhoB.

Plus récemment, notre groupe a souligné l'importance de la catastrophe mitotique dans la réponse tumorale à la radiothérapie, nous avons démontré que les agents ciblant les points de contrôle G2 / M sont de bons candidats pour la radiosensibilisation. Nous avons également montré que la réponse normale des tissus à la radiothérapie peut activer une réponse de cicatrisation. Le projet actuel vise à fusionner notre expertise à la fois sur les tissus normaux et tumoraux; l'étude du rôle du micro-environnement de la tumeur sur la guérison de la tumeur après irradiation. Ce travail nous permettra de fournir des informations sur l'implication de la réponse de cicatrisation de rayonnement sur la sensibilité aux rayonnements de la tumeur.

En outre, au cours des dernières années de nombreux efforts ont été concentrés sur les cellules tumorales circulantes (CTC), qui agit comme un biospsy liquide et sont détectables dans de nombreux cancers (y compris le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC)). Détection des CTC avait été liée à la signification pronostique dans différents cancers. Auparavant, pas beaucoup de travail a été fait sur l'effet de la radiothérapie au niveau de la CTC liée aux changements de micro-environnement de la tumeur en raison de l'absence d'une méthode de détection approprié, car il n'y a pas de données utiles disponibles sur CTC chez les patients subissant RT.

Actuellement, la seule technique approuvé par la FDA des États-Unis est la plate-forme CellSearch qui utilise l'adhésion cellulaire épithéliale molécule EpCAM pour la détection de la CTC. Cependant, il manque la détection des amas de cellules tumorales ou "micro-embols circulation de la tumeur" (CTM) et peut donc sous-estimer considérablement le nombre total de la CTC. En outre, les CTC dans le NSCLC perdent souvent marqueurs épithéliaux leur permettant d'échapper à la détection. En outre, il y avait des incohérences majeures entre les différentes méthodes. Dans les échantillons où CellSearch détecté peu ou pas de cellules, les comptages manuels généralement détectés CTC abondantes. Ces résultats sont compatibles avec un autre rapport indiquant l'efficacité limitée de CellSearch détection NSCLC CTC. Par conséquent, nous avons également évalué et comparé une méthode de détection par PCR récente développée par Charles Decreane à l'institut curie avec CellSearch.

OBJECTIFS

Dans la présente étude, nous avons proposé que les signaux de cicatrices dont TGF-β et RhoB qui sont activés par irradiation dans le stroma, pourraient renforcer l'agressivité de la tumeur après la radiothérapie. Par conséquent, la déficience de RhoB serait indirectement améliorer l'effet anti-tumoral de la radiothérapie.

Dans la première partie, notre objectif était d'enquêter sur cette diaphonie nous avons donc utilisé in vitro, un modèle de co-culture composée de cellules de carcinome du poumon (TC-1) et les fibroblastes primaires pulmonaires (WT). Nous avons également utilisé RhoB fibroblastes déficients (RhoB- / -) pour évaluer notre hypothèse.

En second lieu, nous avons étudié l'effet de microenvironnement irradié sur la croissance tumorale in vivo et enfin étudié possible la libération de cellules tumorales circulantes. Nous émettons l'hypothèse que la perturbation induite par le rayonnement de l'architecture de la tumeur pendant et après RT pourrait causer des cellules tumorales s'échappent dans la circulation périphérique. Au début de commencement de RT, quand de nombreuses cellules tumorales ont subi peu de dommages, la libération de ces cellules tumorales circulantes (CTC), a pu être détectée. Ces cellules, lorsqu'ils sont présents, peuvent contribuer au risque de métastases à distance. Nous avons essayé de répondre aux questions suivantes en utilisant un modèle orthotopique du poumon.

1 - Est-ce que l'irradiation locale du stroma modifier tumeur en est faite et la croissance?

2 - Est-ce que l'irradiation de la CTC de libération de la tumeur et / ou modifier leur niveau?

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - Cellules

C57BL6 (Wt) et RhoB-/ - souris ont été utilisées pour isoler les fibroblastes pulmonaires primaires. TC-1 murin (cellules d'adénocarcinome du poumon) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 avec 10% de sérum bovin foetal ou du milieu conditionné isolé de la culture de fibroblastes.

2 - Produits chimiques

L'inhibiteur de TGF-β récepteur de type I (ALK5, ALK4 et ALK7), SB 431542 a été utilisé à 10 μM et l'inhibiteur de MMP, O-phénanthroline à 100 μM. Les deux ont été achetés à Santa Cruz.

3 - Irradiation

Wt et RhoB-/ - Les fibroblastes ont été cultivés à 80% de confluence, le milieu de culture a été remplacé par du milieu sans FCS avant irradiation. Les fibroblastes ont été irradiées a 10 Gy avec Cs137 (IBL-637 (CIS-BioInternational, France) irradiateur gamma (débit de dose 1Gy/Min) 24 heures plus tard, le milieu conditionné (CM) de Wt et RhoB-/ - ont été recueillies et ajouté à cellules TC-1 et à gauche pour 24h plus. Surnageants et les cellules ont été préparés pour l'analyse Western Blot. On fait de même en tant que vice-versa avec TC-1 cellules irradiées.

4 – Clonogenic Assay

TC-1 cellules sont étalées dans des plaques à 6 puits à différentes concentrations en duplicate. L'irradiation se fait à 2 à 10Gy pour cellules TC-1, 4 heures après l'ensemencement et cultivée avec du milieu conditionné à partir irradié ou non irradié Wt et RhoB-/ - fibroblastes ou milieu de culture frais non conditionné.

5 – Wound Healing Assay

De type sauvage (Wt), RhoB-/ - fibroblastes et les cellules TC-1 ont été cultivées jusqu'à confluence dans des plaques de culture à 6 puits. Les cellules ont été irradiées à 10Gy. 24 heures plus tard les couches cellulaires ont été blessés à l'aide d'un embout de pipette 200 μl stérile et les cellules mortes sont éliminées par lavage, puis milieu conditionné a été ajouté. Les images sont capturées à 0h avec un contraste de phase Nikon, Japon à 10X et plaques ont été remises dans l'incubateur à se remettre de blessant. Après 24 heures plaques de culture ont été enlevés et les monocouches ont été photographiés à nouveau. Largeur de la plaie a été mesurée sur des copies sur papier des images.

6 - Electrophorèse et Western blot

Le lysat cellulaire sont préparés avec un tampon de lyse RIPA (Sigma Biotech). La concentration en protéine a été mesurée en utilisant un dosage de protéine Bio-Rad et les protéines ont été soumises à une électrophorèse. Les anticorps primaires ont été dilués dans une solution TBS-T (vimentine (E-5) dilué 1:1000 de Santa Cruz Biotechnology, snail (C15D3) 1:1000, β1 TGF (V) 1:250 tous de signalisation cellulaire, α SMA 1: 500 Abcam de GAPDH et de 1:5000 Millipore

pendant une nuit à 4 ° C, lavées lendemain dans du TBS-T et incubées avec du raifort conjuguée à la peroxydase anti-souris ou un anticorps secondaire anti-lapin. Les blots sont développés en utilisant SuperSignal ® West Pico chimioluminescence Substrat (Pierce Biotechnology, IL) selon les instructions du fabricant. Le signal de chimiluminescence à partir des membranes a été détectée et évaluée à l'aide de G-box iChemi XT4 dispositif d'imagerie numérique (Syngene Europe, Cambridge). quantification a été réalisée en utilisant le logiciel Image J. protéines relatifs expression sont normalisés à la valeur respective de GAPDH.

7 - Analyse des cytokines Array

Le milieu conditionné (non dilué) a été sondé pour sécrétée cytokine profilage à l'aide de la souris Raybio ® cytokines Anticorps tableau 3 et 4 kits selon les instructions du fabricant (RayBiotech ®; Norcross, GA, USA). La quantification a été faite par GeneTools de Syngene. Les données ont été importées dans une feuille de calcul Excel, normalisés par rapport un contrôle à travers les membranes et les valeurs finales ont été calculées

8 - Zymographie

Zymographie a été effectuée sur CM en utilisant des gels de zymogramme Novex (Invitrogen) suivant le protocole du fabricant, comme décrit précédemment.

9 - Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide Graphpad prisme 5. L'analyse statistique sont exprimés en moyenne ± SEM et analysé à l'aide de la variance et le test de Newman Keul étudiants avec une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Des expériences *in vivo*

10-Cells

Pour les expériences in vivo, ligne transfectées de façon stable avec la luciférase (A549luc) humain A549 du poumon adénocarcinome à cellules a été acheté à l'étrier Lifesciences Corp.

11-Animaux

Six semaines vieilles souris athymiques femelles ont été achetés auprès de Janvier (Elevage Janvier, Mayenne, France), et conservés dans des conditions appropriées. Une fois arrivé dans notre animalerie, les souris ont été divisées en trois groupes, ont subi l'implantation de xénogreffes suivant les protocoles décrits, et l'imagerie bioluminescente ultérieure. Les animaux ont été échantillonnés au point de temps dédié.

Toutes les expériences animales ont été approuvés par le comité d'éthique local (CEEA IRCIV / IGR de nu26, enregistré avec le Ministère français de la Recherche), et sont en conformité avec la directive 86/609/CEE européenne et des lois et règlements français.

Les souris ont été divisées en trois groupes:

1) Groupe 1: agir comme contrôle: la souris nude athymiques subi injection orthotopique de cellules A549luc dans le parenchyme de la gauche (n = 10).

2) Groupe 2: animaux ont subi une injection orthotopique de cellules A549luc dans le parenchyme du poumon gauche (n = 10). Après 2 semaines, l'irradiation a été effectuée, et l'analyse a été effectuée CTC 24H (n = 5) et 1 semaine (n = 5).

3) Groupe 3: les souris ont été irradiées avec 15Gy et l'implantation du poumon orthotopique de A549Luc a été réalisée après 5 semaines, puis l'analyse hebdomadaire de la CTC a été effectuée. Dans chaque groupe, une analyse comparative avec la PCR finale a été effectuée et Veridex après 2 semaines. (N = 10).

12- Transpleural injection orthotopique

Les animaux ont été anesthésiés en utilisant inhalation isofluorane et mis dans une position de décubitus latéral droit. Une incision cutanée de 2 cm a été réalisée ci-dessous l'omoplate gauche, et une dissection des muscles de la poitrine a été effectuée, afin d'exposer la couche costal. En observant le mouvement du poumon gauche à travers la plèvre, 3 x 10^6 cellules A549luc dans une solution contenant 20µL de milieu de culture, et 20µL de sarcome de souris matrice extracellulaire (Matrigel) a été directement injecté dans l'espace intercostal dans le poumon à un profondeur de 3 mm en utilisant une aiguille de calibre 29 fixée de façon permanente à une seringue ml d'insuline 0,5. L'incision de la peau a été fermée par une suture 4-0 en polypropylène.

13- Rayonnement ionisants

Rayonnements ionisants avec des rayons X Tube Comet MXR-225/22 fonctionnant à 200 kV/15 mA a été appliqué au thorax; la zone de tissu irradié était d'environ 2 à 2,5 cm^2. Le reste de l' corps au-dessus de la base du cou et sous le processus xiphoïde a été protégé contre le rayonnement en utilisant des blocs de plomb.

14-Imagerie bioluminescentes

La bioluminescence a été détectée par semaine à partir de cellules A549 exprimant la luciférase (A549luc) après l'implantation dans des souris pour surveiller la croissance de la tumeur.

15-Analyse de 16 CCT en collaboration avec C Decreane

Prélèvement de sang

Pour chaque point de temps dans expérimental prélèvement de sang de calendrier pour l'analyse PCR a été effectuée par voie rétro orbital (100 µl) et la ponction de la veine jugulaire (100 µl). Pour l'analyse de point de terminaison par Veridex intra-cardiaque prélèvement sanguin a été effectué (600 µl). Chaque sang de temps a été recueilli dans des tubes EDTA.

PCR

Détection des CTC par PCR a été réalisée à l'Institut Curie par Charles Decraene Groupe. Hebdomadaire de 100 µl de sang a été recueilli dans des tubes EDTA après piqûres rétro-orbitaires.

Kit de cellules épithéliales CellSearch (Veridex LLC, USA)

Une ponction intracardiaque de sang de 600 µl a été effectuée et a été testé pour la CCT en utilisant le système CellSearch et un protocole modifié sur la base de l'organigramme de l'étude.

16-Analyse de histopathologique

Une semaine après les études hémodynamiques, les souris ont été tuées par dislocation cervicale; cœur et les poumons ont été prélevés à des moments spécifiques. Les organes ont été fixés dans Finefix (Milestone médical, Italie), inclus dans la paraffine et coupé en 4 sections μm. Les coupes ont été colorées avec l'hématoxyline-éosine-safranine (HES) et Cytokératine coloration a été faite selon le protocole du fabricant.

RÉSULTATS

1. Signaux paracrines sécrétées par les fibroblastes ne modulent TC-1 radiosensibilité

Pour tester si la co-culture modifierait l'effet des rayonnements ionisants sur TC-1 la survie des cellules, nous avons produit conditionnés moyen de Wt et RhoB - / - fibroblastes et les habitués à la culture TC-1 dans le test de survie clonogénique. Milieux conditionnés par les fibroblastes ne modifient TC-1 radiosensibilité intrinsèque évaluée par des essais clonogéniques, ce qui suggère que les signaux déclenchés par irradiation sont plus forts que les signaux de survie déclenchés par fibroblasts. Intéressant, CM isolé du irradié Wt et RhoB-/ - fibroblastes ne modifient clonogénicité et survie de non-irradié TC-1, suggérant que des signaux paracrines sont produites par les fibroblastes irradiés et modifient TC-1 potentiel clonogénique.

2. Cicatrisation signaux sécrétés par les fibroblastes améliorer TC-1 migration

Nous avons évalué si l'irradiation modulée TC-1 motilité cellulaire et montré que TC-1 migration réduit avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Ensuite, nous avons montré que le milieu conditionné (CM) produit par les fibroblastes Wt non irradiées n'a eu aucun effet sur la CT-1 migration cellulaire, tandis CM produite par les fibroblastes irradiés 10 Gy stimulé de manière significative les cellules TC-1 capacité migratoire. Il est intéressant lorsque les deux Wt et cellules TC-1 sont co-10Gy-irradiées et co-cultivées, TC-1 migration cellulaire est revenu à un niveau normal.

Parallèlement, nous avons montré que CM produite par des non-irradiées RhoB-/ - fibroblastes TC-1 migration cellulaire ont augmenté de façon plus significative que les fibroblastes Wt, ce qui suggère que la carence RhoB promouvoir la production de signaux pro-migratoires. Cette stimulation est encore renforcée par 10 Gy irradiées RhoB-/ - fibroblastes mais réprimée revenir au niveau de commande lorsque RhoB - / - fibroblastes et TC-1 sont co-irradiées à 10 Gy.

3. TC-1 migration est médiée par MMP.

Pour chercher des médiateurs de TC-1 envahissement cellulaire et la migration, nous avons étudié le protéome de TC-1 en culture seule ou avec CM produite par Wt et RhoB-/ - fibroblastes irradiés ou non. Alors que la plupart des protéines testées (96) n'ont pas été affectées, la production d'IL-6, le bFGF, CXCL16, sTNFRI, MMP2, MMP3, ProMMP9 étaient significativement stimulé par le procédé de co-culture. Fait intéressant, CM à partir de

fibroblastes déficients RhoB modulés plusieurs protéines sécrétées par TC-1 de CM à partir de Wt, avec une augmentation marquée de la Pro MMP-9, MMP-3 et MMP-2.

Nous avons confirmé MMP induction par l'analyse de zymogramme. Nos résultats montrent une sécrétion faible de MMP 2 et MMP 9 quand TC-1 sont cultivées seules, légèrement améliorée lorsque TC-1 sont irradiées (10 Gy). CM des fibroblastes Wt irradiés ou non ne change pas le niveau et l'activité de la MMP-2/9 produite par TC-1, tandis que CM de RhoB-/ - fibroblastes irradiés ou non d'améliorer de manière significative le niveau et l'activité de proMMP2, MMP2 et MMP9. Ceci suggère que les fibroblastes déficients RhoB sécrètent des facteurs paracrines, qui restent à être identifiés, mais qui sont en mesure d'améliorer la sécrétion des MMP dans TC-1. Comme MMP sont connus pour dégrader la matrice extracellulaire, nous avons postulé qu'ils pourraient être impliqués dans la migration accrue de TC-1 et confirmé cette hypothèse en utilisant l'inhibiteur de MMP O-phénanthroline. Nos résultats montrent que O-phénanthroline inhibée TC-1 migration cultivée avec du milieu de CM produite par RhoB - / - fibroblastes irradiés ou non. Notez que dans les fibroblastes déficients RhoB, la sécrétion de MMP-2 et 9 n'a pas été modulée par irradiation ni par co-culture, en soutenant le fait MMP induction a été TC-1 médiée.

4. Wt mais pas RhoB - / - fibroblastes améliorer TC-1 envahissement par la sécrétion de TGF β1

Ensuite, nous avons étudié la stimulation des médiateurs pro-invasives produite par pds et RhoB-/ - fibroblastes lors de l'irradiation et a constaté que la production de TGF-β1 a en effet été stimulée par irradiation d'une manière dépendante de la dose dans les fibroblastes Wt mais pas dans RhoB-/ - fibroblastes. Lorsque Wt fibroblastes ont été cultivés avec CM recueillies auprès de TC-1, la production de TGF-β1 par les fibroblastes Wt a été renforcée, alors que la co-culture et co-irradiation de 10 Gy Wt à TGF-β réprimées induction. Nous avons confirmé en outre le rôle du TGF-β1 dans la fermeture des plaies accélérée des cellules TC-1 en utilisant le SB-431542, un inhibiteur du TGF-β. Nous avons remarqué que le SB-431542 fibroblastes inhibés induites TC-1 motilité cellulaire et retardé la fermeture de la plaie.

5. Production de TGF-β1 induit marqueurs de l'EMT dans TC-1

Ensuite, nous avons examiné si la variation du potentiel migratoire des cellules TC-1 a été associée à un phénotype modifié et l'induction de deux responsables de l'EMT, vimentine et snail, dans les cellules de carcinome. Rayonnements ionisants ne favorise pas la vimentine et snail expression dans TC-1, ni ne la co-culture avec des fibroblastes Wt soutenir les résultats de l'analyse de Scratch. Cependant, CM produite par les fibroblastes irradiés 10 Gy stimulées à la fois la vimentine et la protéine Snail expression dans TC-1 suggérant l'induction d'un phénotype EMT par des facteurs paracrines sécrétées par les fibroblastes irradiés. Étonnamment, co-irradiation de Wt fibroblastes et TC-1 expression de vimentine encore amélioré, mais n'a aucun effet sur snail, ce qui suggère que constaté par un essai de zéro la migration diminué n'a pas été associée à une altération du phénotype EMT.

CM de RhoB-/ - fibroblastes ne pas faire vimentine ni snail expression de la protéine dans TC-1 indiquant que la migration accrue observée par dosage de Scratch quand les deux types de cellules sont co-cultivées est médiée par un autre mécanisme. Cependant lors de l'irradiation, RhoB-/ - fibroblastes stimulent vimentine et snail dans TC-1. Comme pour Wt fibroblastes, co-irradiation de RhoB-/ - fibroblastes et TC-1 améliorer encore l'expression vimentine, mais n'a aucun effet sur la snail. Ces résultats suggèrent que différents et indépendants facteur paracrine sont produites par irradiation de fibroblastes et de moduler de façon indépendante la migration et EMT phénotype.

Effet de l'irradiation de l'hôte et microenvironnement tumoral (in vivo)

6. La cinétique de croissance de la tumeur et tumor bed effect (TBE)

Nous avons observé une croissance exponentielle de la tumeur dans le groupe 1 jusqu'à point final expérimental à 2 semaines. Tandis que dans le groupe 2, tumeur régresse en taille 1 semaine après l'irradiation.

Les expériences visaient à étudier l'influence de l'intervalle de temps entre l'irradiation du poumon et tumeur transplantation de cellules sur trois aspects différents de l'effet de bed tumoral (TBE): prendre de la tumeur, le taux de croissance, et la formation de métastases. TBE indique que les tumeurs implantées dans le stroma pré-irradié se développent plus lentement par rapport aux tumeurs à stroma non irradié et deviennent plus métastatique et radiorésistantes. Fidèle à TBE nos résultats du groupe 3 bioluminescence imagerie a montré l'absorption retardée des cellules tumorales ainsi que leur faible taux de croissance, par rapport au groupe de contrôle 1. ($p<0,0003$). Mais, à la captation tumorale de sametime était similaire dans les trois groupes et à l'intérieur paramètres expérimentaux aucune métastase n'a été observée dans le groupe 3 tumeurs implantées. Ces résultats suggèrent que dans cette tumeur des effets de l'encéphalite à tiques du système de tumeur prendre, le taux de croissance, et la formation de métastases différemment; mais pour tous les paramètres, l'effet péri avec le temps de plus en plus entre l'irradiation et la transplantation de cellules tumorales.

7. Brut et l'aspect microscopique de la tumeur

L'examen macroscopique de la tumeur implantée a montré que, après 2 semaines d'implantation orthotopique de luc + des cellules A549, la tumeur est bien localisée à l'apex du poumon gauche avec l'aspect normal du reste du poumon gauche et du lobe ie milieu caudale. Poumon droit apparaît également libre de toute pathologie visible. Aspect histologique montre tumeur anaplasique typique avec noyaux sombre teinté avec abondance de figures de mitose. La tumeur est localisée et sans aucun signe de rupture de la membrane basale des vaisseaux sanguins et les alvéoles.

8. Appearnce histologique de la tumeur et le parenchyme pulmonaire en 3 groupes

Aucune différence significative n'a été observée lors de l'examen macroscopique et microscopique des tissus pulmonaires portant la tumeur dans les trois groupes. L'examen microscopique de H / E coupes colorées ont montré que l'architecture du tissu pulmonaire est bien conservée dans les trois groupes en dehors de la propagation de la tumeur hétérogène entre les alvéoles et les vaisseaux. Dans le groupe 2, exsudative infiltration n'a été observée dans la lumière du vaisseau sanguin en raison de vaisseaux qui fuient après irradiation. Contrairement à la seconde moitié de la définition TBE pour augmentation envahissant; nous ni observé aucune perturbation dans la membrane basale des vaisseaux pulmonaires, ni une augmentation des dépôts de collagène a été apprécié dans le groupe 3 avec pré irradié bed.

9. CCT enumerationin après implantation orthotopique et irradiation

Cellules tumorales circulantes (CTC) sont considérés comme indicateur pronostique potentiel d'invasion et les métastases. Comparaison de la détection des CTC par PCR et CellSearch nous permet de montrer que la PCR est plus sensible dans la détection des CTC dans le sang périphérique des souris par rapport à CellSearch.

Dans le groupe de contrôle 1, le nombre médian de CTC détecté deux semaines après l'implantation orthotopique était de 90 (gamme 0-2250/100 µl de sang) en PCR et la gamme 0-1935/600 µl par dosage CellSearch.

Dans le groupe 2, le nombre médian de CTC détecté 2 semaines après implantation orthotopique était de 50 (gamme 0-50/100µl de sang) dans la PCR et 0/600 µl de sang par CellSearch. 24h apres irradiation, nombre médian de CTC détectés était de 110 (gamme 0-1180/100 µl de sang) par PCR et (gamme 0-316/600 µl de sang) par CellSearch. Post-irradiation 1 semaine le nombre médian était de 900 allant de 0-23300/100µl de sang par PCR et 0-1501/600 µl de sang par CellSearch. CTC étaient détectables dans le groupe 1 et 2 dans 1 semaine de l'implantation.

Dans le groupe 3, deux semaines après l'implantation orthotopique nombre médian de CTC détecté était de 35 allant de 0-1940/100µl de sang par PCR et 0-805/600µl de sang par CellSearch.

Nos résultats ont montré que nombre de CTC mesurée 2 semaines après la greffe dans les poumons non irradiés et irradiés à-dire des groupes 1 et 3 étaient similaires suggérant que le remodelage du stroma induite par irradiation ne pas moduler l'extravasation des cellules tumorales dans la circulation sanguine. Toutefois, lorsque la tumeur a été irradié une absorption massive de CTC dans le sang a été observée dès 24h par échantillonnage intracardiaque qui avait augmenté après 1 semaine d'irradiation.

10. Différence de détection des CTC par les sites de collecte de sang

A ce stade, nous supposons que le faible nombre de CTC détectées par voie rétro-orbital peut être lié au site de prélèvement de sang. Pour ce porpose, nous nous avons pris le sang de la veine jugulaire, en plus de la route rétro-orbitaire et intra-cardiaque. Nous avons observé que, aucun

CTC étaient détectables soit par voies veineuses orbitales et jugulaires rétro mais toujours au même point de temps, intracardiaque échantillonnage révèle un certain nombre de CTC.

Cela nous amène à sonder pour le piégeage potentiel de CTC à l'intérieur des cavités cardiaques. Pour cela nous avons fait porpose cytokératine coloration sur les parties noyées de paraffine de coeur, qui ont montré des cellules tumorales faiblement situés à l'intérieur des globules rouges dans les cavités cardiaques. Ce potentiellement confirmé notre hypothèse. Cytokératine coloration également montré une augmentation du nombre CTC piégées (entre les cellules des globules rouges) dans le groupe 2 après irradiation par rapport au groupe 1 et le groupe 3which est en accord avec nos résultats décrits précédemment.

11. Potentiel métastatique des CTC

Suivant une importante question se pose que si cette augmentation ne de cellules tumorales disséminées après irradiation a le potentiel de former des foyers ou non métastatique. À cette fin, nous avons injecté 5 souris nude (bénéficiaire) avec CTC collectées à partir de 800 µl de sang intracardiaque échantillonné à partir de 5 souris donneuses sélectionnés dans le groupe 2 qui ont plus de 1000 CTCs/100 µl de sang. Les souris ont été suivies pendant 2 mois pour la formation de la tumeur par imagerie par bioluminescence et on a observé aucune formation de tumeurs détectables dans les poumons ou l'autre ou tout autre site pendant le temps et toutes les souris sont restées en bonne santé et en vie.

Par conséquent, nous avons établi que, CTC détecté par PCR soit ou CellSearch sont épithéliales dans le phénotype associé à la tumeur d'origine qui sont libérés dans la circulation en raison de la réaction inflammatoire aiguë (vaisseaux qui fuient). Nous pouvons donc en déduire que soit ces cellules circulantes ne sont pas dans EMT et sont moins susceptibles de former niche métastatique soit dans le parenchyme pulmonaire réceptifs ou tout autre site métastatique potentiel comme la moelle osseuse ou leur nombre est très faible pour initier cascade metastaic.

DISCUSSION

Dans notre étude, nous avons étudié la diaphonie entre les cellules stromales et de carcinome après irradiation et postulé que les fibroblastes favoriseraient TC-1 migration de la tumeur après l'irradiation alors que la carence en RhoB une protéine décrite comme profibrogenic l'empêcherait. Nos données sont différentes de notre hypothèse initiale RhoB fibroblastes déficients améliorées TC-1 migration plus puissamment que les fibroblastes Wt déc. RhoB fibroblastes déficients stimulés MMP sécrétion cellules TC-1 favorisant ainsi leur migration, tandis que les fibroblastes stimulées Wt TC-1 migration via le TGF-β1 et l'induction de l'EMT dans cellules TC-1. Nous avons également constaté que TC-1 intrinsèque sensibilité au rayonnement n'a pas été modifiée par conditionnée moyenne (CM) produit en poids et RhoB fibroblastes déficients mais ce potentiel clonogénique de TC-1 a été affectée par des facteurs diffusibles sécrétées par les fibroblastes irradiés. Enfin, nous avons trouvé que la co-irradiation

des cellules tumorales et les fibroblastes inhibé à la fois du TGF-b1 et MMP induction et réprimés cellules TC-1 migration.

Nos résultats montrent que la radiosensibilité intrinsèque des cellules de carcinome TC-1 n'est pas modifiée par les médiateurs paracrines sécrétée par stroma non irradié mais montrent que la sécrétion de facteurs solubles par les cellules stromales irradiées favorise TC-1 migration et la fuite potentiel métastatique. Ce résultat est en accord avec la littérature et comme on s'y attendait, nous avons trouvé que le TGF-β1 a été un des facteurs de stimulation produites par des fibroblastes irradiés Wt. Groupe de MH. Barcellos-Hoff a démontré une contribution majeure pour le TGF-β1 produite par stroma irradié à la cancérogenèse. Le TGF-β1 est également connu pour être un inducteur principal de stroma réactif et de promouvoir la chimiotaxie et de fibroblastes en myofibroblastes leur transdifférenciation en activant l'expression de l'alpha-actine de muscle lisse (αSMA). La présence de cellules de myofibroblastes-comme, appelé la CAF, dans le stroma de la tumeur peut être une source de facteurs de croissance, mais pourrait également être impliqué dans le remodelage du tissu conjonctif permettant l'expansion et l'invasion des tumeurs. En outre, la fonction immunosuppressive TGF-β1 peut favoriser la croissance tumorale et l'expansion par induction d'anergie immunitaire dans le stroma de la tumeur.

L'utilisation de fibroblastes pulmonaires primaires isolées à partir de souris transgéniques déficientes RhoB a permis d'identifier une activation de trois protéines majeures TC-1 dans les cellules tumorales en culture les protéome avec des milieux conditionnés produits par ces fibroblastes: MMP, du bFGF et de l'IL-6. Production de MMP3, 9 et bFGF ont été spécifiquement constaté d'être stimulé dans les cellules tumorales en cas de co-cultivées avec des RhoB - / - fibroblastes mais refoulée lorsque les fibroblastes ont été irradiées. Comme suggéré par la littérature, nous avons postulé que cette augmentation de l'expression des MMP a été associé à l'invasion tumorale et l'inhibition de MMP en effet dans des conditions de co-culture TC-réprimé une migration comme évalué dans un essai de fermeture de plaie. A côté de modulation des propriétés de migration des cellules cancéreuses, RhoB - / - fibroblastes semble moduler à la fois le remodelage vasculaire et des signaux d'infiltration immunitaire dans les cellules tumorales. Les deux MMP9 et bFGF sont en effet impliqués dans la régulation de la fonction vasculaire après de fortes doses d'irradiation: MMP9 réglemente la vasculogenèse et le recrutement de cellules myéloïdes tandis que bFGF est un facteur pro-angiogénique majeur. Notre système de co-culture ne permet pas une évaluation directe de la contribution vasculaire et immunitaire: Par conséquent, plus d'expériences in vivo seront nécessaires pour conclure. Cependant, la notion que les cellules stromales pourraient favoriser un milieu immunostimulante est corroborée par notre conclusion simultanée de l'IL-6 induction dont la sécrétion est stimulée en cellules TC-1 quand elles sont cultivées avec un milieu conditionné par RhoB-/ - fibroblastes et encore renforcée lorsque cellules tumorales sont cultivées dans un milieu conditionné par irradiés RhoB-/ - fibroblastes. IL-6 est également régulée à la hausse par coculture avec des fibroblastes Wt, mais dans une moindre mesure. IL-6 est l'une des cytokines pro-inflammatoires et le mieux caractérisé nos résultats suggèrent fortement que, après une dose élevée de cellules

stromales de rayonnement sont en mesure de modifier le milieu et induit les cellules tumorales sécrètent des facteurs capables de modifier infiltrat immunitaire. Si nous pouvons modifier la réponse du stroma et milieu péri-tumoral pour déclencher immuno-stimulation (IL-6) vs (TGF-β) réponse doit immunosuppressive être étudiée en détail, mais nos résultats suggèrent que RhoB ciblage pourrait être un moyen d'atteindre cet objectif.

Enfin, et de façon plus intéressante, nos résultats apportent une vision complètement nouvelle et montrer que la co-irradiation des cellules tumorales et les fibroblastes abroger la migration des cellules tumorales. Ceci est plus adaptée à la situation clinique et en accord avec les résultats cliniques, mais conteste la publication précédente, y compris Ohuchida et al. et Hwang et al. papiers qui ont montré que la co-culture avec des fibroblastes irradiés améliore le potentiel invasif des cellules cancéreuses pancréatiques. Ils ont conclu que les interactions tumeur / stroma stimuleraient métastases après irradiation. Bien que nous avons confirmé que l'irradiation de fibroblastes (indépendamment de leur génotype, mais par des mécanismes distincts) favorise TC-1 potentiel invasif, ce set-up est mal adaptée à la situation clinique, comme stroma est irradié jamais seul, mais sur le co-irradiation contraire de tumeurs et le stroma environnant est toujours effectuées avec des marges de sécurité suffisantes. Par conséquent et de s'en tenir à la situation clinique, nous les fibroblastes et les cellules TC-1 de carcinome co-irradiés et dans ce cas, nos résultats mettent à une conclusion différente que nous montrons que co-irradiation des cellules tumorales et les fibroblastes réprimé les signaux pro-migratoires, ce qui suggère que contrairement à ce qui a été décrit précédemment radiothérapie plutôt empêché la dissémination métastatique que promu.

En conclusion, le composant stromal de la tumeur ne sécrètent des facteurs pro-migratoires en fonction de leur génotype. Fibroblastes Wt l'action pro-migratoire est principalement le TGF-β médiation alors que RhoB fibroblastes déficients stimulent la sécrétion de MMP. En outre et de façon intéressante RhoB carence dans le renforcement de la migration des cellules de tumeur stroma mais en même temps stimulé signaux pro-inflammatoires (IL-6) qui auraient une incidence sur le recrutement immunitaire et favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale. Enfin, les résultats de contestation de la vue qui irradie stroma favoriserait la migration de cellules de carcinome que nous montrons que, indépendamment de leur génotype co-irradiation de fibroblastes et de cellules de carcinome refoulées migration de cellules de carcinome.

Deuxièmement nos expériences in vivo, bien que préliminaires, tend à confirmer que les données démontrant in vitro qui irradie lit tumoral ne stimule pas la croissance de la tumeur et d'évasion. Des expériences ont démontré que les tumeurs à croissance dans le tissu déjà irradiés sont prédisposés à être plus métastatique. Cet effet a été autrefois connu sous le nom d'effet de lit tumoral. Le concept prédominant est que le système vasculaire et du tissu conjonctif transformé dans le voisinage de la tumeur est moins capable de soutenir la croissance de la tumeur. Cela peut avoir pour effet imprévu de créer plus de tumeurs résistantes (en raison de l'augmentation hypoxie). Cependant, les expériences de Milas et al. raisonnablement suggéré que la fréquence de

la libération des cellules tumorales dans la circulation était similaire dans les tumeurs en pré-irradiés et non irradiés lits, et la métastase accrue observée dans les tumeurs incorporés dans les tissus pré-irradiés était simplement un effet secondaire de la période de temps plus longue de ces tumeurs nécessaires pour atteindre un volume donné. En outre, une étude clinique récente a indiqué que les récidives après radiothérapie post-mastectomie ne sont pas associées à des comportements locaux plus agressifs ou réduction de la survie par rapport aux patients après mastectomie seuls. Ainsi, à ce stade, cette question reste ouverte et discutable. Compte tenu de ces observations, nous ne connaissons que peu de choses sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de médiation de la capacité métastatique accru de tumeurs expérimentales en développement dans un domaine pré-irradié.

La troisième partie de mon projet a été consacrée à la CTC après la radiothérapie. Chez les animaux traités avec la température ambiante pendant NSCLC, nos résultats ont montré qu'un grand nombre de cellules tumorales viables ont été souvent libérés dans la circulation, mais ces cellules semblaient être piégé dans la cavité cardiaque. La présence de CTC dans le sang périphérique a été confirmée par PCR, Cytokératine coloration et CellSearch. La tendance constante d'augmentation CTC RT-induite chez la souris est cliniquement pertinent pour les patients atteints avancer déjà stade de la maladie comme Tinhofer I et al démontrent pour la première fois que la migration induite par le rayonnement et la propagation systémique de cellules tumorales peuvent également se produire chez l'homme et a montré Le rôle de la signalisation d'EGFR, de l'augmentation induite par le rayonnement dans les nombres de CTC. Le rôle bénéfique de la radiothérapie dans le contrôle de la tumeur est bien établie et des études pertinentes suggèrent également que le rayonnement de la tumeur primaire pourrait non seulement conduire à une tumeur de destruction cellulaire et l'inhibition de la croissance, mais aussi d'augmenter le potentiel migratoire et invasif de survivre radiorésistantes sous-clones de cellules tumorales. Il établit clairement le principe que la RT peut causer desquamation des cellules tumorales viables dans la circulation.

Lorsque nous avons étudié la CTC de presse dans le groupe 1 (Control) et le groupe 3 (Pré irradié) de souris avec tumeur locale et localement avancé, nous avons trouvé même modèle de CTC de presse (nombre CTC moyenne reste la même). De nombreux facteurs pourraient avoir contribué de manière importante à ces observations, y compris le volume de la tumeur irradiée, la dose par fraction et la capacité de CTC libérés pour survivre dans la circulation. Nous croyons que nos résultats ouvrent de nouveaux domaines de recherche et appuyer le lancement de grandes études de viabilité de la CTC et libèrent avec différents schémas de traitement de radiothérapie, seuls ou en combinaison avec la chimiothérapie, mais d'autres expériences sont nécessaires pour conclure.

CTC qui entrent dans la circulation après le début de la RT sont très probablement avec l'expression du marqueur mésenchymateuses. Yu et al défini, que la progression du cancer du sein chez les patients en bonne corrélation avec ces CTC mésenchymateuses et Park et al décrit EMT des cellules tumorales implantées chez la souris induit comme RT. Au cours de RT,

l'acquisition de EMT phénotype pourrait faire CTC plus agressive et plus difficile à détecter. L'échec de la plate-forme CellSearch pour détecter un grand nombre de CTC que nous avons compté par PCR peut être due à la présence de MC et de la régulation à la baisse de marqueurs épithéliaux y compris EpCAM se produisant pendant EMT induite pendant RT. En raison de ces facteurs, la CellSearch méthodologie s'est révélée particulièrement insensible. L'abondance de groupes ou de cellules tumorales CTM après RT est liée à la perturbation de la tumeur vaste et pourrait avoir une valeur pronostique. Circulation microembolies tumorales peut être associée à un pronostic défavorable. Comme il est bien reconnu que les cellules stromales jouent un rôle clé dans la croissance tumorale, la présence de cellules non tumorales en grappes pourrait également avoir une importance dans le processus de métastase.

En accord avec les résultats rapportés après la chirurgie, le nombre de CTC augmente dans la circulation sanguine après une radiothérapie probablement due à une lésion vasculaire induite par le rayonnement induit et / ou par induction EMT dans les cellules tumorales. L'importance de ces CTC au développement métastatique est toujours sous enquête, mais il existe des preuves pour un effet promotrice de métastase de RT provenant d'études animales, par exemple Kaplan et d'autres ont rapporté une augmentation des taux de métastases pulmonaires chez des souris porteuses de tumeurs traitées avec la RT par rapport aux imposture irradiés contrôle, mais nous n'avions pas été en mesure d'observer chez la souris nude. En fait microenvironnement tumoral et l'hôte une réponse immunitaire joue un rôle important dans cette différence dans les résultats que des tumeurs pulmonaires primaires implantées en orthotopique se comportent de manière différente par rapport à celles implantées sous-cutanées. Cependant leur aspect phénotypique du génotype et reste le même.

Cellules disséminées ou CTC de tumeur primaire ne peut pas à la maison immédiatement à des sites de métastases avenir, mais plutôt se propager à d'autres micro-environnements, principalement les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Il reste un sujet de débat que si les cellules tumorales métastasent fait à d'autres organes par les ganglions lymphatiques ou leur présence dans le drainage lymphatique reflète simplement leur caractère invasif intrinsèque. Les cellules cancéreuses peuvent acquérir des mutations supplémentaires dans l'environnement favorable des ganglions lymphatiques qui augmentent leur tendance métastatique. Cette hypothèse peut fournir une explication rationnelle à plusieurs études génomiques présentant des similitudes limitées entre les tumeurs primaires et cellules disséminées. Cependant, à ce jour, il existe peu de preuves expérimentales soutenant un rôle indispensable pour les micro-environnements stromales intermédiaires dans la cascade métastatique.

Piégeage passif peut avoir un rôle dans l'ensemencement métastatique mais l'adhésion active et invasion est également essentielle pour la mise en place successive et la croissance de la tumeur. On sait peu des premières étapes de ce processus. Dans certains cas, la prolifération se produit à l'intérieur des vaisseaux sanguins dans d'autres cas, les cellules cancéreuses extravagate d'abord, puis prolifèrent. Les intégrines exprimées à la surface des cellules cancéreuses sont médiateur important dans ce processus. Ainsi, le micro-environnement peut exercer des effets

inhibiteurs sur les cellules malignes. Cependant, au cours de leur progression, les tumeurs échappent à ces signaux inhibiteurs et au lieu d'exploiter ces cellules stromales à leur profit dans les processus qui conduisent à la croissance inapproprié, l'invasion et les métastases.

Perspectives:

Les chercheurs sont de plus en plus «penser en dehors de la cellule cancéreuse" à fournir des indications sur la façon dont d'autres types de cellules et le microenvironnement de la tumeur (TME) de la croissance appui de tumeur et les métastases. Il s'agit notamment des cellules hôtes telles que les cellules normales des cellules endotheliales, des fibroblastes, des cellules mésenchymateuses et des cellules immunitaires, sur des sites distants et locaux à partir de l'emplacement où se produit la transformation maligne.

Le solde de ces interactions cellulaires à la fois détermine l'histoire naturelle des cancers et influence sa réponse au traitement. Cette dynamique tumeur hôte actif a stimulé l'intérêt pour la TME comme un objectif clé pour les médicaments anticancéreux. Le microenvironnement d'un cancer est maintenant perçue comme une partie intégrante du "paysage" d'une tumeur et de la physiologie que fonctionnellement ne peut être totalement dissociée de ce qui est traditionnellement appelé «cancer». Cela inclut des conditions de micro distinctifs, comme l'hypoxie, qui résultent de l'désordonnée système vasculaire caractéristique des tumeurs solides.
Parmi les cellules non cancéreuses potentielles dans le TME, les cellules stromales de cancer, y compris les cellules de fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules d'origine hématopoïétique ont émergé comme des acteurs essentiels dans la promotion de la prolifération tumorale. Ces cellules participent à la néovascularisation, l'invasion et la métastase ainsi que l'interaction avec les cellules du système immunitaire à "basculer l'équilibre vers un environnement tolérogène favorisant les cellules tumorales." RhoB avait été précédemment identifié en tant que membre de la signature de gène triple qui confère une forte activité prometastatic et pourrait conférer une résistance au traitement par ses actions sur la réglementation des microtubules ou en manipulant hôte tumeur MMP charge la sécrétion qui module la radiosensibilité. RhoGTPase particulier RhoB est impliqué dans toutes les étapes de la progression du cancer. Son rôle se limite comme on vient de le régulateur du cytosquelette remodelage de contribuer à la migration cellulaire et l'invasion du cancer car elle peut affecter les cellules tumorales à travers la transcription du gène, le transport intracellulaire de molécules de signalisation ou de modifier les interactions entre les cellules cancéreuses avec des cellules stromales environnantes. Cependant, l'induction spécifique de RhoB par TGF-β et son exigence en induite par le TGF-β indiquent que la migration et la signalisation RhoB induction pourrait être une cible pour une intervention thérapeutique dans les tumeurs malignes invasives.

Il reste à examiner si les fibroblastes ou CAF irradiés contribuent à l'évolution tumorale post-RT, alors que les molécules et les voies sont impliquées dans ce règlement. En outre, il reste à savoir si les fibroblastes et les CAF de tissus normaux réagissent à la température ambiante de

la même manière, ou si moyenne-haute-doses (8-10 Gy) emploient des effets différents que des doses plus élevées (15-20 Gy) dans ces cellules. Comme les tumeurs contiennent différents composants cellulaires et ils exercent des réponses différentes en même temps, provoqué par la température ambiante. Seulement si l'on considère globalement tous les événements, d'une manière de la biologie des systèmes de pensée, nous pourrions prédire plus précisément les conséquences ultimes de la thérapie. En divisant les endurées par les différents constituants du stroma de la tumeur sous différents régimes RT-nous permettra de choisir plus efficacement les programmes de traitement adéquat à RT.

Apparemment tumor bed ou irradiation de la tumeur peuvent améliorer l'invasion tumorale ou la métastase de tumeurs expérimentales, mais la preuve clinique de cet effet chez les patients humains reste incertaine. Littérature à l'appui ou contre tel effet probable chez les patients est basée sur des études majorly non randomisées rétrospectives. A ce stade, nous pouvons supposer que dans la tumeur primaire, une sous-population de cellules tumorales acquièrent un phénotype mésenchymateuses pendant la progression de la tumeur par la perte de leurs propriétés épithéliales (soit une baisse de réglementer EpCAM et CK) par EMT et pénétrer dans la circulation. Ces CTC spécifiques sont soupçonnés d'avoir des caractéristiques de cellules souches. Après extravasation dans des organes éloignés, ces cellules tumorales isolées (DTC) ré-exprimer leurs propriétés épithéliales par MET pour former des amas de cellules tumorales (de micrométastase). Une sous-population de CTC, qui peuvent ne pas être en mesure de subir EMT diffuser aussi par la circulation vers des organes éloignés, mais n'a pas les caractéristiques des cellules souches du cancer et, par conséquent, ne fait pas micrométastases. Ce sont les cellules principalement détectés par les technologies actuelles CTC, alors que les EMT induite CTC Sont manquées. Bearing à l'esprit la pertinence clinique d'un tel effet, il peut être important de planifier des études prospectives aborder clairement la question chez les patients cancéreux traités.

Il est largement attribuée que les composants du stroma de tumeurs solides jouent un rôle vital dans l'ensemble des réponses des tumeurs aux traitements. La radiothérapie est une modalité thérapeutique exclusif qui cible un volume tumoral défini indiquant que tous les types de cellules à l'intérieur du champ de rayonnement reçoivent la dose d'irradiation donnée. Cette insulte incite l'activation de la mort cellulaire ainsi que des dommages de cellules programmes qui influencent considérablement les résultats thérapeutiques. Par conséquent, il devient une entreprise de signification pour découvrir tous les signaux et les événements se produisant pendant et après le parcours du rayonnement dans les interactions stroma tumorales qui pourraient influer sur l'évolution de la tumeur et même le sort de métastases à distance secondaires potentiels.

Orientations futures

La radiothérapie est un traitement curatif établie pour les cancers épithéliaux et est une composante essentielle dans de nombreux régimes de modalités combinées modernes. Les cellules stromales associées tumorales sont génétiquement plus stables que les cellules tumorales et par conséquent, devraient être moins enclins à développer une résistance aux médicaments. Les cellules stromales de la tumeur peuvent également contribuer à la chimiorésistance des tumeurs si le ciblage des cellules stromales ou de leurs produits peut être une stratégie viable pour résoudre le problème de la résistance aux médicaments.

Diaphonie au sein du micro-environnement de la tumeur n'est pas limitée à la signalisation paracrine entre fibroblastes activés et les cellules malignes, mais aussi se produit entre résident différents et des types de cellules stromales éloignés. Il serait intéressant de comprendre comment le microenvironnement tumoral manipulé par RT contribue à la progression du cancer. Cette connaissance pourrait ouvrir la voie à l'élaboration de stratégies sur l'état de l'art visant à assurer un microenvironnement plus anti-tumorale efficace; surtout comment médiateurs solubles, en particulier des cytokines et des chimiokines libérées par les cellules tumorales et non tumorales en réponse à RT modifier la croissance des tumeurs et des réponses anti-tumorales. Cependant, les effets pro-ou anti-tumorales de nombreuses cytokines ou chimiokines sont pour la plupart inconnus. En fait, dans un contexte clinique, même le même médiateur peut agir comme une épée à double tranchant en exerçant des effets pro ou anti-tumorales. Par conséquent, plus l'information est nécessaire avant de conclure fermement sur le rôle de plusieurs cytokines dans le développement tumoral.

Ainsi, des modèles in vivo seront précieuses pour l'avenir la recherche translationnelle. Notre étude est parmi les premiers à étudier les effets de l'irradiation simultanée des deux in vitro, mais la validation de ces résultats tumeur et le stroma aide appropriée dans des modèles in vivo seront précieux. En utilisant des modèles in vivo a été une partie difficile de ce travail, mais de nombreux obstacles nous empêchait de mener des expériences In vivo en parallèle avec notre étude in vitro **1)** de l'infection CMH dans nos installations pour les animaux nous retenir des expériences pour 6-8 mois **2)** Difficultés liées au début mort de TGF β1 assommer souris **3)** l'inconvénient des modèles tels que les souris inactivées TGFbRII conditionnelles. Nous avons prévu d'étendre nos résultats à des expériences in vivo par surmonter ces difficultés et ces expériences sont actuellement en cours à l'aide RhoB animaux déficients et des souris Cre / lox déficiente et compétent pour le signal TGF-β.

Métastases à distance donne fréquemment échec loco-régional des cancers avancés après la chirurgie et RT. Toutefois, si la CTC de presse au cours de RT donnent lieu à des métastases, la connaissance de la nature et de la cinétique de cet événement pourrait nous permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, telles que l'accélération précoce ou l'intensification de la RT, ou de nouvelles modalités thérapeutiques combinées, y compris le piégeage au début de la CTC . En outre, les CTC et CTM RT-mobilisés signifient non seulement

des objectifs thérapeutiques potentiels, mais une source de nouvelles mesures de diagnostic. Des études successives de la CTC biologie et l'analyse moléculaire au cours du traitement et le suivi peuvent donner de nouvelles perspectives dans la détection de mutations importantes thérapeutique chez les patients avec des biopsies inadéquates. Dans l'avenir, nous allons également chercher des associations entre la composition cellulaire des marques communautaires, avant et après le traitement. Ces études seront également donner des preuves définitives sur l'association de CTC avec métastase ultérieure. Nous tenterons également de développer des tumeurs dérivées de CTC chez la souris nude.

Par ailleurs, nous allons également essayer d'identifier les éléments moléculaires et les voies de signalisation dans le microenvironnement de la tumeur pour chaque type de cancer. Dans l'identification in vitro de composants moléculaires dans le microenvironnement de la tumeur sans contamination du cytosol des cellules a été un défi, mais il peut être vaincu par les dernières techniques améliorées pour l'enrichissement et l'analyse. Ensuite, nous allons également envisager de surveiller les changements dans le profil moléculaire de micro par la progression de la tumeur. Ceci peut être utile pour identifier des cibles cellulaires ou de protéines qui ont subi des modifications. Moins mais non le moindre, la requête la plus importante sera de savoir comment le microenvironnement de la tumeur varie selon les différents types de cancer.