



HAL
open science

Évaluation du pouvoir transformant des vésicules extracellulaires à l'aide d'un biocapteur dans le cancer du côlon

Elodie Barthout

► **To cite this version:**

Elodie Barthout. Évaluation du pouvoir transformant des vésicules extracellulaires à l'aide d'un biocapteur dans le cancer du côlon. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0084 . tel-04087351

HAL Id: tel-04087351

<https://theses.hal.science/tel-04087351v1>

Submitted on 3 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

UMR INSERM 1308 CAPTuR « Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique »

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Oncologie

Présentée et soutenue par
Élodie Barthout

Le mercredi 14 décembre 2022

Évaluation du pouvoir transformant des vésicules extracellulaires à l'aide d'un biocapteur dans le cancer du côlon

Thèse dirigée par le **Pr Muriel Mathonnet** et le **Dr Barbara Bessette**

Présidente du jury

Pr Marie-Odile Jauberteau-Marchan, PU-PH, Service d'Immunologie et d'immunogénétique – CBRS ; UMR 1308 CAPTuR – Université de Limoges

Rapporteurs

Pr Christine Varon, PU, Équipe 4 du « Bordeaux Institute of Oncology Research » (BRIC) – Université de Bordeaux

Dr Jean-Marc Pascussi, CRCN Inserm, Équipe Signalisation, plasticité et cancer - Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) – Montpellier

Examinatrices

Dr Audrey Ferrand, CR1 Inserm, Équipe 6 de l'Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD) – Toulouse

Dr Barbara Bessette, MCU, UMR 1308 CAPTuR – Limoges

Pr Muriel Mathonnet, PU-PH, CHU de Limoges ; UMR 1308 CAPTuR – Limoges



*La plupart des gens disent que c'est l'intellect qui fait un grand scientifique.
Ils ont tort : c'est le caractère.*
Albert Einstein

Remerciements

Je souhaite remercier en première intention les membres de mon jury, **Christine Varon**, **Jean-Marc Pascussi**, **Audrey Ferrand** ainsi que la présidente **Marie-Odile Jauberteau-Marchan**. Merci infiniment d'avoir accepté et d'avoir pris le temps d'évaluer mes travaux de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier **Marie-Odile** de présider cette thèse. C'est symboliquement très important pour moi que vous teniez ce rôle, vous qui m'avez accueilli dans votre laboratoire il y a maintenant près de 5 ans lors de mon stage de M1. Et de nouveau pour celui de M2, au cours duquel vous m'avez encadré. Merci pour votre temps, votre écoute, vos conseils et votre bienveillance depuis le tout début. Savoir qu'en cas de besoin je pouvais me tourner vers vous a vraiment été d'une grande aide. Notamment lors du concours de l'ED, que j'ai magistralement raté. Vous m'avez raconté vous être tournée vers l'immuno sur un coup du sort et que ça a finalement été la meilleure chose qui pouvait vous arriver. À ce moment-là j'étais bien sûr très déçue de moi-même d'avoir échoué (et je n'étais clairement pas dans cet état d'esprit) mais avec le recul, je pense que l'avoir raté a été une des meilleures choses qui pouvaient m'arriver. J'ai finalement trouvé un autre projet qui me correspondait mieux alors merci beaucoup.

Évidemment, je remercie aussi mes directrices de thèse **Muriel et Barbara**. C'est grâce à vous si j'accède au grade de Docteur, vous qui m'avez fait confiance en me choisissant pour cette thèse. Merci de m'avoir permis de trouver ma place au sein du projet et d'avoir écouté ce que j'avais à dire. Merci aussi pour l'autonomie dont j'ai pu jouir durant ces 3 ans, autonomie qui m'a permis de découvrir des choses sur moi que je ne soupçonnais pas. C'est toute la beauté de la thèse d'ailleurs, ce cheminement personnel qui nous permet de mieux nous connaître mais aussi de développer des compétences qu'on pensait hors de notre portée. Je remercie aussi **Fabrice** qui a été très présent lors de ce projet puisqu'il faisait le pont entre nous et nos collègues physiciens. Merci d'avoir pris le temps (qui semblait parfois long) pour toutes les réunions et autres discussions.

Un grand merci à ma binôme physicienne **Élisa** avec qui j'ai partagé ce projet. On s'est souvent fait la réflexion mais je pense vraiment qu'on a eu beaucoup de chance de tomber l'une sur l'autre. En tout cas moi c'est certain. Le fait de devoir travailler en binôme était un facteur qui me stressait beaucoup puisqu'on parle quand même d'une collab de 3 ans

donc si l'entente est mauvaise l'expérience peut vite tourner au cauchemar mais c'était vraiment agréable et facile de travailler avec toi donc merci infiniment.

Je continue les remerciements du côté « professionnel » et la première personne que je tiens à remercier c'est évidemment mon coup de foudre de cette thèse, sans qui l'aventure n'aurait pas eu la même saveur, **ma Cécé**. Tu es devenue bien plus qu'une simple collègue avec qui c'est enrichissant de discuter de sciences (mais pas que), tu es devenue une amie très chère à mon cœur (comme tu le sais pertinemment). Vivre cette thèse à tes côtés a rendu les choses plus simples, savoir que dès que j'avais besoin d'extérioriser ma frustration et de râler (souvent, peut-être même un peu trop) je pouvais trouver refuge avec toi a été d'un grand soulagement. Mais tu as été bien plus qu'un soutien moral, que ce soit au labo ou dans le cadre personnel. Tu es une personne d'une bonté énorme et je pense que les gens comme toi sont rares alors merci de faire partie de ma vie. Je sais que la fin de nos thèses ne signe pas la fin de notre amitié et je t'en suis profondément reconnaissante.

Impossible d'évoquer la thèse et le labo sans évoquer **ma Tiff**. Ce merveilleux médecin que le Master a mis sur ma route mais que j'ai vraiment appris à connaître durant le stage de M2, 6 mois à partager le même espace vital (littéralement) et aussi notre quotidien. Encore une fois je suis extrêmement reconnaissante de t'avoir rencontré, en plus d'être un être merveilleux, tu es aussi un médecin profondément humain (ce qui est plutôt rare) mais aussi une très bonne scientifique. Tous les moments passés toutes les trois avec Cécé sont toujours un antidépresseur puissant pour moi alors merci pour ça, merci pour tous ces bons moments et pour ceux à venir.

Je tiens sincèrement à remercier tous les anciens du labo, ceux de l'EA3842 avec qui j'ai découvert la recherche et qui m'ont pris sous leur aile. Je pense notamment à **Hugo** qui m'a encadré pour mon M2, merci pour tout, tu as été d'une bienveillance rare, tu m'as énormément appris et grâce à toi ce fut une très bonne expérience.

Bien sûr je pense aussi à **Soso**, une des premières personnes que j'ai rencontré au labo et dont la bonne humeur est incroyablement communicative ! Tu es quelqu'un d'exceptionnel sur qui on peut toujours compter, tant professionnellement que personnellement et t'avoir côtoyé toutes ces années a été un réel plaisir.

Comment ne pas évoquer celui dont j'ai partagé le bureau durant 2 ans et qui, quand j'étais en stage, avait un talent certain pour arriver dans le bureau au moment où j'étais la moins mise en valeur, **Axel**. Tu m'en as entendu dire des choses (et pas que des belles) et on

en a passé un temps fou à discuter, que ce soit quand je n'étais encore qu'un petit poussin au labo ou quand je suis entrée en thèse. Une chose extraordinaire avec toi c'est qu'on peut parler de tout, sans jugement, tu as une largeur d'esprit folle et tu n'imposes jamais ton avis. Bien sûr cette cohabitation n'a pas toujours simple et parfois on ne pouvait plus se voir en peinture et c'est normal, on était face à face à littéralement 1 mètre de distance. Impossible de lever les yeux sans voir la tête de l'autre. En tout cas, toutes ces années tu as été toi aussi d'un grand soutien pour moi alors merci.

Merci à tous mes collègues doctorants, anciens à l'époque de l'EA3842 ou nouveaux à l'ère de l'UMR1308, et également aux stagiaires qui sont passés par là, pour tous les bons moments qu'on a pu partager au fil des années, qu'ils aient duré ou non. **Clément, Aude, Tarek, Camille, Éric, Marine, Hafidha, May, Héloïse, Charlotte, Marie** mais aussi **Léa et Boutaina**. Une grosse pensée à vous les filles qui arrivez au bout, force et courage ! Un petit mot supplémentaire pour **Lélé et Bouty**, des personnes incroyables au cœur énorme que je suis ravie d'avoir rencontré. Les discussions avec vous, qu'elles portent sur la science ou sur la vie privée, sont tellement enrichissantes alors merci du fond du cœur.

Merci à une merveilleuse personne qui est aussi un merveilleux médecin, **Nina**. Ton passage au labo a été une bouffée d'air frais, tu es l'équilibre parfait car tu es immensément gentille mais tu sais remettre les gens à leur place quand il faut et ça c'est pépite ! Tu es quelqu'un d'adorable avec qui il est impossible de ne pas passer un bon moment alors merci !

Plus généralement, merci à tous les membres du labo qui ont contribué de près ou de loin à ces travaux et à mon évolution personnelle au cours de cette thèse, les statutaires notamment ceux que j'ai connu en cours mais aussi les autres, les intervenants du Scientibus, les personnes que j'ai côtoyé lors de mes enseignements à l'IUT mais aussi les élèves qui m'ont eu comme enseignante et qui m'ont fait vivre cette expérience plus sereinement. Tout comme notre participation à la Nuit Européenne des Chercheurs avec Élisabeth (merci aussi pour ça d'ailleurs, je ne l'aurais jamais fait sans toi), les formations à l'enseignement et l'enseignement en lui-même ont été des expériences humaines incroyables qui valent vraiment le coup d'être expérimentées.

Je ne peux bien sûr pas terminer ces remerciements sans parler de mes proches. Je pense bien sûr à **ma Hine**, cette merveilleuse Tahitienne que la fac a mis sur mon chemin. Rien que pour ça je suis ravie de ne pas m'être épanouie dans les études que je faisais et de m'être tournée vers l'université. Tu as été mon coup de foudre de la Licence et je suis

tellement heureuse que les aléas de la vie ne nous aient pas éloigné ! Nos études ensemble se sont terminées il y a déjà 5 ans (on vieillit c'est terrible ...) et je te l'ai beaucoup dit mais je suis tellement heureuse que tu aies pu trouver ta voie et que tu t'épanouisses enfin dans ton métier ! Nos retrouvailles régulières pour une journée ou un week-end me permettaient de recharger mes batteries de bonheur alors merci pour tout ! Un jour je te rendrai visite à Tahiti et tu me feras découvrir cette merveilleuse île.

Évidemment je pense à **ma Élo**, mon coup de cœur de ces (longues) années de job étudiant à Quick. On a été embauchées à 1 semaine d'intervalle et ça a directement matché entre nous, c'était une évidence, l'étincelle était là ! Cette évidence a eu lieu il y a 9 ans quand même ... et on a grandi et évolué ensemble durant ces 5 ans. On a quitté le navire pratiquement au même moment aussi, parce qu'il était GRAND temps d'arrêter là mais on a appris tellement de choses durant cette expérience que même si y'en a eu (trop) des moments lunaires, je n'ai aucun regret. Aller bosser tous les week-end et te retrouver était un plaisir et non une contrainte et depuis, chaque moment passé ensemble est toujours un très bon moment. Merci d'être qui tu es et de faire partie de ma vie !

Ma Sam, je te fais tellement de déclarations d'amour depuis ces (presque) 15 dernières années que je ne sais même plus comment les commencer. Il est fort probable que je me répète à chaque fois mais les mots me manquent pour décrire notre relation. Tu es clairement la sœur que je n'ai jamais eu et j'ai dû faire quelque chose d'extraordinaire dans une autre vie pour qu'on me récompense de cette façon. On s'est rencontrées au collège, dans des circonstances particulières pour moi et tu as été fabuleuse dès la première minute. Tu es une personne immensément généreuse et bonne envers tout le monde. Tu n'as pas une once de méchanceté en toi et depuis le premier jour tu me fais me sentir incroyablement spéciale. Tu es ma famille et j'ai conscience de la chance que j'ai de partager ta vie. Tu es la meilleure amie qui existe et tu m'as toujours soutenu dans tous les aspects de ma vie, que tu sois d'accord avec moi ou pas. Tu m'as aussi offert le plus beau filleul du monde et je ne te remercierai jamais assez pour ça et pour tout le reste. Merci infiniment.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille au sens propre du terme, **Sylvie** ma maman, **Patrick** mon beau-père, **Luc** mon frère, **Catherine** ma belle-sœur et mes magnifiques nièces **Jessica** et **Léa**. Merci pour tout, pour tous ces moments où vous m'avez écouté parler de mes études sans rien comprendre mais en vous y intéressant quand même. Mamour, tu as tellement cru en moi qu'à force j'ai fini par y croire moi aussi, alors merci pour ça. Je sais pertinemment que peu importe mes choix, mes réussites ou mes échecs, tu seras toujours fière

de moi. Tu souhaites seulement mon bonheur et c'est la plus belle chose du monde. Là encore, je mesure la chance que j'ai de t'avoir comme maman car tous les parents ne sont pas comme toi alors merci d'être celle que tu es.

Pour résumer, parce que finalement j'ai écrit plus que ce que je pensais, un immense merci à toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à l'aboutissement de cette thèse. Auprès de chacun d'entre vous j'ai appris quelque chose, j'ai travaillé sur moi-même et j'ai grandi grâce à ça alors merci.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Table des abréviations.....	12
Table des illustrations.....	14
Table des tableaux.....	16
Préambule.....	17
Chapitre I. Le cancer colorectal.....	19
I.1. Le côlon.....	19
I.1.1. Anatomie et fonctions coliques.....	19
I.1.2. Histologie du côlon.....	20
I.1.3. Cryptes de Lieberkühn : réservoir fonctionnel de la paroi colique.....	20
I.1.3.1. Réservoir des cellules souches.....	21
I.1.3.2. Réservoir des cellules progénitrices.....	22
I.1.3.3. Réservoir des cellules différenciées.....	22
I.1.3.4. L'homéostasie intestinale : une affaire de plasticité.....	22
I.2. Le cancer colorectal.....	24
I.2.1. Épidémiologie et facteurs de risque du cancer colorectal.....	24
I.2.2. Les différentes formes du cancer colorectal : sporadique ou héréditaire.....	26
I.2.3. Oncogenèse colique.....	27
I.2.3.1. La voie conventionnelle de l'instabilité chromosomique (CIN).....	28
I.2.3.2. La voie d'instabilité microsatellitaire (MSI).....	28
I.2.3.3. La voie de la néoplasie dentelée ou voie de méthylation des îlots CpG (CIMP)	29
I.2.3.4. Les sous-types moléculaires de cancers colorectaux.....	29
I.2.3.5. Les oncogènes et suppresseurs de tumeurs impliqués dans la transformation colique.....	30
I.2.3.6. Les différents modèles de l'oncogenèse et cellule d'origine de la tumeur colique.....	33
I.2.3.6.1. Modèle hiérarchique.....	33
I.2.3.6.2. Modèle stochastique.....	34
I.2.3.6.3. Modèle de plasticité.....	34
I.2.4. Les nombreuses classifications du cancer colorectal.....	37
I.2.4.1. Classification histologique selon le grade tumoral.....	37
I.2.4.2. Classification selon le degré d'envahissement (pTNM).....	38
I.2.4.3. Classification moléculaire (CMS).....	40
I.2.4.4. Classification selon l'Immunoscore et immunité antitumorale.....	42
I.2.5. Prise en charge thérapeutique du cancer colorectal.....	45
I.2.5.1. Résection chirurgicale.....	45
I.2.5.2. Traitement chimiothérapeutique.....	46
I.2.5.3. Thérapies ciblées et immunothérapie.....	47
Chapitre II. Les cellules souches cancéreuses colorectales.....	50
II.1. Origine des cellules souches cancéreuses.....	50
II.2. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses colorectales.....	50
II.3. Stratégies de caractérisation des cellules souches cancéreuses.....	52
II.3.1. Stratégies phénotypiques.....	52
II.3.2. Stratégies fonctionnelles.....	53

II.3.3. Stratégie biophysique	54
II.4. Impact des cellules souches cancéreuses sur le processus clinique	56
II.4.1. Pertinence pour le pronostic et la prise en charge des tumeurs	56
II.4.2. Implications dans la résistance aux thérapies, la survenue de rechutes et la formation de métastases	57
II.4.3. Les cellules souches cancéreuses en tant que cible thérapeutique.....	59
Chapitre III. Les vésicules extracellulaires.....	62
III.1. Biogenèse des vésicules extracellulaires.....	62
III.2. Structure des vésicules extracellulaires	64
III.3. Méthodes d'isolement des vésicules extracellulaires.....	65
III.4. Rôles des vésicules extracellulaires dans le cancer colorectal.....	67
III.4.1. Les vésicules extracellulaires en tant que biomarqueurs	67
III.4.2. Rôles dans la progression tumorale	69
III.4.2.1. Rôles dans l'angiogenèse et la formation de métastases.....	70
III.4.2.2. Rôles dans la résistance thérapeutique	71
III.4.2.3. Rôles sur le système immunitaire	72
III.5. Les vésicules extracellulaires en tant que cible thérapeutique	73
III.6. Utilisation des vésicules extracellulaires comme outil thérapeutique.....	74
Objectifs de la thèse	76
Chapitre IV. Matériels et méthodes.....	78
IV.1. Culture cellulaire	78
IV.1.1. Lignées cellulaires et cultures primaires de patients.....	78
IV.1.2. Cellules mononucléées du sang périphérique ou PBMC	79
IV.1.3. Traitement des cellules par des EVs.....	79
IV.1.3.1. Traitement de la lignée SW480 et des CPP	79
IV.1.3.2. Traitement des PBMC	80
IV.2. Vésicules extracellulaires.....	80
IV.2.1. Isolement.....	80
IV.2.2. Caractérisation	81
IV.2.2.1. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	81
IV.2.2.2. Western blot.....	81
IV.3. Extraction des ARN totaux et RT-qPCR	82
IV.4. Cytométrie en flux.....	83
IV.4.1. Lignées cellulaires et CPP	83
IV.4.1.1. Expression des marqueurs souche	83
IV.4.1.2. Expression des checkpoints immuns.....	83
IV.4.1.3. Analyse du cycle cellulaire.....	84
IV.4.2. Cellules immunitaires	84
IV.4.2.1. Analyse des proportions cellulaires	84
IV.4.2.2. Expression des checkpoints immuns.....	85
IV.4.2.3. Analyse du niveau d'activation des cellules.....	85
IV.5. Mesure de la prolifération cellulaire	86
IV.6. Mesure de l'activité métabolique.....	87
IV.6.1. Des lignées cellulaires	87
IV.6.2. De la lignée SW480 traitée par des EVs	87
IV.6.3. Des CPP traitées par des EVs	87
IV.7. Tests de migration et d'invasion	87

IV.7.1. Test de migration	87
IV.7.2. Test d'invasion	88
IV.8. Mesure de la capacité d'auto-renouvellement	88
IV.9. Mesure de la signature électromagnétique (DEP-UHF)	88
IV.10. Analyses statistiques	89
Chapitre V. Résultats	90
Discussion et conclusion.....	131
Références bibliographiques	139
Annexes	148

Table des abréviations

5-FU : 5-FluoroUracile	EGF : Epidermal Growth Factor
ABC : ATP Binding Cassette	EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
ALDH :ALdéhyde DésHydrogénase	EVs : Extracellular Vesicles
APC : Adenomatous Polyposis Coli	FACS : Fluorescent Activated Cell Sorter
ARN : Acide RiboNucléique	GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
BMP : Bone Morphogenetic Protein	HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
CAF : Cancer-Associated Fibroblasts	ILV : IntraLuminal Vesicles
CBC : Crypt Base Columnar	KRAS : Kirsten RAt Sarcoma
CCR : Cancer ColoRectal	LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
CDK : Cyclin-Dependant Kinases	LE : Late Endosome
CIMP : CpG Island Methylator Phenotype	LGR5 : Leucine-rich repeat containing G protein coupled Receptor 5
CIN : Chromosome Instability	LOH : Loss Of Heterozygosity
CMF : CytoMétrie en Flux	LTc : Lymphocyte T cytotoxique
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	LTh : Lymphocyte T helper
CMS : Consensus Molecular Subtypes	mAbs : monoclonal Antibodies
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes	MET : MicroEnvironnement Tumoral
CS : Cellules Souches	MFI : Mean Fluorescence Intensity
CSC : Cellules Souches Cancéreuses	MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4	miRNA : microARN
DEP : DiÉlectroPhorèse	
DFS : Disease Free Survival	
EE : Early Endosome	

MLH1 : MutL Homolog 1

MMR : MisMatch Repair

MSI : MicroSatellite Instability

MSS : MicroSatellite Stability

MVB : MultiVesicular Bodies

NK : Natural Killer

NTA : Nanoparticle Tracking Analysis

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS : Overall Survival

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PD-1 : Programmed cell Death 1

PDC : Poorly Differentiated Clusters

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

PIP3 : Phosphatidyl-Inositol triPhosphate

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

pTNM : pathology Tumor Nodes Metastasis

ROS : Reactive Oxygen Species

SCNA : Somatic Copy Number Alterations

SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor

TAMs : Tumor-Associated Macrophages

TCR : T-Cell Receptor

TEM : Transition Épithélio-Mésenchymateuse

TGF- β : Transforming Growth Factor β

UHF : Ultra Haute Fréquence

VEGF : Vascular Epithelial Growth Factor

Wnt : Wingless and int-1

Table des illustrations

Figure 1 : Anatomies du côlon et de la paroi colique	19
Figure 2 : Structure des cryptes de Lieberkühn coliques	21
Figure 3 : Données épidémiologiques sur le cancer colorectal en France	25
Figure 4 : Liste des facteurs de risque modifiables ou non modifiables concernant le CCR	26
Figure 5 : La séquence adénome-carcinome : évolution d'un épithélium sain vers un carcinome	27
Figure 6 : Les cinq sous-types de cancer colorectal, établis sur la base du phénotype, des statuts mutationnels et de méthylation.....	30
Figure 7 : Modèles hiérarchique et stochastique de l'oncogenèse colique	33
Figure 8 : Le modèle de plasticité de l'oncogenèse colique	34
Figure 9 : Caractéristiques des cellules cancéreuses et zoom sur la plasticité cellulaire	35
Figure 10 : Les cinq stades de développement du cancer colorectal	39
Figure 11 : Classification pTNM (8ème édition).....	39
Figure 12 : Représentation schématique détaillée des sous-types moléculaires de cancer colorectal.....	41
Figure 13 : Différences observées entre les tumeurs colorectales proximales et distales ...	42
Figure 14 : Classification du cancer colorectal selon l'Immunoscore.....	43
Figure 15 : Mécanisme d'inhibition des lymphocytes T par les cellules tumorales <i>via</i> PD-1	45
Figure 16 : Stratégies thérapeutiques du cancer colorectal.....	49
Figure 17 : Cellules souches cancéreuses et niveaux d'hétérogénéité du cancer colorectal	52
Figure 18 : Techniques d'exploration des propriétés fonctionnelles des CSCs	53
Figure 19 : Principe de mesure de la signature électromagnétique d'une cellule	55
Figure 20 : Mécanismes de résistance thérapeutique attribués aux CSCs	57
Figure 21 : Stratégies thérapeutiques de ciblage des CSCs	59
Figure 22 : Biogenèse des vésicules extracellulaires	63
Figure 23 : Composition des vésicules extracellulaires	64
Figure 24 : Méthodes d'isolement des vésicules extracellulaires	66
Figure 25 : Rôles des EVs dans la progression du cancer colorectal.....	69
Figure 26 : Vue d'ensemble des rôles des EVs sur le développement métastatique	71
Figure 27 : Mécanismes de résistance thérapeutique médiés par les EVs	72
Figure 28 : Effets des EVs de CCR sur le système immunitaire.....	73
Figure 29 : Caractérisation de la lignée SW480 concernant l'expression des checkpoints immuns	121



Figure 30 : Incidence du traitement de cellules immunitaires par des EVs tumoraux sur leur proportion.....	123
Figure 31 : Incidence du traitement de cellules immunitaires par des EVs tumoraux sur leur activation.....	125
Figure 32 : Expression des checkpoints immuns par les lymphocytes T.....	127
Figure 33 : Expression des checkpoints immuns par les cellules NK.....	129

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification CMS du cancer colorectal	40
Tableau 2 : Les chimiothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal	46
Tableau 3 : Les thérapies ciblées approuvées pour le traitement du cancer colorectal	47
Tableau 4 : L'immunothérapie, option thérapeutique supplémentaire du cancer colorectal .	48
Tableau 5 : Marqueurs d'identification des CSCs et leurs rôles dans la progression du CCR	51
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques d'isolement des EVs	67
Tableau 7 : Les miARN dérivés des EVs et leurs rôles fonctionnels dans le CCR.....	68
Tableau 8 : Caractéristiques des cultures primaires de patients.....	78
Tableau 9 : Références des anticorps utilisés en western blot	82
Tableau 10 : Références des sondes Taqman utilisées	83
Tableau 11 : Références de l'ensemble des anticorps utilisés en cytométrie en flux	86

Préambule

En France, le cancer colorectal est la 2^{ème} cause de décès par cancer ; un quart de ces tumeurs sont diagnostiquées à un stade métastatique et près de 50% des patients détectés à un stade précoce développeront des métastases au cours de leur vie. Malgré une prise en charge thérapeutique variée ayant permis d'améliorer considérablement la survie des patients, les récurrences sont malheureusement fréquentes. Ces rechutes peuvent être la conséquence de résistances thérapeutiques ou de la persistance d'une maladie résiduelle microscopique. Ces deux événements sont imputables à la présence d'une faible sous-population de cellules au sein de la masse tumorale : les cellules souches cancéreuses. Ces cellules ont la capacité de s'auto-renouveler et de réaliser des divisions asymétriques donnant naissance à tous les types cellulaires tumoraux. Elles sont également capables d'initier une tumeur mais également de favoriser sa progression. Un des problèmes majeurs de la mise au point de stratégies thérapeutiques et de l'élimination de ces cellules est leur caractérisation, en raison de leur faible nombre (moins de 10% de la masse tumorale) mais aussi parce qu'elles expriment les mêmes marqueurs que les cellules souches normales. Ainsi, l'utilisation de marqueurs n'est pas suffisante et leurs propriétés fonctionnelles doivent également être explorées mais ces techniques sont coûteuses et longues à instaurer.

Depuis une dizaine d'années, un travail collaboratif avec un laboratoire de l'institut XLIM a permis la mise au point d'une méthode de caractérisation cellulaire basée sur les propriétés biophysiques des cellules. Un laboratoire sur puce (biocapteur) a été développé et permet d'analyser individuellement les cellules et de mesurer leur « signature électromagnétique ». Cette technique, précédemment testée dans le laboratoire sur un modèle de glioblastome, a démontré sa pertinence dans la discrimination des cellules souches cancéreuses par rapport aux cellules différenciées. Un des objectifs de mon projet de thèse a été d'appliquer cette méthode au cancer colorectal pour vérifier son intérêt dans ce modèle.

L'étude des vésicules extracellulaires et de leur implication dans la progression tumorale s'est intensifiée ces dernières années. Différents travaux portant sur le cancer colorectal ont témoigné de l'impact délétère des vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules tumorales sur d'autres types tumoraux mais également sur les cellules du microenvironnement telles que les cellules immunes. Le second objectif de ma thèse a été d'étudier ce transfert d'agressivité entre des cellules différenciées et des cellules souches de

différents stades de cancer colorectal, d'identifier les changements biologiques opérés et de déterminer si ces changements d'état étaient également détectables par le biocapteur.

Enfin, le dernier objectif de ma thèse a porté sur le transfert d'agressivité de vésicules provenant de cancer colorectal mais cette fois sur les cellules immunitaires et notamment sur les lymphocytes T et les cellules natural killer (NK). En fonction de l'origine des vésicules, provenant de cellules différenciées ou de cellules souches, nous avons voulu déterminer quelles étaient les conséquences de cet échange sur les principales actrices de l'immunité antitumorale.

Pour résumer, les objectifs de ma thèse ont été d'évaluer les signatures électromagnétiques des cellules de cancer colorectal selon leur phénotype puis de déterminer si un transfert d'agressivité causé par des vésicules extracellulaires pouvait être détectable par la mesure de cette signature. Pour finir, de déterminer si le transfert de vésicules extracellulaires de cancer colorectal entraînait l'inhibition des cellules immunitaires impliquées dans la lutte antitumorale. À long terme, l'analyse rapide que constitue la mesure de la signature électromagnétique des cellules tumorales de patients pourrait permettre d'évaluer précocement leur potentiel agressif et ainsi d'adapter la prise en charge afin de limiter les échecs thérapeutiques et la survenue de récurrences.

Chapitre I. Le cancer colorectal

I.1. Le côlon

I.1.1. Anatomie et fonctions coliques

Le côlon ou gros intestin, fait partie intégrante du système digestif, se situe dans la cavité abdominale et constitue la partie terminale de l'intestin. Il débute à partir du caecum par lequel il est relié à l'intestin grêle, et court jusqu'au rectum. Il mesure environ 1,5 mètre de long pour 4 à 8 cm de diamètre et se divise en quatre segments (Figure 1) :

- Le côlon droit ou côlon ascendant
- Le côlon transverse
- Le côlon gauche ou côlon descendant
- Le côlon sigmoïde

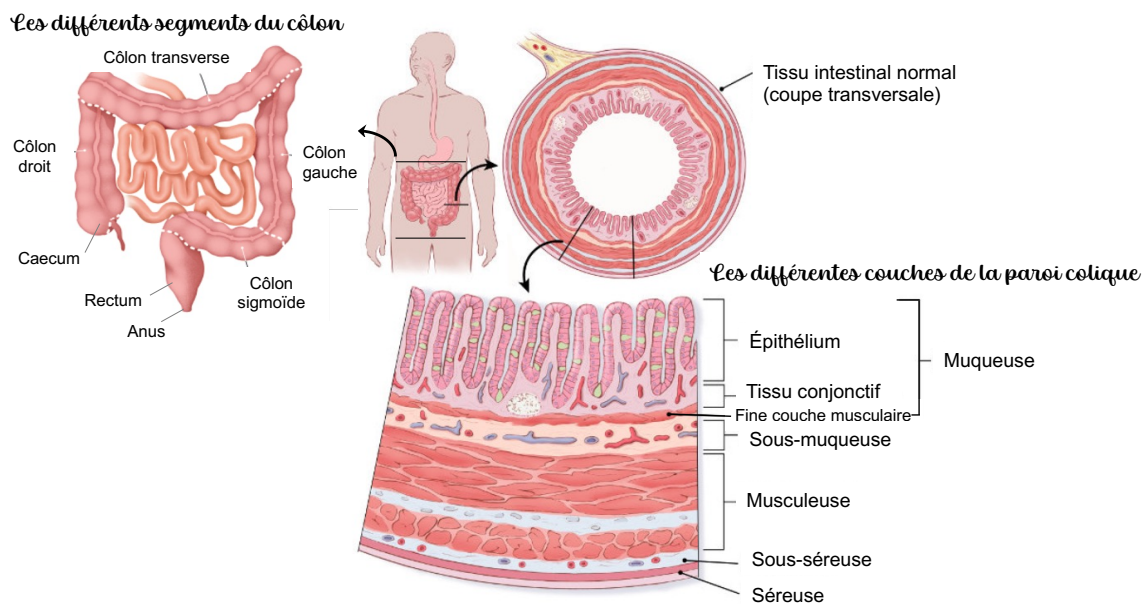


Figure 1 : Anatomies du côlon et de la paroi colique

(Créée à partir de l'Institut National du Cancer (INCa) (illustration de Pierre Bourcier) et du site web cancer.org)

Le côlon a pour principale fonction la fabrication et le stockage des matières fécales. Après digestion au niveau de l'estomac, le bol alimentaire se retrouve au niveau de l'intestin grêle où se réalise la majorité de l'absorption des nutriments. Ensuite, le chyme obtenu, constitué des résidus alimentaires, transite vers le gros intestin sous forme liquide où auront lieu l'absorption de l'eau, d'électrolytes et de certaines vitamines ainsi que le mélange des résidus alimentaires non digérés et non digestes avec le mucus et les bactéries intestinales. Se

forment les selles qui, au fur et à mesure de leur progression dans le côlon, vont se durcir et se mouler jusqu'à atteindre le rectum. Enfin, un signal sera déclenché pour indiquer la nécessité d'évacuer les fèces *via* l'anus (Greenwood-Van Meerveld, Johnson, et Grundy 2017).

I.1.2. Histologie du côlon

La paroi colique est composée de plusieurs couches successives avec, de la lumière intestinale vers l'extérieur (Figure 1) (S. Kong, Zhang, et Zhang 2018) :

- La muqueuse tapissant l'intérieur du côlon, composée d'une monocouche de cellules épithéliales. Les principales fonctions de la muqueuse sont d'absorber et de transporter les nutriments, le maintien de l'humidité tissulaire ainsi que la protection contre les agents pathogènes ou corps étrangers.
- La sous-muqueuse constitue une matrice extracellulaire plutôt fine, contenant des nerfs ainsi que des tissus lymphatique et conjonctif permettant le soutien de la muqueuse.
- La musculature constituée de fines couches de fibres musculaires permettant les mouvements péristaltiques facilitant l'avancée du chyme le long de l'intestin.
- La séreuse, couche la plus externe, est une membrane de tissu lisse faisant partie intégrante du péritoine (membrane entourant les organes abdominaux).

I.1.3. Cryptes de Lieberkühn : réservoir fonctionnel de la paroi colique

L'épithélium de la muqueuse colique n'est pas constitué d'une couche linéaire de cellules mais se constitue de milliers d'invaginations nommées « cryptes de Lieberkühn » (Figure 2). Ces cryptes constituent le réservoir fonctionnel de la paroi colique puisqu'elles renferment l'ensemble des cellules nécessaires au renouvellement complet de l'épithélium, réalisé entre 4 et 5 jours. Trois catégories de cellules aux propriétés bien distinctes résident dans ces entités : des cellules souches hautement proliférantes dans le fond des cryptes donnant naissance à des cellules progénitrices allant elles-mêmes se diviser en cellules différenciées retrouvées au sommet au niveau de la lumière colique (Gehart et Clevers 2019).

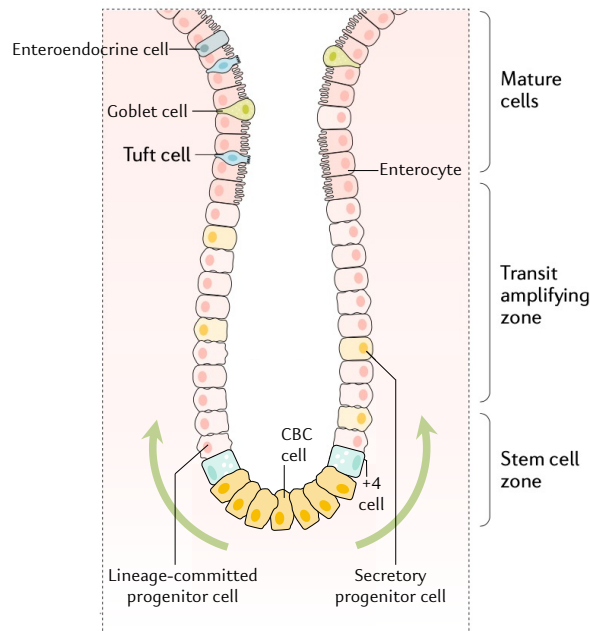


Figure 2 : Structure des cryptes de Lieberkühn coliques

(Adapté de Gehart et Clevers, 2019)

I.1.3.1. Réservoir des cellules souches

Au fin fond des cryptes de Lieberkühn se trouve le réservoir de cellules souches (CS) intestinales. Il en existe deux types : les « crypt base columnar cells » (CBC) et les cellules +4. Les CBC, au moment de leur découverte en 1974 (H. Cheng et Leblond 1974), ont été décrites comme des cellules continuellement cyclantes présentes à la base des cryptes. Effectivement, ces CBC se caractérisent par la forte expression de LGR5 étant un marqueur de prolifération ainsi qu'un potentialisateur de la voie de signalisation Wnt. Ces cellules se divisent une fois par jour et sont capables de division asymétrique : elles ont la capacité de s'auto-renouveler et donc de régénérer le pool de CBC, mais également la possibilité d'engendrer tous les types cellulaires intestinaux (Gehart et Clevers 2019).

Les cellules +4 tiennent également leur nom de leur localisation puisqu'elles se trouvent en aval des CBC en remontant la crypte et en amont de la zone de cellules progénitrices. Elles sont caractérisées par l'expression intense de BMI1 et constituent, à ce titre, un pool de cellules plutôt quiescentes. Leur appartenance à la catégorie des cellules souches a fait débat durant de nombreuses années suite à leur découverte en 1978 (Potten *et al.* 1978) pour cause de ce caractère quiescent. Leur contribution à l'homéostasie intestinale est à l'heure actuelle encore sujette à débat ; toutefois, leur rôle dans la réparation tissulaire intestinale à la suite d'une lésion est quant à elle bien établie. Les cellules +4 sont maintenant considérées comme des cellules souches « de réserve » possédant une forte résistance aux rayonnements et permettant de reconstituer le pool de CBC si nécessaire (Gehart et Clevers 2019).

I.1.3.2. Réservoir des cellules progénitrices

Les cellules souches intestinales vont pouvoir réaliser des divisions asymétriques et ainsi se diviser en cellules progénitrices, occupant quant à elles le tiers médian des cryptes de Lieberkühn : la zone d'amplification cellulaire ou « transit amplifying zone » (Figure 2). Ces progéniteurs (ou cellules TA) sont fortement proliférants et vont migrer vers la lumière intestinale tout en s'engageant progressivement vers un lignage cellulaire (Barker 2014). La première étape de cette différenciation est la décision du type de lignage : de sécrétion ou d'absorption. Cette étape est dépendante des signaux de la voie Notch : une activation de cette voie mène au devenir de cellule d'absorption tandis que l'inverse détermine la spécialisation en cellule de sécrétion. De plus, le ratio de cellules appartenant à chaque lignage est finement régulé et déterminé par des phénomènes d'inhibition latérale que l'on retrouve dans les interactions ligand / récepteur de la voie Notch (Gehart et Clevers 2019).

I.1.3.3. Réservoir des cellules différenciées

Une fois leur course terminée, les cellules précédemment progénitrices sont maintenant totalement différenciées et retrouvées au sommet de la crypte au niveau de la lumière intestinale (Figure 2). Le réservoir de cellules coliques matures compte quatre catégories de cellules dont un type d'absorption et trois types de sécrétion (Gehart et Clevers 2019; S. Kong, Zhang, et Zhang 2018) :

- Les entérocytes, cellules d'absorption, constituent le type cellulaire majeur de l'épithélium intestinal (> 80%). Il s'agit de cellules cylindriques ayant pour rôles l'absorption de nombreux nutriments et la sécrétion d'immunoglobulines.
- Les cellules caliciformes ou « goblet cells » représentent environ 10% des cellules épithéliales intestinales. Elles vont sécréter du mucus permettant la lubrification et facilitant le passage du bol alimentaire tout en protégeant l'épithélium des enzymes digestives.
- Les cellules entéroendocrines sont spécialisées dans le contrôle du métabolisme par la sécrétion de diverses hormones dans la circulation sanguine.
- Les cellules tuft, les plus rares des cellules intestinales (< 0,4%), sont impliquées dans la régulation immunitaire et notamment dans la protection contre les helminthes.

I.1.3.4. L'homéostasie intestinale : une affaire de plasticité

Le compartiment des CBC est capable de se régénérer lui-même via l'auto-renouvellement. La capacité des cellules +4 à reformer le pool de CBC en cas de lésion a été

évoquée précédemment mais il ne s'agit pas de la seule réserve. En effet, de nombreuses études ont démontré qu'une grande variété de cellules était capable de remplir cette fonction, même déjà engagées dans un processus de différenciation ou même tout simplement déjà pleinement différenciées. En l'absence de CS, des progéniteurs de cellules de sécrétion ou encore les cellules entéroendocrines et les cellules tuft, sont capables de migrer vers la niche, de se dédifférencier et de fonctionner comme les CBC. Il en va de même pour le lignage d'absorption. Ces cellules ne semblent pas contribuer au renouvellement normal de l'épithélium intestinal mais sont capables de repeupler la crypte en cas de lésion menant à la perte du réservoir de cellules souches (Gehart et Clevers 2019; Guoli Zhu, Hu, et Xi 2021). Ainsi, le compartiment cellulaire intestinal est hautement plastique afin de permettre le maintien de l'homéostasie mais aussi l'intégrité de l'épithélium.

En raison de l'importance des CS, l'anatomie des cryptes de Lieberkühn est finement régulée et leur permet d'être pleinement protégées : c'est le rôle de la niche. Incontestablement, le processus de digestion requiert un environnement particulièrement hostile (sécrétion d'enzymes, présence de bactéries ...) et potentiellement délétère pour ces cellules. Les CBC se divisent tous les jours et doivent donc au mieux se protéger pour limiter les risques de dommages à l'ADN. Les propriétés spatiales de la crypte permettent aux CS intestinales de ne pas se retrouver en contact direct avec le processus digestif et les différents types cellulaires présents au sein de la niche jouent un rôle protecteur notamment par leurs sécrétions. Cette niche n'est pas seulement constituée des cellules composant l'épithélium colique mais également de cellules stromales non-épithéliales telles que des myofibroblastes, des cellules hématopoïétiques ou encore des neurones (Santos *et al.* 2018). L'ensemble de ces cellules va délivrer des signaux paracrines aux CS dictant l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation *via* quatre voies principales (Gehart et Clevers 2019) :

- La voie Wnt, actrice majeure dans le maintien du pool de CS ainsi que dans le processus de différenciation de ces cellules. Les sécrétions paracrines créent un gradient le long de la crypte avec un niveau élevé de Wnt au fond puis une perte progressive jusqu'à la lumière intestinale.
- La voie Notch bloque la différenciation des CS vers un type de cellules de sécrétion permettant à la fois de maintenir les CS au fond de la crypte mais également de réguler le ratio entre les lignées de sécrétion et d'absorption tel qu'évoqué précédemment.
- La voie des BMP (Bone Morphogenetic Protein) va contrecarrer les signaux prolifératifs et de ce fait promouvoir la différenciation des cellules souches intestinales.

Tout comme la voie Wnt, la voie des BMP présente un gradient le long de la crypte avec cette fois-ci une forte intensité proche de la lumière colique (Guoli Zhu, Hu, et Xi 2021).

- La voie de l'EGF (Epidermal Growth Factor) va permettre de contrôler le taux de prolifération des CS mais ne semble pas nécessaire au maintien de leur identité (Gehart et Clevers 2019).

Malgré cette fine régulation de l'homéostasie intestinale, de nombreux évènements peuvent gouverner la survenue d'un cancer.

I.2. Le cancer colorectal

I.2.1. Épidémiologie et facteurs de risque du cancer colorectal

La terminologie de « cancer colorectal » (CCR) regroupe les cancers touchant le côlon et ceux touchant le rectum. Les données épidémiologiques font rarement la distinction entre ces deux types de tumeurs c'est pourquoi seront présentées les informations concernant le cancer colorectal de façon générale. Le CCR est l'un des cancers les plus fréquents dans le monde, notamment dans le monde occidental où son incidence ne cesse de progresser depuis plus de 20 ans. Avec près de 1 400 000 nouveaux cas par an il représente 15% de l'ensemble des cancers (<https://www.arcagy.org/infocancer/>).

En France, le CCR occupe la 3^{ème} place des cancers les plus fréquents chez les hommes, derrière les cancers de la prostate et du poumon ; et la 2^{ème} place chez les femmes devant le cancer du poumon et derrière le cancer du sein (Figure 3) (Panorama des cancers édition 2022, INCa). Il touche chaque année plus de 43 000 personnes et va entraîner la mort de 17 000 individus annuellement, ce qui le classe 2^{ème} cause de décès par cancer en France (2^{ème} chez l'homme et 3^{ème} chez la femme) (santepubliquefrance.fr).

NOMBRE DE CAS EN 2018 ET ÉVOLUTION
DU TAUX D'INCIDENCE ENTRE 2010 ET 2018

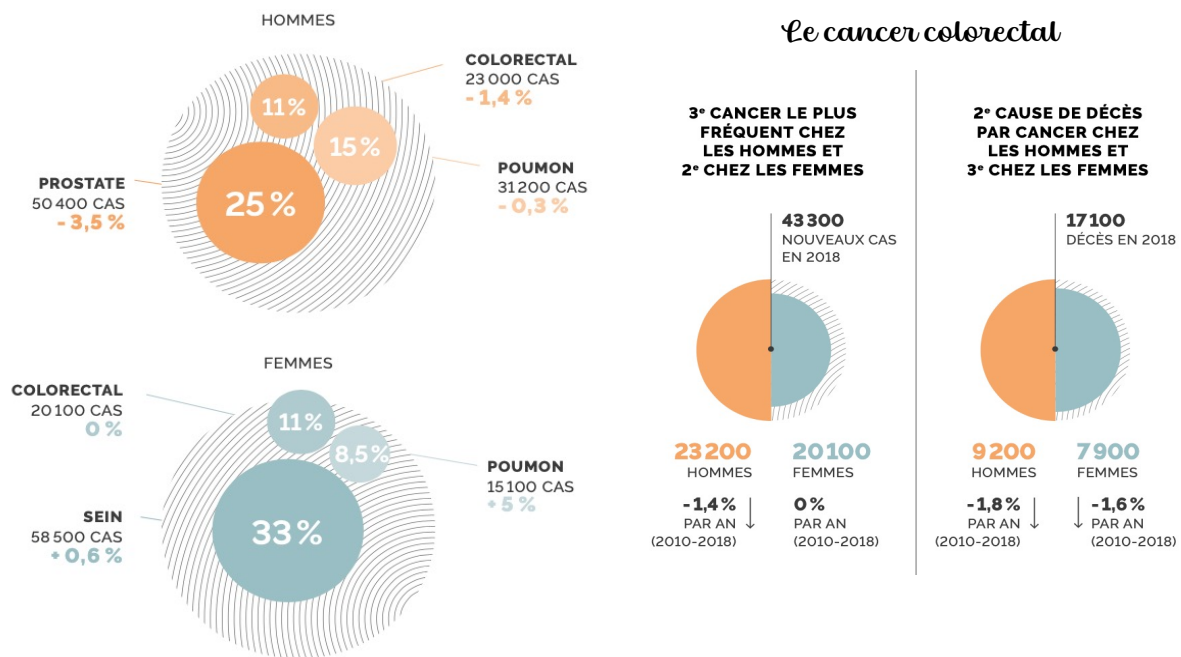


Figure 3 : Données épidémiologiques sur le cancer colorectal en France

(Panorama des cancers en France édition 2022, INCa)

La survenue d'un CCR est plutôt rare avant l'âge de 50 ans, l'âge médian du diagnostic est d'environ 70 ans et depuis 2005, l'incidence de ce type de tumeur s'est stabilisée en France. L'incidence et la mortalité semblent être liées au genre. Une analyse des données entre 1990 et 2018 démontre que, chez les hommes, l'incidence et la mortalité semblent avoir diminuées ; alors que chez les femmes, l'incidence semble stagner et la mortalité diminuer graduellement (santepubliquefrance.fr). Une des raisons expliquant la diminution de la mortalité est la mise en place de campagnes de dépistage dès l'âge de 50 ans. La coloscopie permet la détection de lésions précancéreuses mais également leur résection. La détection de la présence de sang occulte dans les selles incite à recommander très fortement aux patients une coloscopie totale, permettant de détecter dans un nombre de cas non négligeable des lésions précancéreuses voire des CCR à un stade précoce. Ce test de dépistage n'est pas invasif et depuis mars 2022, il est gratuit pour toute personne entre 50 et 74 ans, éligible et invitée au dépistage organisé afin de le rendre plus accessible. Malgré ces mesures, la participation est très insuffisante avec seulement ¼ des personnes éligibles participantes entre 2019 et 2020 alors que s'il est détecté tôt, ce cancer peut être guéri dans 90% des cas et il est établi que de nombreux cas pourraient être évités (Figure 4).

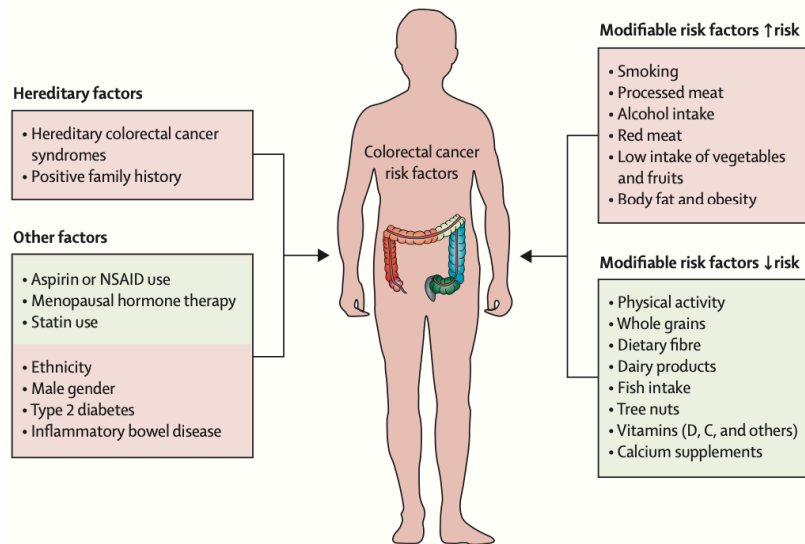


Figure 4 : Liste des facteurs de risque modifiables ou non modifiables concernant le CCR (D'après Dekker *et al.*, 2019)

Les habitudes de vie, consommation excessive d'alcool, facteur reconnu pour les CCR du sujet jeune, de tabac, l'obésité, la sédentarité, l'âge, les facteurs environnementaux ou encore la présence d'une maladie inflammatoire colique (MICI) sont des facteurs de risque reconnus dans la survenue d'un CCR (Panorama des cancers édition 2022, INCa). Toutefois, une faible proportion de CCR est directement liée aux antécédents familiaux et donc qualifiée d'« héréditaire ». Près de 20% des patients atteints de CCR sont diagnostiqués au stade métastatique avec une prépondérance des atteintes hépatiques, péritonéales et pulmonaires (Ciardiello *et al.* 2022; Hervieu *et al.* 2021; J. Zhou *et al.* 2017). La survie d'un patient atteint de CCR métastatique est d'environ 24 mois (Bounaix Morand du Puch *et al.* 2016; Manhas *et al.* 2016) et près de 50% des patients diagnostiqués à un stade *a priori* curable, développeront des métastases au cours de leur vie (Ciardiello *et al.* 2022; Hervieu *et al.* 2021; Manhas *et al.* 2016). Enfin, 80 à 90% des CCR métastatiques ne sont pas éligibles à la résection chirurgicale à cause de leur taille, leur localisation ou encore l'étendue de la maladie (Hervieu *et al.* 2021). L'ensemble de ces éléments fait de ce cancer un réel problème de santé publique.

1.2.2. Les différentes formes du cancer colorectal : sporadique ou héréditaire

Dans 70 à 80% des cas, la survenue d'un CCR est dite « sporadique », c'est-à-dire qu'elle est la conséquence de facteurs environnementaux (Mori et Pasca 2021). Toutefois, des antécédents familiaux de CCR peuvent être impliqués dans 20% des cas, le risque variant en fonction du nombre et du degré de parents affectés ainsi que de leur âge au diagnostic (De Palma *et al.* 2019; Dekker *et al.* 2019).

Enfin, 3 à 5% des CCR sont dits « héréditaires » puisqu'ils impliquent des mutations génétiques héritées (Dekker *et al.* 2019; Kanth et Inadomi 2021). On distingue alors les syndromes de non-polypose (HNPCC) des syndromes de polypose, tous deux hérités selon un

mode autosomique-dominant. Le syndrome de Lynch représente 3% des CCR héréditaires et correspond à syndrome de non-polypose, causé par une mutation germinale au niveau de gènes du système de réparation « mismatch repair » (MMR) de l'ADN. Ceci entraîne une instabilité microsatellitaire (MSI) et donc un phénotype hypermuté, également rencontré chez 15% des CCR sporadiques (Dekker *et al.* 2019; Mori et Pasca 2021). Les syndromes polyposiques se caractérisent par la présence de multiples polypes et, selon le type de syndrome, par la présence de lésions bénignes ou malignes extra-digestives. Le plus courant représente moins d'1% des CCR et se nomme « polypose adénomateuse familiale » ou PAF. La PAF est causée par des mutations germinales au niveau du gène *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), gène suppresseur de tumeurs (Mori et Pasca 2021).

I.2.3. Oncogénèse colique

La majorité des CCR se développe à partir d'une lésion bénigne nommée polype. Une crypte colique devenue aberrante va évoluer et former une excroissance, le polype. Ce dernier progressera en cancer colorectal suite à l'accumulation de nombreuses mutations génétiques et épigénétiques (Dekker *et al.* 2019). Ce processus multi-étapes peut prendre entre 10 et 15 ans et l'appellation « séquence adénome-carcinome » a été proposée en 1990 par Fearon et Vogelstein et est présentée en Figure 5.

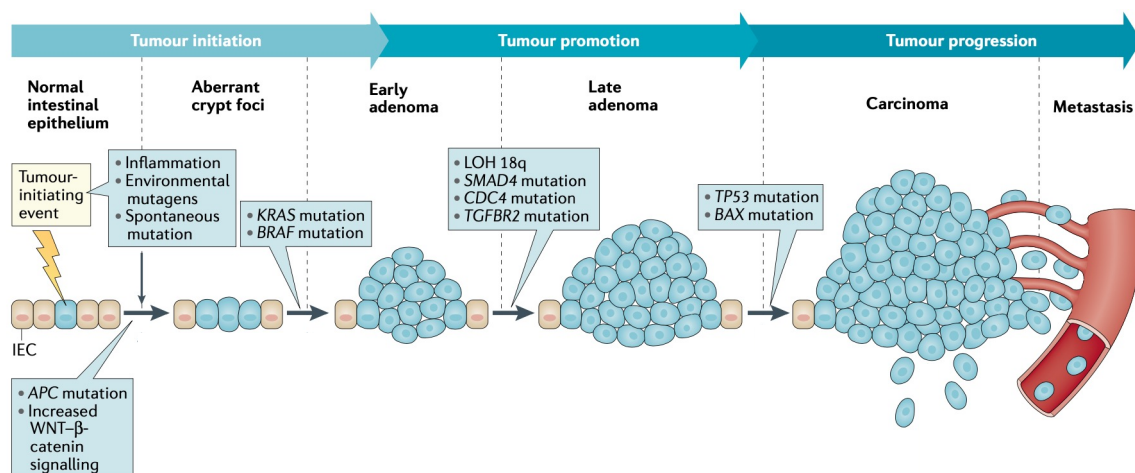


Figure 5 : La séquence adénome-carcinome : évolution d'un épithélium sain vers un carcinome (D'après Schmitt et Greten, 2021)

Elle décrit l'apparition d'un adénocarcinome, tumeur maligne d'origine glandulaire, naissant d'une tumeur bénigne au niveau de la crypte colique et allant progressivement devenir maligne sous le jouc d'une accumulation de nombreuses mutations (De Palma *et al.* 2019; Fearon et Vogelstein 1990). Depuis, la compréhension des changements génétiques et

épigénétiques en jeu dans l'initiation et la progression du CCR a bien évolué. Trois voies ont été mises en évidence : la voie conventionnelle de l'instabilité chromosomique (CIN), la voie d'instabilité microsatellitaire (MSI) ainsi que la voie de la néoplasie dentelée également baptisée « voie de méthylation des îlots CpG » (CIMP) (Nguyen, Goel, et Chung 2020).

I.2.3.1. La voie conventionnelle de l'instabilité chromosomique (CIN)

La voie conventionnelle de l'instabilité chromosomique est observée dans 65 à 85% des CCR sporadiques et est fréquemment retrouvée en cas d'atteinte distale du côlon (côlon gauche) (De Palma *et al.* 2019; Nguyen, Goel, et Chung 2020). Cette voie se caractérise par une anomalie du caryotype incluant des altérations somatiques du nombre de copies de chromosomes ou de leur structure (Harada et Morlote 2020; Nguyen, Goel, et Chung 2020). Ces altérations sont causées par une aneuploïdie, des délétions, des insertions, des amplifications allant jusqu'à la perte d'hétérozygotie (LOH). Toutefois, les tumeurs se développant selon cette voie ne sont pas qualifiées d'hypermutées puisque des mutations de paires de bases au niveau de séquences codantes sont relativement rares. Les mécanismes menant à la CIN sont souvent caractérisés par des défauts de ségrégation des chromosomes tels que ceux contrôlant la séparation des chromatides sœurs ; une sénescence cellulaire non contrôlée induite par le raccourcissement des télomères et menant à une réorganisation du génome ; un dysfonctionnement du mécanisme de réponse aux dommages de l'ADN ; ou encore une LOH d'un gène suppresseur de tumeur (Nguyen, Goel, et Chung 2020).

I.2.3.2. La voie d'instabilité microsatellitaire (MSI)

Près de 15% des CCR sporadiques sont caractérisés par une instabilité généralisée de courtes séquences d'ADN répétées en tandem, les microsatellites, souvent de bon pronostic car de phénotype hypermuté (De Palma *et al.* 2019; Harada et Morlote 2020; Nguyen, Goel, et Chung 2020). Ce type de tumeur est quant à lui souvent retrouvé en partie proximale du côlon (côlon droit) et chez des patients de sexe féminin (Mori et Pasca 2021; Schmitt et Greten 2021). La voie MSI peut être la conséquence de mutations au niveau de gènes *MMR* tels que *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2* ; ou de l'extinction du promoteur du gène *MLH1* par hyperméthylation. Physiologiquement, en cas de défaut de réplication de l'ADN et qu'il en découle un mésappariement de nucléotides, une enzyme du système MMR se charge de la correction. En cas de défaut de fonctionnement du MMR, on observe une fréquence élevée d'erreurs de réplication en raison du glissement de l'ADN polymérase, comme pour le syndrome de Lynch présenté précédemment (Harada et Morlote 2020; Nguyen, Goel, et

Chung 2020). Ces altérations peuvent être héréditaires ou sporadiques dans respectivement 5% et 10% des cas de CCR (De Palma *et al.* 2019). En fonction du nombre de microsatellites affecté, les tumeurs sont classées en MSI^{high}, MSI^{low} ou en MSS en absence d'instabilité. Toutefois, les statuts MSI^{low} et MSS présentant peu de différences dans leurs caractéristiques clinicopathologiques ou dans la plupart de leurs caractéristiques moléculaires, ces statuts ont été regroupés en MSS (De Palma *et al.* 2019).

I.2.3.3. La voie de la néoplasie dentelée ou voie de méthylation des îlots CpG (CIMP)

Enfin, la voie de méthylation des îlots CpG se caractérise par une hyperméthylation généralisée de nombreux promoteurs d'îlots CpG ainsi que par l'inactivation constitutive de gènes suppresseurs de tumeurs. Les cancers de ce type ont initialement été identifiés dans 30 à 35% des CCR mais l'analyse du niveau de méthylation de promoteurs spécifiques de la voie CIMP a révélé qu'elle était à l'origine de seulement 15% des CCR (Harada et Morlote 2020). Contrairement aux voies CIN et MSI, généralement exclusives, la voie CIMP est souvent liée à la MSI. Comme évoqué précédemment, les tumeurs MSI sont presque exclusivement associées à l'hyperméthylation du promoteur du gène *MHL1* du système MMR. L'altération de cette voie est fréquente au niveau du côlon proximal, chez les femmes et à un âge avancé (Harada et Morlote 2020). De plus, la CIMP est également nommée « voie de la néoplasie dentelée » en raison de l'aspect des polypes en dents de scie la caractérisant (De Palma *et al.* 2019; Schmitt et Greten 2021). Les tumeurs CIMP peuvent être divisées en deux types : les CIMP^{high} associées aux mutations *BRAF* et à la méthylation de *MLH1*, tandis que les CIMP^{low} sont plutôt associées aux mutations *KRAS* (Schmitt et Greten 2021).

I.2.3.4. Les sous-types moléculaires de cancers colorectaux

La survenue d'un CCR n'est pas forcément liée à une seule de ces voies et les tumeurs peuvent être caractérisées par des composantes de plusieurs d'entre elles, comme préalablement évoqué concernant les voies CIMP et MSI. Ceci a mené à l'établissement de différents sous-types moléculaires (Figure 6) reprenant l'ensemble des caractéristiques des voies d'oncogenèse ainsi que le statut mutationnel de certains gènes ou le niveau de méthylation d'autres (Jass 2007). Cette représentation met en lumière l'importante hétérogénéité des tumeurs coliques.

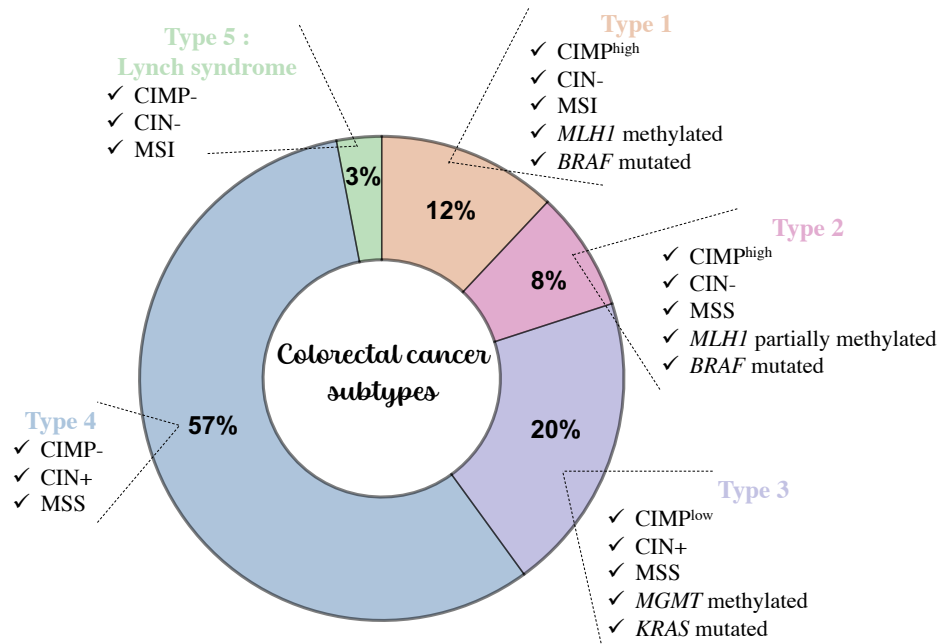


Figure 6 : Les cinq sous-types de cancer colorectal, établis sur la base du phénotype, des statuts mutationnels et de méthylation

(Adaptée de Jass, 2007)

En effet, en plus des trois voies majeures de l'oncogénèse, de très nombreuses mutations génétiques sont impliquées dans le développement d'un cancer colorectal. Ces mutations vont impacter deux familles de gènes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs.

1.2.3.5. Les oncogènes et suppresseurs de tumeurs impliqués dans la transformation colique

L'apparition et la progression d'un cancer colorectal peuvent être favorisées par la dérégulation d'oncogènes dont trois principaux :

- *KRAS* : Les mutations activatrices de cet oncogène sont retrouvées dans 40 à 45% des CCR et semblent survenir précocement dans la progression tumorale (Figure 5). Ces mutations sont davantage associées aux tumeurs du côlon droit et ont très majoritairement lieu au niveau de sites préférentiels (85%) sur les codons 12, 13 ou 61, entraînant la substitution d'un acide aminé (Arends 2013; Gongmin Zhu *et al.* 2021). Cette substitution découle sur une altération de la fonction enzymatique de *KRAS*, réduisant ou prévenant son clivage, ce qui conduit au verrouillage de cette protéine dans son état actif. Ceci mène alors à une signalisation excessive de la voie RAS-RAF-MEK-ERK, actrice majeure de la prolifération cellulaire ; mais également à l'activation de la voie PI3K par l'intermédiaire d'APC, inhibant l'apoptose (Arends 2013).

- *BRAF* : *BRAF* intervient également dans la voie RAS-RAF-MEK-ERK et influe donc positivement sur la prolifération cellulaire en cas d'activation. Entre 8 et 12% des CCR au stade métastatique présentent une mutation activatrice de *BRAF*, majoritairement la V600E. Il s'agit d'une substitution d'une valine en glutamate semblant imiter la phosphorylation régulatrice et donc multipliant par 10 son activité par rapport au phénotype sauvage. Cette mutation est plus fréquente au niveau du côlon proximal chez les individus de sexe féminin et diagnostiqués à un stade avancé (Sanz-Garcia *et al.* 2017).
- *PI3KCA* : Tout comme *KRAS* ou *BRAF*, une mutation activatrice du gène *PI3KCA* mène à une signalisation exacerbée de la voie RAS-RAF-MEK-ERK. Ce type de mutation intervient tardivement dans la progression tumorale et représente 10 à 20% des CCR. *PI3KCA* va donc réguler positivement la prolifération et la survie cellulaire mais également inhiber l'apoptose par l'inactivation de protéines cibles. Ce type de mutation a été associé à la survenue d'un CCR chez les femmes au niveau proximal tout comme *BRAF*, mais également à un statut MSI et à des mutations concomitantes de *KRAS* (Nguyen, Goel, et Chung 2020).

En plus de l'activation d'oncogènes allant favoriser la survie et la prolifération cellulaire de façon anarchique, des gènes suppresseurs de tumeurs peuvent également être démis de leur fonction. Comme leur nom l'indique, ces gènes agissent comme des freins sur les voies de signalisation pro-survie. En cas de transformation, ils peuvent subir des mutations entraînant leur inactivation. C'est le cas de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur dans le cadre du CCR :

- *APC* : La mutation d'*APC* semble être l'évènement génétique précurseur de la cancérogenèse colique (Figure 5), identifiée dans 80% des cas (Nguyen, Goel, et Chung 2020; Testa, Pelosi, et Castelli 2018). Des mutations germinales d'*APC* sont la cause de la PAF, forme héréditaire du CCR (Testa, Pelosi, et Castelli 2018). La perte de son activité résulte en la translocation nucléaire de la β -caténine et donc de l'activation de la voie Wnt. Les gènes cibles de cette voie, associés à la tumorigenèse, seront donc activés, tels que *MYC*, la cycline D1 (*CCND1*) et le *VEGF* (Nguyen, Goel, et Chung 2020). Des études récentes menées sur des cellules humaines de côlon ont démontré que la perte d'*APC* induisait des défauts de différenciation intestinale tandis que les défauts de prolifération et l'accumulation nucléaire de la β -caténine nécessitaient l'activation concomitante de *KRAS*. D'autres études ont mis en évidence

que la restauration de l'expression d'*APC* au niveau de cellules tumorales permettait d'inverser le processus (Testa, Pelosi, et Castelli 2018).

- *PTEN* : La protéine PTEN est un antagoniste de la voie PI3K et donc à ce titre, un gène suppresseur de tumeur. PTEN va déphosphoryler le PIP3, produit lipidique de la PI3K et donc contrecarrer la cascade de signalisation en aval, contrôler la prolifération, l'invasion et favoriser l'apoptose (Salvatore *et al.* 2019). La perte d'expression de *PTEN*, *via* des mécanismes génétiques et épigénétiques, a lieu dans près de 35% des CCR. Quel que soit le mécanisme menant à son inactivation ou à sa perte, ceci entraîne l'activation persistante de la cascade PI3K et donc une prolifération cellulaire exacerbée (Arends 2013; Salvatore *et al.* 2019). Les altérations de *PTEN* semblent être fréquemment corrélées à des tumeurs du côlon proximal, une instabilité microsatellitaire, des mutations *BRAF* ainsi qu'à la présence de métastases ganglionnaires (Salvatore *et al.* 2019).
- *TP53* : Le gène *TP53* code la protéine p53, qualifiée de « gardienne du génome » en raison de sa réponse au stress causée par les dommages à l'ADN. Elle va permettre l'activation de p21, inhibiteur de CDK (Cyclin-Dependant Kinases), entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et donc l'occasion de réparer l'ADN. Les mutations inactivatrices de *TP53* sont retrouvées dans plus de 60% des CCR et ont fréquemment lieu à un stade avancé (Figure 5) (Arends 2013; Nguyen, Goel, et Chung 2020). Des modèles murins d'épithéliums intestinaux présentant une délétion de *TP53* ont mis en évidence que, seule, cette perte était insuffisante pour initier la carcinogenèse colique mais qu'elle déterminait la propagation tumorale notamment *via* la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Testa, Pelosi, et Castelli 2018). De plus, une étude a révélé une corrélation entre la survenue précoce d'un CCR (avant 50 ans) et une altération germinale de *TP53* (Nguyen, Goel, et Chung 2020).
- *SMAD4* : L'inactivation de ce gène a généralement lieu (60 à 70% des cas) par délétion d'une grande partie du chromosome 18q où il réside, tandis que sa mutation concerne 35% des CCR (Arends 2013; Nguyen, Goel, et Chung 2020). La protéine SMAD4 est un médiateur central de la voie du TGF- β , signalisation régulant de nombreux processus cellulaires comme la croissance, la différenciation ou la migration. Depuis 20 ans, de nombreuses études ont démontré que la perte de cette protéine ne déclenchait pas à elle seule la formation d'une tumeur mais qu'elle pouvait favoriser la progression initiée par d'autres gènes telle que l'inactivation d'*APC* (Fang *et al.* 2021).

I.2.3.6. Les différents modèles de l'oncogenèse et cellule d'origine de la tumeur colique

Il existe une forte hétérogénéité inter-patients en raison des différentes voies possibles pouvant mener à la transformation colique en plus des mutations génétiques et épigénétiques impliquées. Une autre forme d'hétérogénéité s'ajoute à celle-ci : l'hétérogénéité intra-tumorale, qualifiant les différents types cellulaires retrouvés au niveau de la masse tumorale et leur implication dans l'initiation et la progression du cancer. Différents modèles ont été proposés, traduisant la contribution de chaque type cellulaire.

I.2.3.6.1. Modèle hiérarchique

Le modèle hiérarchique, également nommé « modèle des cellules souches cancéreuses (CSCs) », fait le postulat que seule une petite sous-population de cellules est capable d'initier l'apparition d'une tumeur mais également d'assurer sa pérennité (Figure 7) (Nassar et Blanpain 2016; Prasetyanti et Medema 2017). Ce modèle soutient que les CSCs (présentées en chapitre II), version tumorigène des CS, sont responsables de l'initiation tumorale car, dotées de la caractéristique d'auto-renouvellement, elles seraient les seules capables d'accumuler suffisamment de mutations pour donner naissance à une tumeur. Contrairement à elles, les cellules progénitrices ainsi que les cellules différenciées ne le pourraient pas car elles seraient rapidement éliminées, faute d'auto-renouvellement. En plus d'initier une tumeur, les CSCs seraient les seules en mesure de permettre sa progression *via* les divisions asymétriques, donnant naissance à la fois à des CSCs et à des cellules plus différenciées. Selon cette représentation, l'atteinte des CSCs seules par des thérapies permettrait d'éradiquer la masse tumorale et peut expliquer la résistance thérapeutique.

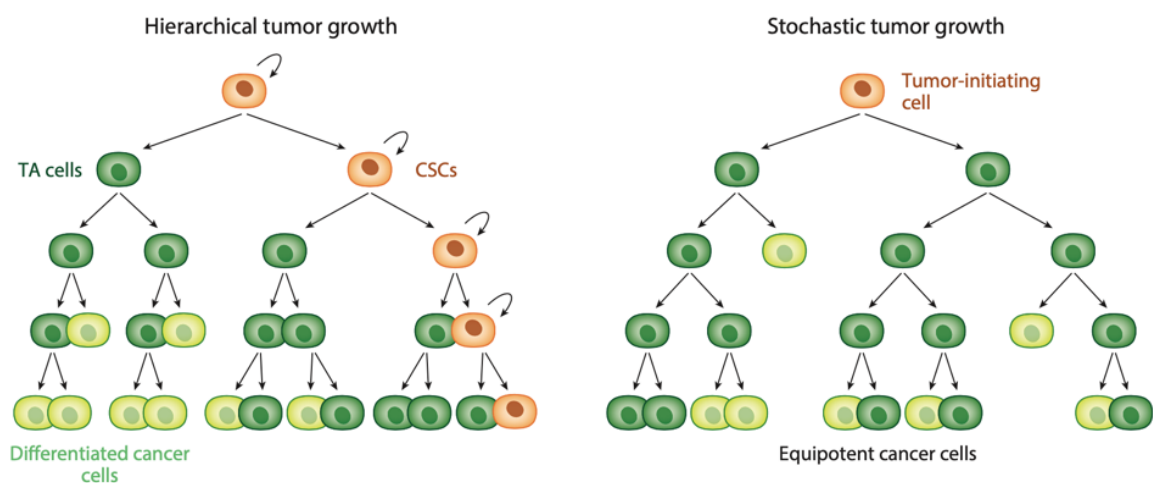


Figure 7 : Modèles hiérarchique et stochastique de l'oncogenèse colique

(D'après Nassar et Blanpain, 2016)

I.2.3.6.2. Modèle stochastique

Le modèle stochastique ou modèle « clonal » quant à lui, n'établit aucune distinction entre les différents types cellulaires au sein de la tumeur (Figure 7). En effet selon cette représentation, toutes les cellules présentent le même potentiel tumorigénique et à ce titre, sont toutes capables d'initier et de favoriser la croissance tumorale (Lathia et Liu 2017; Nassar et Blanpain 2016). L'acquisition de mutations et les changements épigénétiques accumulés au cours du temps entraînent alors une capacité croissante des clones à devenir malins et l'hétérogénéité intra-tumorale est donc le résultat d'une sélection naturelle (Prasetyanti et Medema 2017). Dans ce cas, il est nécessaire de tuer tous les types cellulaires de la tumeur afin de réussir à l'éliminer.

I.2.3.6.3. Modèle de plasticité

Pendant de nombreuses années, les deux modèles cohabitaient mais les évidences s'accumulaient dans chaque camp. Ceci a donc mené à repenser les modèles et à les considérer non-exclusifs (Cabrera, Hollingsworth, et Hurt 2015; Lathia et Liu 2017; Prasetyanti et Medema 2017). Effectivement, la plasticité intestinale est indéniable et il est difficilement concevable d'imaginer que cette plasticité serait perdue au cours de la transformation cellulaire. Un modèle de plasticité a donc été décrit et dans ce concept, le modèle des CSCs n'est pas nécessairement unidirectionnel puisque les non-CSCs peuvent se dédifférencier et réacquérir des propriétés de CSCs en fonction de divers facteurs intrinsèques et extrinsèques (Figure 8) (Prasetyanti et Medema 2017).

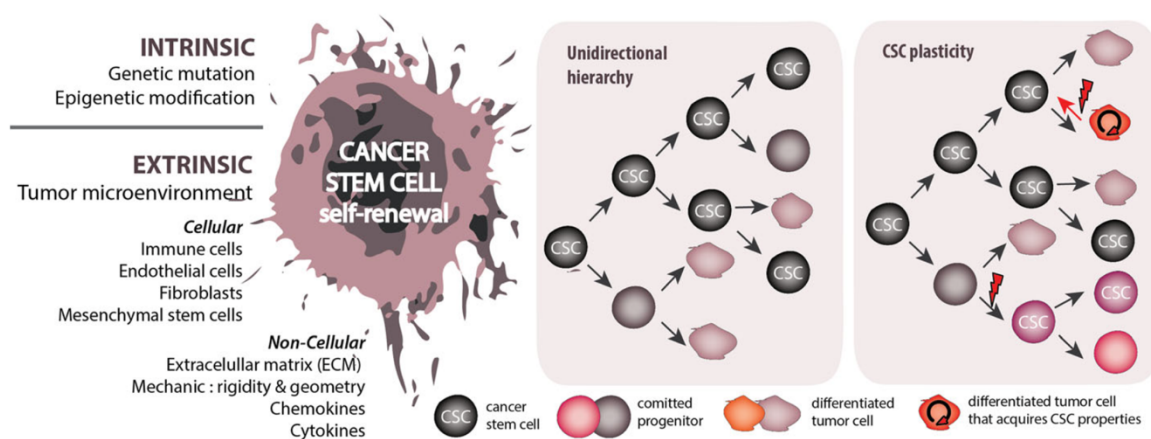


Figure 8 : Le modèle de plasticité de l'oncogénèse colique

(D'après Prasetyanti et Medema, 2017)

Cette caractéristique de plasticité fait partie de la dernière édition des « hallmarks of cancer » de 2022, récapitulant l'ensemble des caractéristiques des cellules tumorales

(Hanahan 2022). Depuis la première édition sortie en 2000, Hanahan et Weinberg s'efforcent de réaliser un modèle général permettant de regrouper l'ensemble des caractéristiques des cellules tumorales, actuellement au nombre de quatorze (Figure 9). La 3^{ème} et dernière édition à ce jour, a permis d'ajouter 4 nouvelles particularités dont la capacité des cellules à déverrouiller une plasticité phénotypique. En effet, Hanahan expose la capacité de cellules totalement différenciées à inverser leur course pour revenir à des états cellulaires indifférenciés, c'est la dédifférenciation. Au contraire, des cellules néoplasiques issues de cellules progénitrices destinées à une voie menant à un stade final de différenciation peuvent également court-circuiter le processus et maintenir les cellules cancéreuses en expansion dans un état partiellement différencié de type progéniteur. Enfin, il peut également y avoir de la transdifférenciation, à savoir que les cellules initialement engagées dans une certaine voie, peuvent basculer vers un programme de développement totalement différent et ainsi acquérir des caractéristiques spécifiques d'un tissu qui n'étaient pas prédestinées par leur cellule d'origine (Hanahan 2022).

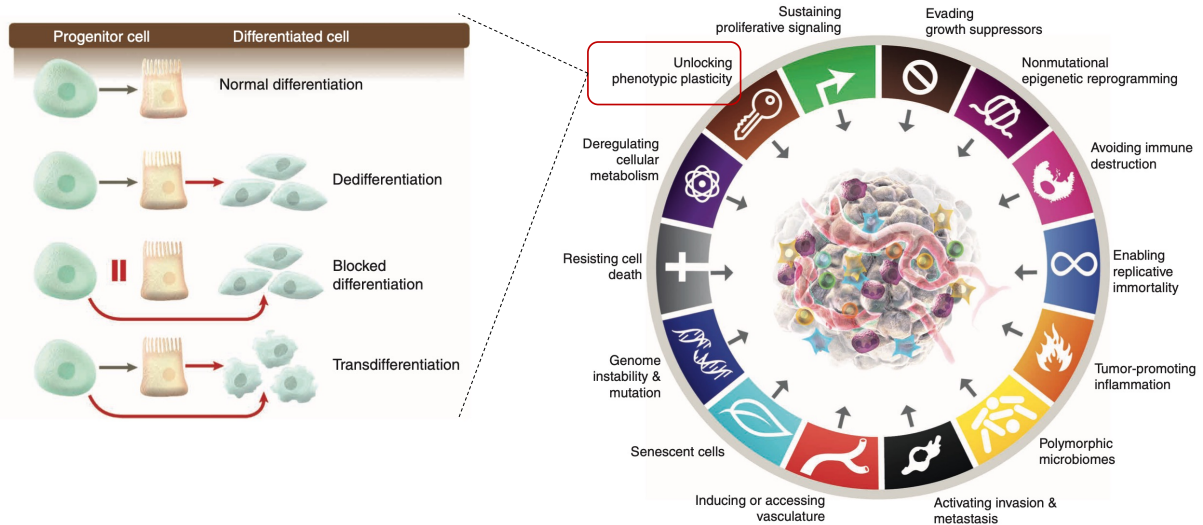


Figure 9 : Caractéristiques des cellules cancéreuses et zoom sur la plasticité cellulaire
(D'après Hanahan, 2022)

À cause du turn-over rapide de l'épithélium colique, la cellule souche intestinale est le candidat idéal en tant qu'origine de la tumorigenèse du fait de sa durée de vie, laissant possible l'accumulation de mutations menant à l'initiation tumorale. Toutefois, la principale source de mutations au niveau de l'intestin provient d'erreurs de réplication de l'ADN et à l'exposition de substances cancérigènes. Étant donné la forte prolifération des cellules progénitrices, ces cellules semblent plus susceptibles d'acquérir une mutation mais tant que la

migration des cellules n'est pas perturbée, elles seront éliminées en 3 à 4 jours. La courte vie de ces dernières réduit donc le risque d'initiation de tumeurs. De nombreuses expériences de délétions génétiques de gènes importants dans l'initiation tumorale ont été conduites chez des souris pour déterminer la cellule d'origine du CCR. Il se trouve que les CS étaient majoritairement capables de former des tumeurs en cas de mutation d'*APC*, alors que les cellules TA et les cellules différenciées nécessitaient en plus de ce type de mutation, l'activation de voies inflammatoires ou des modifications du microenvironnement (Huels et Sansom 2015). D'autres études de dissection d'adénomes spontanés humains ont démontré que les cellules dysplasiques se trouvaient principalement au niveau de la lumière colique, soit tout en haut de la crypte, alors que les cellules souches demeuraient normales. Ceci a conduit à un modèle nommé « top-down » selon lequel l'initiation de la tumeur commencerait au sommet de la crypte puis se propagerait vers le bas. Dans d'autres expériences, notamment au niveau de tumeurs coliques héréditaires, les cellules dysplasiques occupaient des cryptes uniques entières. C'est le modèle « bottom-up » prédisant que la cellule souche du fond de la crypte va initier la tumeur et va donc par la suite peupler l'entièreté de la crypte (Huels et Sansom 2015). Des études de méthylation de l'ADN ont identifié des signatures conservées durant le processus tumoral. Certaines des mutations responsables de la tumorigenèse étaient davantage corrélées à une signature de méthylation portée par des cellules souches tandis que d'autres étaient portées par des cellules plus différenciées (Bormann *et al.* 2018). Quoi qu'il en soit, au vu de la grande plasticité des cellules intestinales normales, il semble difficile d'imaginer que seules les cellules souches soient capables d'initier une tumeur colorectale même si elles semblent en être l'origine principale, des cellules différenciées sont également capables d'initier des tumeurs (Dekker *et al.* 2019; Hanahan 2022). De plus, l'intestin présente un microenvironnement particulier dont l'importance dans la transformation de l'épithélium colique n'est pas à minimiser, que ce soient les cellules du microenvironnement ou même les bactéries résidentes de l'intestin. En effet depuis de nombreuses années, un grand nombre de publications mettent en exergue le rôle prépondérant des bactéries intestinales dans l'initiation et la progression du CCR jusqu'à la formation de métastases (Ciardiello *et al.* 2022; Coker *et al.* 2019; Jobin 2013; Nakatsu *et al.* 2015). Certains chercheurs proposent même de considérer les altérations du microbiote intestinal comme biomarqueur pour la détection précoce de ce type de tumeur. D'autres études suggèrent que la modulation de cet écosystème pourrait être une stratégie de prévention voire de prise en charge thérapeutique (Y. Cheng, Ling, et Li 2020). L'implication des micro-organismes, et pas seulement les bactéries, dans le développement d'un cancer, sa progression jusqu'à la

réponse aux thérapies, est un des « hallmarks of cancer » nouvellement ajouté à l'édition 2022 (Hanahan 2022).

Tous ces éléments soutiennent l'importance de l'hétérogénéité intra-tumorale en plus de l'hétérogénéité inter-patient, ce qui complique la prise en charge thérapeutique. C'est la raison pour laquelle de nombreuses classifications ont été mises en place afin de pouvoir adapter cette prise en charge thérapeutique, allant parfois jusqu'à de la médecine personnalisée.

I.2.4. Les nombreuses classifications du cancer colorectal

I.2.4.1. Classification histologique selon le grade tumoral

L'évaluation histologique de la tumeur permet de déterminer le niveau de différenciation des cellules tumorales, directement corrélé à la présence de structures glandulaires. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a décrit 4 grades dans sa classification de 2000 (Ueno *et al.* 2008; 2012) :

- Grade I : cellules tumorales bien différenciées formant au moins 95% de structures glandulaires
- Grade II : cellules tumorales modérément différenciées formant entre 50 et 95% de structures glandulaires
- Grade III : cellules tumorales peu différenciées formant entre 5 et 50% de structures glandulaires
- Grade IV : cellules tumorales indifférenciées formant moins de 5% de structures glandulaires

Cependant, cette répartition repose sur une appréciation du pathologiste réalisant l'analyse et il s'est avéré que les biais inter-observateurs étaient conséquents puisque la distinction entre des cellules bien différenciées et modestement différenciées est difficile. C'est pourquoi un autre type de classification histologique a été mise en place et se base sur le nombre de « poorly differentiated clusters » (PDC) c'est-à-dire la quantité d'amas de cellules peu différenciées. Un PDC correspondant à au moins 5 cellules cancéreuses dépourvues de structure glandulaire (Barresi *et al.* 2015; Ueno *et al.* 2012). Ce système consiste en une classification en 3 grades avec :

- Grade I : moins de 5 PDC
- Grade II : entre 5 et 9 PDC

- Grade III : au moins 10 PDC

Cette classification, contrairement à celle de l’OMS, est bien plus reproductible et présente une signification pronostique plus élevée. Selon cette classification, les tumeurs de grade III, présentant de nombreux amas de cellules peu différenciées, présentent une survie à 5 ans de 59,3% contre 84,6 et 95,9% pour les grades II et I respectivement (Ueno *et al.* 2012).

Néanmoins, cette classification ne prend en compte que le degré de différenciation des cellules cancéreuses et non pas la localisation ou encore l’étendue de la tumeur, éléments pronostiques très importants.

I.2.4.2. Classification selon le degré d’envahissement (pTNM)

Afin de mesurer l’étendue de la tumeur ainsi que la potentielle atteinte d’organes distants, il a été mis en place la classification pTNM signifiant « pathology Tumor Nodes Metastasis ». Cette classification, la plus utilisée en clinique, fait l’objet de révisions régulières, la dernière édition datant de 2017. Elle consiste en l’évaluation du degré d’envahissement de la paroi colique (T), la détermination de l’atteinte des ganglions lymphatiques régionaux (N) ainsi que de la dissémination potentielle de la tumeur vers d’autres organes (M). C’est une classification très précise qui permet de définir cinq stades de CCR, chaque stade présentant différentes sous-classes (Figures 10 et 11) (Brierley, Gospodarowicz, et Wittekind 2017). Cette classification permet donc de mesurer la progression tumorale et donc d’adapter la stratégie de prise en charge thérapeutique.

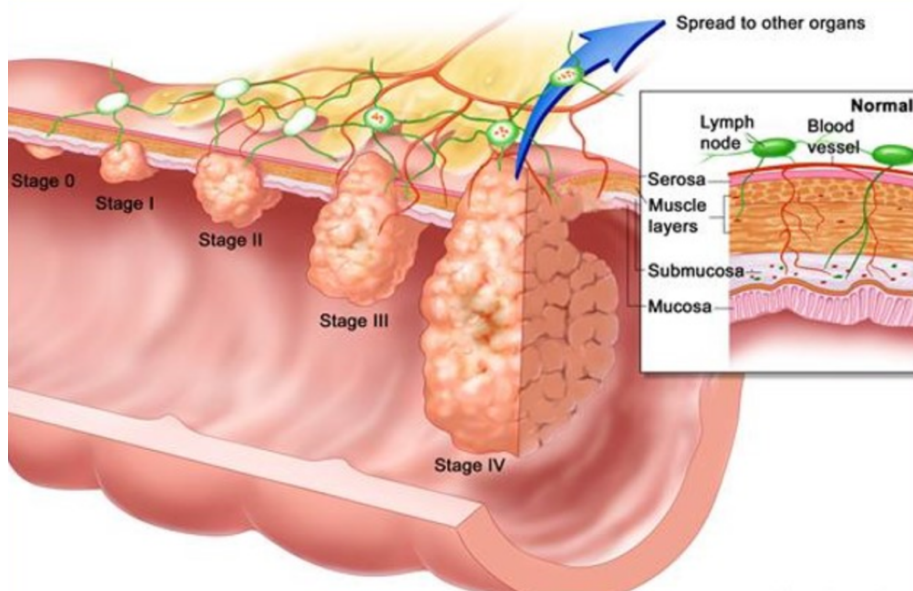


Figure 10 : Les cinq stades de développement du cancer colorectal

(D'après ccalliance.org)

Tumeur primaire (T)		
TX	Impossibilité d'évaluer la tumeur primaire	
To	Absence de tumeur primaire	
Tis	Tumeur <i>in situ</i> : atteinte de la muqueuse seule	
T1	Envahissement de la sous-muqueuse	
T2	Envahissement de la musculature	
T3	Franchissement de la musculature et envahissement de la sous-séreuse jusqu'aux tissus péri-coliques et péri-rectaux	
T4	A	Atteinte du péritoine
	B	Envahissement d'autres structure ou organes voisins
Ganglions lymphatiques régionaux (N)		
NX	Impossibilité d'évaluer les ganglions	
No	Pas d'atteinte ganglionnaire	
N1	A	Atteinte d'un seul ganglion
	B	Atteinte de 2 à 3 ganglions
	C	Présence de nodules dans la sous-séreuse ou dans les tissus péri-coliques et péri-rectaux
N2	A	Atteinte de 4 à 6 ganglions
	B	Atteinte d'au moins 7 ganglions
Métastases (M)		
Mo	Absence de métastases	
M1	A	Atteinte d'un seul organe (foie, poumon, ganglions lymphatique non régionaux)
	B	Atteintes de plusieurs organes
	C	Atteintes du péritoine avec ou sans atteinte d'autres organes

Stades	T	N	M	
o	Tis	N0	M0	
I	T1, T2	N0	M0	
II	A	T3	N0	M0
	B	T4A	N0	M0
	C	T4B	N0	M0
III	A	T1, T2 ou T3	N1, N2 ou N2A	M0
	B	T3, T4A ou T2, T3 ou T1, T2	N1 ou N2A ou N2B	M0
	C	T4A ou T3, T4A ou T4B	N2A ou N2B ou N1, N2	M0
IV	A	Atteinte de tous les tissus	Atteinte de tous les ganglions	M1A
	B	Atteinte de tous les tissus	Atteinte de tous les ganglions	M1B
	C	Atteinte de tous les tissus	Atteinte de tous les ganglions	M1C

Figure 11 : Classification pTNM (8ème édition)

(D'après Brierley *et al.*, 2017)

I.2.4.3. Classification moléculaire (CMS)

Les deux précédentes classifications renseignent sur l’envahissement tumoral ainsi que sur l’état de différenciation des cellules mais elles ne donnent aucune indication sur les caractéristiques moléculaires de ces cellules. Dans la mesure où les voies d’oncogenèse mais également les modifications génétiques et épigénétiques sont très variées, il est nécessaire de pouvoir caractériser les cellules tumorales au niveau moléculaire pour maximiser les chances de guérison. C’est ce qui a été mis en place en 2015 et nommée classification CMS pour « Consensus Molecular Subtypes » (Guinney *et al.* 2015). Un groupe d’experts internationaux s’est réuni dans le but de résoudre les incohérences de classifications du CCR basées sur l’expression de gènes et ainsi faciliter la prise en charge clinique. Ils ont décrit quatre sous-types moléculaires récapitulant les statuts CIN, MSI et CIMP ; les principales mutations génétiques ainsi que l’infiltration ou non de la masse tumorale par les cellules immunitaires (Tableau 1).

CMS1 MSI Immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGFβ activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Tableau 1 : Classification CMS du cancer colorectal

SCNA: Somatic Copy Number Alterations
(D’après Guinney *et al.*, 2015)

Ce consensus a permis de mettre en évidence des profils moléculaires bien distincts et associés à un pronostic particulier. Le CMS1 est qualifié de « MSI immunitaire » puisque ce sous-groupe rassemble la majorité des tumeurs présentant des instabilités microsatellitaires, entraînant un phénotype hypermuté et donc des tumeurs davantage immunogènes en raison de la forte présence de néo-antigènes (Dienstmann *et al.* 2017). Le CMS2 est le sous-groupe le plus représenté (37%) avec la qualification de « canonique » et présente avec le CMS4, la plus forte instabilité chromosomique (CIN) ; indiquée ici par le statut « SNCA » traitant du nombre d’altérations de copies somatiques. Le CMS2, à l’inverse de tous les autres sous-

groupes, possède davantage de gains de nombres de copies d'oncogènes ainsi que de pertes dans des gènes suppresseurs de tumeurs. Le sous-groupe « métabolique », correspondant au CMS3, est caractérisé par un statut MSI mixte puisqu'il présente environ 30% de tumeurs hypermutées et également une plus forte prévalence de CIMP^{low} (Guinney *et al.* 2015). Enfin, le CMS4 qualifié de « mésenchymal » et deuxième sous-groupe le plus représenté (23%), présente une forte infiltration de cellules stromales ainsi que l'activation de voies de signalisation liées à la TEM et à l'état souche, ce qui lui confère le pronostic le plus sombre (Guinney *et al.* 2015; Dienstmann *et al.* 2017). Cependant, l'ensemble des tumeurs ne peut être classé au sein de ces sous-groupes et près de 13% des CCR correspondent à une combinaison d'entre eux.

En plus des caractéristiques moléculaires des tumeurs, ce groupe d'experts a également pu associer au statut CMS des données cliniques ainsi que de pronostic. Les tumeurs CMS1 sont fréquemment diagnostiquées chez des femmes atteintes au niveau proximal et présentant un haut grade. À l'inverse, la majorité des CMS2 sont des tumeurs distales et les CMS4 sont souvent diagnostiquées à un stade avancé (III ou IV) (Ciardiello *et al.* 2022; Guinney *et al.* 2015). Côté pronostic, les CMS4, comme évoqué précédemment, présentent le pronostic le plus sombre que ce soit concernant la survie globale (OS : Overall Survival) ou la survie sans rechute (DFS : Disease-Free Survival). En revanche, la survie après rechute se trouve être la plus faible concernant le sous-groupe CMS1, ceci étant en adéquation avec d'autres études démontrant le pronostic sombre en cas de récurrence de tumeurs MSI et mutées pour le gène *BRAF* (Guinney *et al.* 2015).

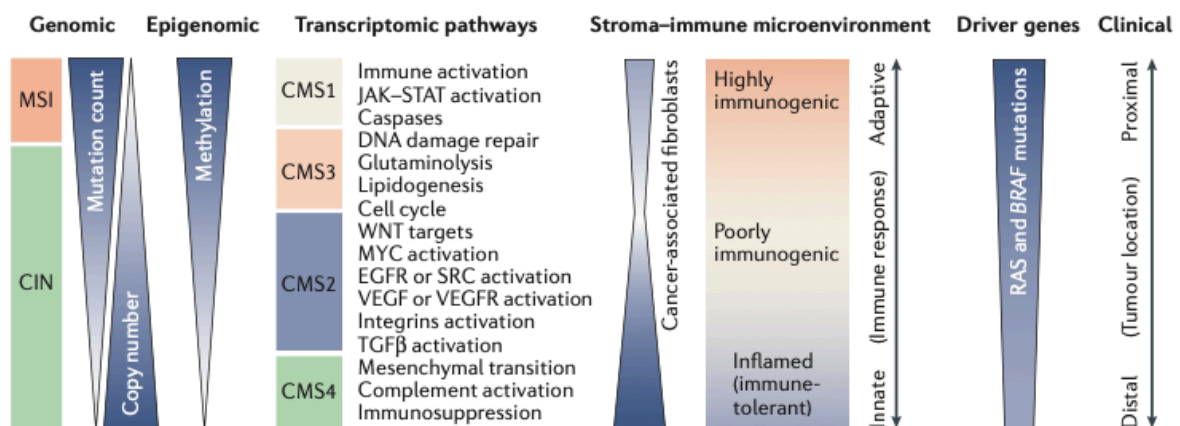


Figure 12 : Représentation schématique détaillée des sous-types moléculaires de cancer colorectal

(D'après Dienstmann *et al.*, 2017)

Tous ces éléments confirment la pertinence clinique de cette classification, décrivant parfaitement l'hétérogénéité des CCR étant non seulement spatiale mais aussi temporelle, pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients mais également pour le développement de nouvelles thérapies (Dienstmann *et al.* 2017). En effet, le statut MSI permet de prédire le bénéfice d'un traitement par le blocage de checkpoints immuns en cas de CCR avancé, d'où l'importance de prendre en compte les caractéristiques moléculaires des tumeurs (Guinney *et al.* 2015).

Au cours de l'énumération de ces classifications, il a été relevé que la localisation tumorale, proximale ou distale, était parfois liée à diverses caractéristiques moléculaires et de pronostic. Ces éléments sont résumés en Figure 13.

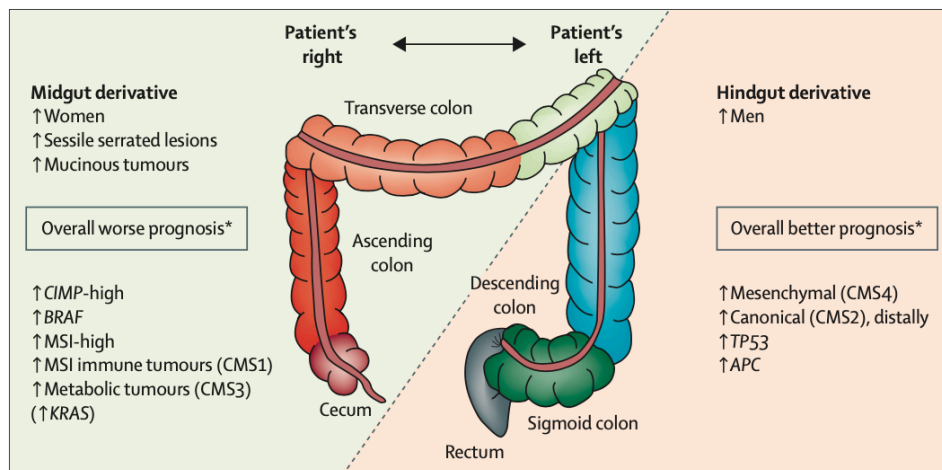


Figure 13 : Différences observées entre les tumeurs colorectales proximales et distales

(D'après Dekker *et al.*, 2019)

L'ensemble des classifications proposées jusqu'à maintenant ne s'intéressaient qu'aux cellules tumorales ainsi qu'à leurs propriétés. En 2020, une nouvelle classification est née, ne prenant pas en compte les caractéristiques des cellules tumorales mais l'environnement immunitaire dans lequel elles se développent.

1.2.4.4. Classification selon l'Immunoscore et immunité antitumorale

De nombreuses études ont démontré que l'évolution d'un cancer était fortement dépendante du microenvironnement tumoral (MET). Ce MET comprend de nombreux types cellulaires : fibroblastes, cellules endothéliales, vaisseaux sanguins et lymphatiques, mais surtout les cellules immunitaires. Une infiltration de cellules immunitaires adaptatives a été démontrée comme ayant une valeur pronostique supérieure à la classification pTNM, « gold standard » des classifications du CCR. L'Immunoscore est basé sur la quantification des

populations lymphocytaires de type CD8+ (cytotoxiques) à la fois au centre de la tumeur (CT) mais également au niveau du bord invasif (IM : invasive margin). Cet Immunoscore fournit un système de tri allant d'une faible densité immunitaire ou « tumeur froide » (I0) à une forte densité classée Immunoscore 4 (I4) ou « tumeur chaude » (Figure 14) (Angell *et al.* 2020).

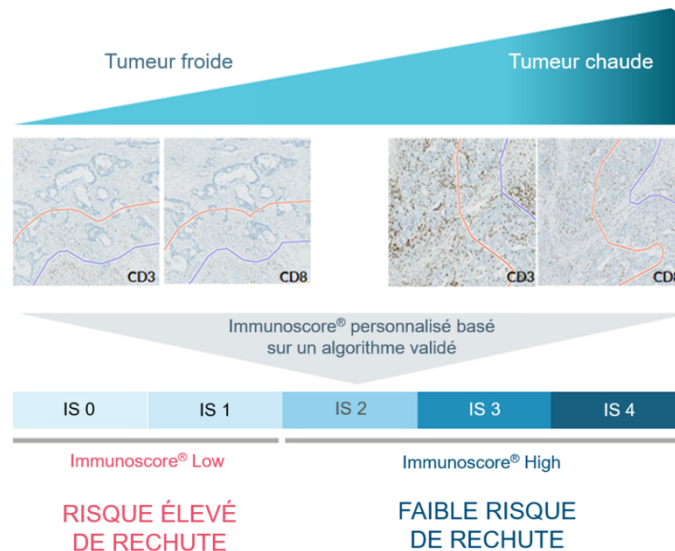


Figure 14 : Classification du cancer colorectal selon l'Immunoscore
(<https://io.veracyte.com/immunoscore-in-localized-colon-cancer-for-hcp-fr/>)

En termes de valeur pronostique, l'Immunoscore surpasse la classification pTNM de référence, non seulement concernant la survie globale mais également la survie sans récurrence (Angell *et al.* 2020). De plus, cette supériorité pronostique s'est avérée statistiquement significative pour les CCR de stades I à III, avec une progression et une invasion tumorales dépendantes des paramètres immuns. Dans la mesure où cette classification se base sur l'infiltration des cellules T dans la tumeur, tout mécanisme affectant directement ou indirectement ce processus affectera également la catégorie d'Immunoscore. Cette infiltration est directement corrélée aux tumeurs riches en néo-antigènes ou de statut MSI telles que les CMS1 ; mais également à la présence de mutations d'oncogènes pouvant affecter le recrutement de cellules T effectrices. De plus, la présence d'un « bon » microbiote intestinal a été démontré comme stimulant l'expression des chimiokines de recrutement des lymphocytes T par les cellules tumorales (Angell *et al.* 2020). La valeur de cette classification immunitaire va au-delà de son utilité pronostique et constitue également un outil puissant de prédiction de la réponse à de nouvelles approches thérapeutiques, soulignant son utilisation potentielle comme biomarqueur prédictif (Angell *et al.* 2020).

Toutefois, cette classification ne prend en compte qu'un sous-type de cellules immunitaires : les LT cytotoxiques (LTc). Le système immunitaire comprend divers types cellulaires allant coopérer pour défendre l'organisme de pathogènes ou d'un danger tel que la mise en place d'une tumeur. Effectivement, les LT présentent un rôle prépondérant dans cette lutte, à la fois en orchestrant la réponse immune mais également par la mise à mort directe des cellules endommagées. Les LT de type « helper » (LTh) sont chargés de l'organisation de la lutte antitumorale tandis que l'étape d'élimination est conduite par les cellules cytotoxiques comprenant les LTc mais également les cellules natural killer (NK). La seule différence existant entre ces deux types cellulaires réside en leur mode d'activation. Les cellules NK appartiennent à l'immunité « innée » et n'ont donc pas besoin d'être éduquées pour être effectrices. À l'inverse, les LTc appartiennent à l'immunité « adaptative » et ont donc besoin de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour les éduquer sur la cible à détruire. Physiologiquement, ces cellules doivent être activées par divers signaux pour pouvoir devenir effectrices. Afin d'empêcher l'hôte d'être attaqué par son propre système immunitaire, une boucle de rétrocontrôle négatif peut être mise en place pour inhiber les cellules. Cette boucle est activée par l'engagement de checkpoints immuns. Il existe de nombreux checkpoints immuns, le plus étudié étant le récepteur PD-1 et ses ligands, PD-L1 et PD-L2. La protéine PD-1, également nommée CD279, est une protéine transmembranaire de type I appartenant à la famille des molécules co-stimulatrices B7 / CD28 / CTLA-4 (Boussiotis 2016). Son expression est induite lors de l'activation des LT, elle est donc exprimée par les LT matures activés. Physiologiquement, les LT vont exprimer à leur surface PD-1 qui pourra se fixer à l'un de ses ligands, exprimés principalement par les CPA. En effet, cette reconnaissance ligand-récepteur va permettre d'activer PD-1, ce dernier pourra alors inhiber les voies de signalisation préalablement activées par le TCR (T-Cell Receptor) et donc entraîner la tolérance des LT (Boussiotis 2016). Ce phénomène physiologique a été détourné par les cellules tumorales, allant elles aussi exprimer les ligands de PD-1 dans le but d'inhiber les LT et permettre leur survie (Figure 15) (Oliveira, Bretes, et Furtado 2019).

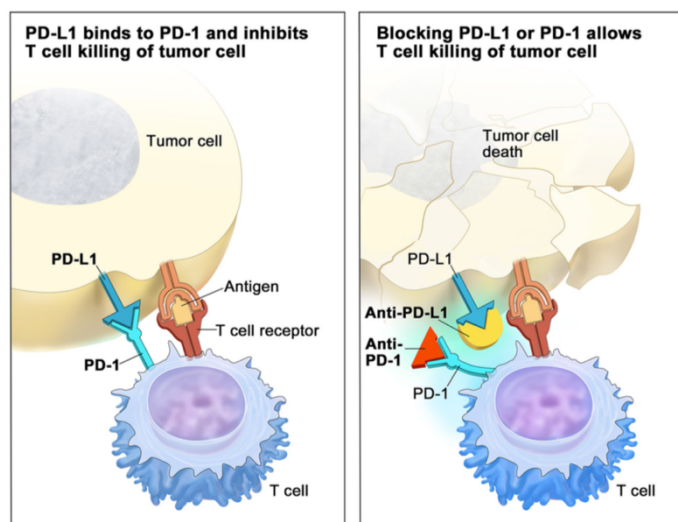


Figure 15 : Mécanisme d'inhibition des lymphocytes T par les cellules tumorales *via* PD-1
(D'après Oliveira, Bretes et Furtado 2019)

On parle alors de « résistance immunitaire adaptative » puisque le mécanisme inhibiteur est engagé dans les LT suite à la reconnaissance des antigènes tumoraux et à la mise en place d'une réponse antitumorale ; leur suppression est donc spécifique (Boussiotis 2016). L'immunothérapie, basée sur l'utilisation d'anticorps allant empêcher cette reconnaissance et ainsi limiter l'inhibition des LT antitumoraux est une des options thérapeutiques possibles dans la prise en charge du CCR.

I.2.5. Prise en charge thérapeutique du cancer colorectal

Comme la majorité des cancers, les options thérapeutiques concernant le CCR sont la résection chirurgicale en première intention, puis le recours aux chimiothérapies voire aux thérapies ciblées ou aux immunothérapies. Les éléments orientant ce choix dépendent de nombreux facteurs diagnostiques tels que le stade tumoral et sa localisation, la présence de métastases concomitantes, le statut mutationnel ou encore s'il y a infiltration immunitaire ; mais également des facteurs propres à chaque patient comme leur état de santé général, l'existence de comorbidités, l'âge et la possible survenue d'effets indésirables (Hervieu *et al.* 2021; Ciardiello *et al.* 2022).

I.2.5.1. Résection chirurgicale

La résection chirurgicale est la pierre angulaire du traitement à visée curative concernant les cancers colorectaux localisés bien sûr mais également avancés (Dekker *et al.* 2019; Hervieu *et al.* 2021). Toutefois, elle doit être complète, de type R0, c'est-à-dire sans résidu tumoral, pour être considérée curative en cas d'invasion régionale ou de la présence de facteurs histologiques de mauvais pronostic. Cette option est malgré tout rarement envisagée seule, avec la possibilité d'avoir recours à une chimiothérapie dite « néo-adjuvante »,

administrée avant l’opération chirurgicale dans le but de réduire au maximum la masse tumorale. L’autre possibilité étant la chimiothérapie adjuvante, administrée post-chirurgie dans le but de limiter le risque de récurrence tumorale (Hervieu *et al.* 2021).

1.2.5.2. Traitement chimiothérapeutique

La chimiothérapie est une thérapie dite « systémique » puisqu’elle agit par voie générale et permet donc d’éliminer les cellules cancéreuses peu importe leur localisation. Elle agit soit en détruisant directement ces cellules, soit en les empêchant de se multiplier. Concernant la prise en charge thérapeutique du CCR, de nombreuses molécules sont disponibles (Tableau 2).

Systemic Therapies	Drug Names	Functions	Recommendations
Chemotherapy	5-Fluorouracil	Antimetabolite	Localized and advanced tumors
	Irinotecan	Topoisomerase inhibitor	
	Oxaliplatin	Alkylating agent	

Tableau 2 : Les chimiothérapies utilisées dans le traitement du cancer colorectal

(D’après Hervieu *et al.*, 2021)

La première molécule utilisée a été le 5-FluoroUracile ou « 5-FU » à partir des années 1960. Il s’agit d’un analogue de l’uracile qui va tuer les cellules en interférant avec le métabolisme des nucléosides. Pendant de très nombreuses années le 5-FU a été le « gold standard » des chimiothérapies concernant le CCR et était alors utilisé en monothérapie. Son utilisation en tant que chimiothérapie adjuvante a permis d’améliorer la survie de patients atteints d’un stade III ainsi qu’un sous-ensemble de stades II à haut risque (statut TNM T4) (Dekker *et al.* 2019). Cependant, l’addition d’autres chimiothérapies ayant permis d’améliorer l’efficacité du 5-FU, des combinaisons ont été créées notamment avec l’oxaliplatine (OXA) formant le FOLFOX, et l’irinotécan (IRI) formant le FOLFIRI ; ou encore les trois molécules formant la combinaison FOLFIRINOX (Dekker *et al.* 2019).

La difficulté des chimiothérapies réside en leur mécanisme d’action étant non-spécifique et ciblant ainsi principalement les cellules en prolifération, touchant à la fois les cellules tumorales mais également des cellules saines. Par ailleurs, malgré l’évolution positive que ce type de thérapies a apporté sur la survie des patients, des rechutes ainsi que des résistances surviennent. Pour pallier ces éléments, des thérapies allant agir spécifiquement sur les cellules tumorales ou sur leurs caractéristiques ont été développées.

I.2.5.3. Thérapies ciblées et immunothérapie

Les thérapies ciblées, comme leur nom l’indique, sont une famille de molécules visant à perturber spécifiquement les voies de signalisation essentielles à la croissance cellulaire, à la survie ainsi qu’à la formation de métastases ; mais aussi à réduire la toxicité associée aux thérapies non spécifiques (chimiothérapies). Leur développement a permis une amélioration significative de la survie globale de patients atteints d’un CCR avancé. Puisqu’il ne s’agit pas d’une option thérapeutique de première intention, les thérapies ciblées sont principalement administrées à des cas de CCR métastatique ou en recours suite à une récurrence ou à une résistance aux chimiothérapies (innée ou acquise) (Frank *et al.* 2021). La première classe de thérapies ciblées correspond aux anticorps monoclonaux, pouvant cibler le récepteur à l’EGF (EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor) impliqué dans la croissance cellulaire ; ou la voie du VEGF (Vascular Epidermal Growth Factor) impliquée dans l’angiogenèse. Il en existe plusieurs types dont le choix s’établit sur la base du statut mutationnel des gènes *KRAS* et *BRAF* (Tableau 3). Les inhibiteurs de l’EGFR sont les molécules les plus communément utilisées dans la prise en charge de CCR avancés et de nombreux essais cliniques ont démontré que l’introduction des anticorps monoclonaux anti-EGFR ou anti-VEGF (cetuximab, panitumumab ou ramucirumab), additionnés au 5-FU, permettait d’augmenter considérablement la survie de ces patients (Frank *et al.* 2021; Ciardiello *et al.* 2022).

Systemic Therapies	Drug Names	Functions	Recommendations
Targeted therapy	Bevacizumab	mAb anti-VEGF-A	<i>KRAS/NRAS/BRAF</i> Mutated tumors
	Regorafenib	Multikinase inhibitor targeting e.g., VEGFR and BRAF	
	Aflibercept	Recombinant fusion protein blocking VEGF-A/B	
	Ramucirumab	mAb anti-VEGFR-2	
	Cetuximab	mAb anti-EGFR	
	Panitumumab		

Tableau 3 : Les thérapies ciblées approuvées pour le traitement du cancer colorectal

(D’après Hervieu *et al.*, 2021)

Une seconde classe de thérapies ciblées repose sur de petites molécules inhibitrices de *BRAF* et/ou du VEGF (regorafenib, aflibercept), utilisables seulement en cas de mutation des gènes *KRAS* ou *BRAF*. Le regorafenib est principalement adopté pour les patients métastatiques réfractaires n’ayant pas répondu aux thérapies systémiques de première ligne (Dekker *et al.* 2019).

Enfin, une dernière classe d'agents thérapeutiques existe : l'immunothérapie. Elle repose sur l'utilisation de molécules allant booster le système immunitaire du patient *via* la levée de l'inhibition des cellules immunes (Tableau 4). En effet, les cellules tumorales vont pouvoir inhiber le système immunitaire de l'hôte pour empêcher leur élimination et cette inhibition passe principalement par l'expression de molécules « checkpoints » que sont PD-1 et/ou CTLA-4. Malheureusement, cette approche n'est possible que pour une faible proportion de tumeurs métastatiques (5%) présentant un phénotype hypermuté, soit par MSI, soit par déficience du système MMR favorisant l'accumulation de néo-antigènes (Breakstone 2021; Ciardiello *et al.* 2022; Dekker *et al.* 2019; Hervieu *et al.* 2021).

Systemic Therapies	Drug Names	Functions	Recommendations
Immunotherapy	Pembrolizumab	mAb anti-PD-1	MSI-high tumors
	Nivolumab		
	Ipilimumab	mAb anti-CTLA4	

Tableau 4 : L'immunothérapie, option thérapeutique supplémentaire du cancer colorectal
(D'après Hervieu *et al.*, 2021)

Ces anticorps monoclonaux anti-PD-1 et anti-CTLA-4 peuvent être utilisés seuls mais également en combinaison. En comparaison au nivolumab administré seul, la thérapie conjointe avec l'ipilimumab semble plus efficace en termes d'augmentation de la réponse thérapeutique, du contrôle de la maladie et de la survie (Ciardiello *et al.* 2022).

Les stratégies thérapeutiques du cancer colorectal dépendent de plusieurs facteurs : la localisation, le stade au diagnostic, le statut mutationnel de nombreux gènes ou encore l'infiltration par les cellules immunitaires. Il faut également prendre en compte la résistance aux thérapies, innée ou acquise durant la course thérapeutique, ainsi que le fait que de nombreuses lignes de traitement sont souvent engagées. La prise en charge thérapeutique des patients peut alors être divisée en fonction des stades comme résumé dans la Figure 16 (Benson *et al.* 2018):

- Les stades 0 à II seront principalement traités par résection chirurgicale, sauf pour le stade II en cas de risque élevé de rechute (tumeur type T4) qui nécessitera une chimiothérapie adjuvante.
- Le stade III est pris en charge par résection de la tumeur primaire ainsi que des ganglions régionaux atteints avec un traitement chimiothérapeutique concomitant.

- Le stade IV métastatique subira, lorsque cela est possible, une résection de la tumeur primaire ainsi que des foyers métastatiques ; mais recevra le plus souvent des chimiothérapies en combinaison ainsi que des thérapies ciblées, voire de l'immunothérapie.

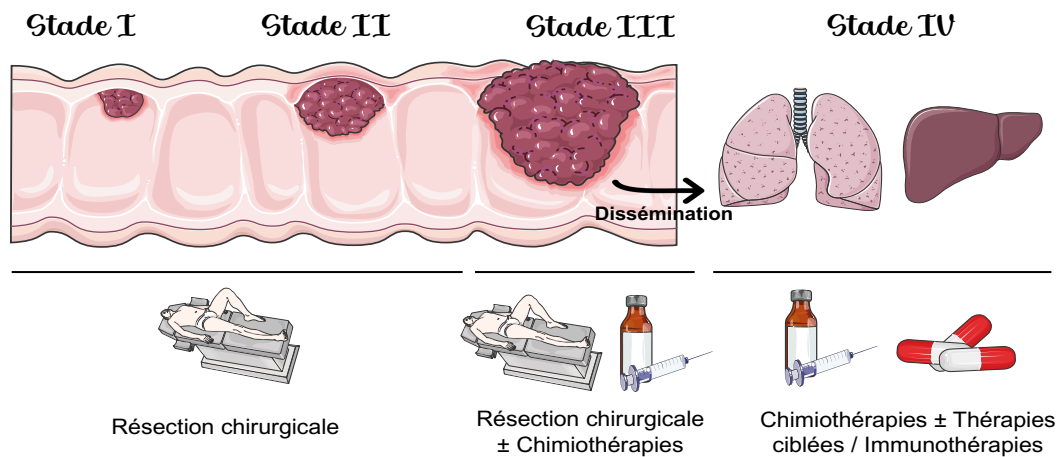


Figure 16 : Stratégies thérapeutiques du cancer colorectal

Malgré l'ensemble des options thérapeutiques disponibles pour la prise en charge du cancer colorectal et l'amélioration considérable de la survie qu'elles ont engendré, de nombreuses récurrences persistent mais également des résistances thérapeutiques. Ces deux événements sont principalement imputables à la présence d'une sous-population particulière au sein de la masse tumorale et invoquées précédemment : les cellules souches cancéreuses (CSCs).

Chapitre II. Les cellules souches cancéreuses colorectales

II.1. Origine des cellules souches cancéreuses

L'existence des cellules souches cancéreuses (CSCs), pendant tumorigène des cellules souches normales, a été découverte dans la leucémie aiguë myéloïde (LAM) en 1997. Bonnet et Dick ont mis en évidence qu'un type particulier de cellules était capable d'initier la LAM dans un modèle murin immunocompromis. Ces cellules ont alors reçu le qualificatif de « cellules initiatrices de tumeurs » puis une analyse de ces entités a démontré qu'elles partageaient les mêmes marqueurs ainsi que les mêmes caractéristiques que les cellules souches normales (Bonnet et Dick 1997). Il a fallu attendre 2003 pour que ce concept émerge également dans les tumeurs solides, en commençant par le sein suivi des autres types de cancers dont le cancer colorectal (Hirata *et al.* 2019).

II.2. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses colorectales

Ce qui rend les CSCs uniques en comparaison aux CS, c'est qu'elles ont perdu le contrôle des capacités de réplication et de différenciation, menant à la tumorigenèse. Puisque les CSCs sont des CS ayant acquis des propriétés cancéreuses, elles partagent les mêmes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles.

Au niveau phénotypique, les CSCs expriment les mêmes marqueurs que les CS intestinales classiques, et cette liste n'a cessé de se rallonger avec les années. Le premier marqueur utilisé pour isoler les CSCs de CCR a été le CD133 par la démonstration de la capacité de ces cellules à induire des tumeurs semblables à celles d'origine dans un modèle murin (Hirata *et al.* 2019; Zeuner *et al.* 2014). Toutefois, il a été démontré plus tard que des cellules CD133- pouvaient également reformer des tumeurs et que de surcroît, ces tumeurs progressaient bien plus vite que celles établies par des CD133+. Il s'est avéré que les cellules CD133- exprimaient un autre marqueur de cellules souches, le CD44, et que seules les CD44+ étaient capables d'initier la formation de tumeurs, peu importe le statut de CD133 (Hirata *et al.* 2019). À la suite de cela, de nombreux marqueurs ont été identifiés et étudiés, dont LGR5 et BMI1, marqueurs incontestables des CS intestinales. La liste actuelle de tous les marqueurs utilisés pour identifier les CSCs de CCR, leur fonction ainsi que leurs rôles dans la progression tumorale est retrouvée en Tableau 5.

CCSC Markers	Functions	Roles in Prognosis of CRC
Bmi-1	Polycomb-repressor protein Involved in self-renewal	High expression of Bmi-1 is associated with poor survival
CD24 (Heat stable antigen 24)	Cell adhesion molecule Alternative ligand of P-selectin	Strong cytoplasmic expression of CD24 is correlated with shortened patient survival
CD26	Cell adhesion glycoprotein Promote invasion and metastases	Elevated-CD26 expression is associated with advanced tumor staging and worse overall survival
CD29 (Integrin- β 1)	Transmembrane protein Involved in cell adhesion	Overexpression of CD29 is correlated with poor prognosis and aggressive clinicopathological features
CD44	Transmembrane glycoprotein Regulate cell interactions, adhesion and migration	CD44 overexpression is associated with lymph node metastasis, distant metastases and poor prognosis
CD44v6	Bind hepatocyte growth factor Promote migration and metastases	High level of CD44v6 has an unfavorable impact on overall survival
CD133 (Prominin-1)	Cell surface glycoprotein Regulate self-renewal and tumor angiogenesis	CD133 expression is correlated with low survival in CRC patients
CD166 (Activated leukocyte adhesion molecule)	Cell adhesion molecule Mediate homophilic interactions	Overexpression of CD166 is correlated with shortened patient survival
EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule)	Transmembrane glycoprotein Regulate cell adhesion, proliferation and migration	Loss of EpCAM expression is associated with tumor stage, lymph node and distant metastases and poor prognosis
Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)	Seven-transmembrane protein Target of Wnt pathway involved in self-renewal	Lgr5 expression is associated with lymph node and distant metastases, and overexpression with reduced overall survival

Tableau 5 : Marqueurs d'identification des CSCs et leurs rôles dans la progression du CCR

(D'après Hervieu *et al.*, 2021 ; CCSC : Colorectal Cancer Stem Cells)

En ce qui concerne les propriétés fonctionnelles des CSCs qu'elles partagent avec les CS, elles sont capables d'auto-renouvellement mais également de donner naissance à des cellules différenciées par division asymétrique. D'autre part, leur transformation leur permet également de proliférer de façon incontrôlée mais aussi d'initier la croissance tumorale. Une fois la tumeur installée, les CSCs vont permettre sa progression et présentent un rôle prépondérant tant dans la survenue de récidives *via* leur résistance aux thérapies, que dans la formation de métastases. Ces cellules représentent donc un élément majeur de la carcinogénèse colique et semblent être une cible privilégiée pour la mise au point de thérapies (Munro *et al.* 2018; Hirata *et al.* 2019).

Les CSCs sont une facette additionnelle de l'hétérogénéité des CCR, ajoutée à celle existant entre différents patients de même stade, ainsi qu'à celle régnant entre les différentes cellules tumorales, elles favorisent une hétérogénéité intra-clonale au sein du pool de CSCs (Figure 17).

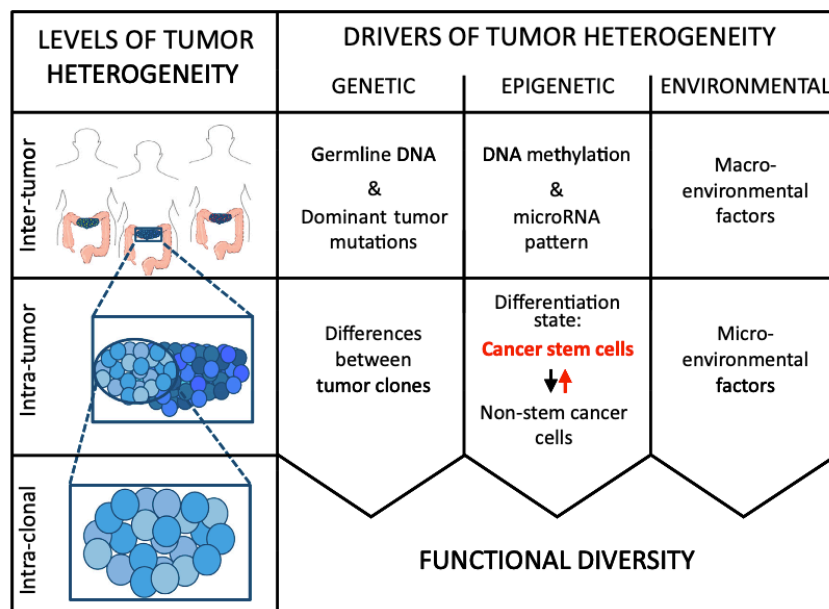


Figure 17 : Cellules souches cancéreuses et niveaux d'hétérogénéité du cancer colorectal
(D'après Zeuner *et al.*, 2014)

II.3. Stratégies de caractérisation des cellules souches cancéreuses

Les stratégies de caractérisation des CSCs reposent sur leurs caractéristiques biologiques présentées précédemment (phénotypiques et fonctionnelles), mais aussi sur leurs caractéristiques biophysiques faisant l'objet d'une partie de mes travaux.

II.3.1. Stratégies phénotypiques

L'expression de marqueurs dits « souche » a représenté le premier moyen de caractérisation des CSCs. Cependant, dans la mesure où l'ensemble des marqueurs évoqués en Tableau 5 sont également arborés par les CS normales, seul le niveau d'expression importe. C'est la raison pour laquelle la stratégie phénotypique va couramment reposer sur la comparaison d'expression des marqueurs entre les CSCs et les cellules différenciées. Cette mesure va reposer sur une quantification des transcrits et/ou des protéines. De plus, la surexpression d'un seul marqueur ne suffit pas, il est nécessaire d'en détenir plusieurs pour qualifier une cellule de CSC (Hervieu *et al.* 2021). Quant à LGR5 et BMI1, leur expression n'est pas mutuellement exclusive et comme pour les CS, LGR5 est principalement surexprimé par des CSCs proliférantes tandis que la surexpression de BMI1 est davantage associée à un profil quiescent.

II.3.2. Stratégies fonctionnelles

L'identification de marqueurs distinctifs ne suffit pas à caractériser les CSCs et ce qui va permettre d'affirmer le statut souche d'une cellule tumorale seront ses capacités fonctionnelles. De nombreuses techniques existent pour l'exploration de ces capacités comme résumé en Figure 18.

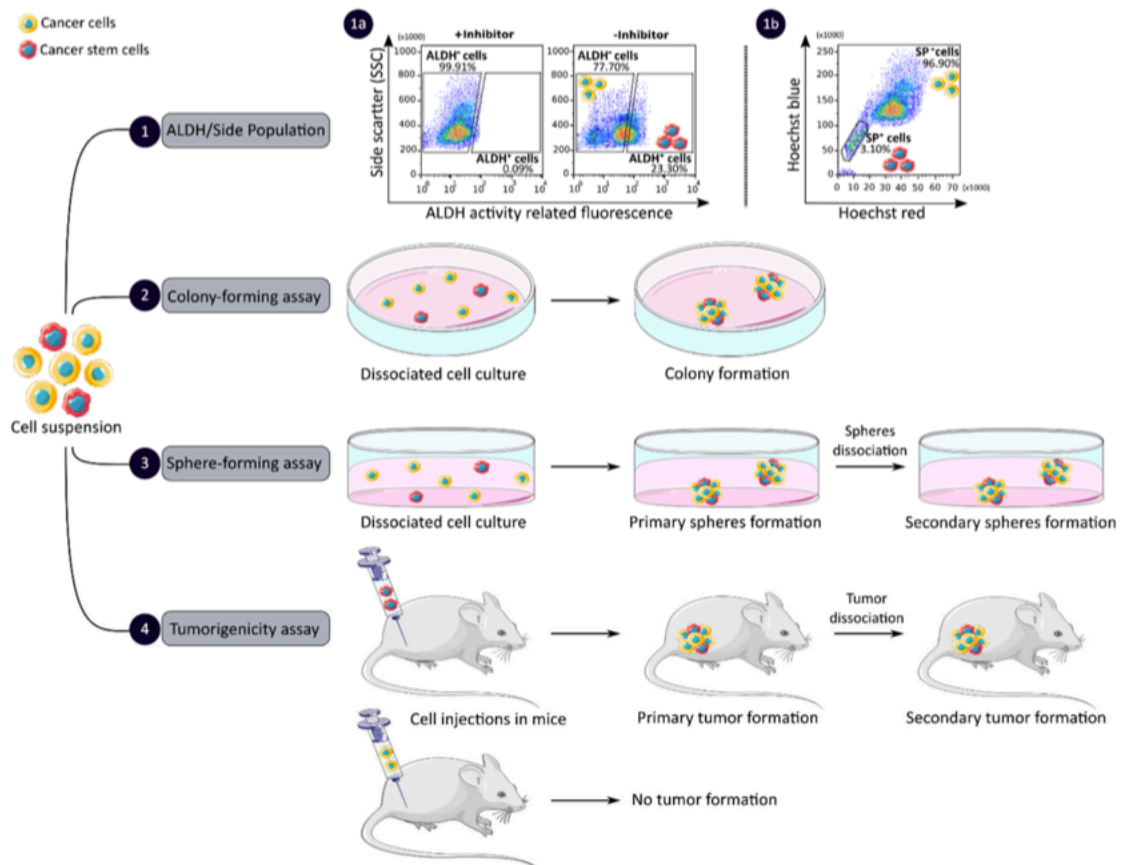


Figure 18 : Techniques d'exploration des propriétés fonctionnelles des CSCs

(D'après Hervieu *et al.*, 2021)

La première technique consiste en l'évaluation de la capacité de détoxification par mesure de l'activité ALDH (aldéhyde déshydrogénase) ou *via* le test d'exclusion au Hoechst permettant d'isoler la « side population » (SP). Le test de l'activité de l'enzyme ALDH repose sur l'utilisation d'un substrat fluorescent non toxique allant diffuser librement dans les cellules vivantes intactes. En présence de l'enzyme, le substrat sera converti en un produit fluorescent retenu en intracellulaire et la mesure de cette fluorescence sera réalisée par cytométrie en flux (CMF). Les cellules à forte activité ALDH correspondent aux CSCs car cela leur permet de résister aux molécules chimiothérapeutiques et de prévenir leur mort par

apoptose. L'avantage de ce test est sa stabilité en comparaison aux marqueurs de surface étant fluctuants.

Le test SP repose sur les capacités d'efflux des cellules. De même, un colorant fluorescent, le Hoechst33342, est utilisé pour pénétrer les cellules et se lier aux acides nucléiques. Lorsqu'il sera excité dans le spectre ultra-violet (UV), ce colorant va émettre une fluorescence détectable par CMF. En raison du nombre important de pompes à efflux leur permettant de se protéger des substances cytotoxiques, les CSCs sont capables d'éliminer activement ce marquage et présentent donc un faible niveau de fluorescence.

Les CSCs peuvent réaliser des divisions asymétriques donnant naissance à des clones identiques mais aussi à des cellules différenciées. Cette capacité est mesurée par des tests de formation de sphères où les cellules sont cultivées en faible nombre dans un milieu de culture particulier, dit « défini », créant un stress favorisant la survie des CSCs. Ces cellules vont alors développer des sphères contenant des cellules différenciées ainsi que des CSCs et plusieurs tests subséquents sont généralement possibles après dissociation des sphères.

Toutes les techniques venant d'être présentées sont principalement réalisées *in vitro* et seule la caractéristique opposée des CSCs par rapport aux CS est réalisée *in vivo*. Il s'agit de la mesure du potentiel tumorigène de ces cellules *via* la formation de tumeurs, réalisée principalement en modèle murin, gold standard des méthodes d'analyse des propriétés des CSCs. Quelques centaines de cellules sont greffées à des souris immunodéprimées pour la mise en évidence de la capacité d'initiation tumorale. Toutefois, la réussite de cette technique dépend de nombreux facteurs : le nombre de cellules injecté, le site d'implantation ainsi que de la période d'incubation. De plus, l'utilisation de souris nécessite une réflexion éthique et des équipements particuliers, rendant difficile sa mise en œuvre (Hervieu *et al.* 2021).

II.3.3. Stratégie biophysique

Que ce soient les techniques de caractérisation fonctionnelles ou phénotypiques, elles nécessitent des équipements spécifiques et surtout, requièrent un temps conséquent pour être réalisées. De plus, elles doivent être multiples pour pouvoir qualifier une cellule tumorale de CSC. Pour pallier ces difficultés, une alternative biophysique a été mise au point grâce au travail collaboratif de notre équipe avec le laboratoire CNRS UMR 7252. Cette méthode repose sur la mesure des caractéristiques biophysiques des cellules par l'application d'un champ électromagnétique à ultra-haute fréquence (UHF). L'application de ce champ va permettre de scanner l'ensemble des constituants intracellulaires de la cellule et de déterminer

sa fréquence de transition que l'on a nommé sa « signature électromagnétique ». Cette technique repose sur le phénomène physique de diélectrophorèse (DEP) permettant de mouvoir une particule polarisable, telle que les cellules biologiques, dans un champ électrique non-uniforme (Lambert *et al.* 2021). Les cellules sont mises en suspension dans un milieu particulier nommé « milieu DEP » spécifique à cette technique car il s'agit d'un milieu dépourvu d'ions et de ce fait, n'interférant pas avec la mesure. La suspension cellulaire est ensuite injectée dans un canal microfluidique la conduisant au laboratoire sur puce renfermant plusieurs capteurs quadripolaires. Suite à l'arrêt du flux microfluidique, une cellule unique sera immobilisée au niveau d'un capteur puis la mesure sera effectuée (Figure 19). Deux options sont possibles concernant l'intensité de la fréquence appliquée à la cellule : la DEP conventionnelle utilise des fréquences de l'ordre du kHz permettant d'interroger la membrane plasmique et la fréquence de transition obtenue est nommée f_{x01} . Il est également possible d'utiliser des fréquences UHF de l'ordre du MHz allant permettre de scanner le contenu intracellulaire et d'obtenir une fréquence de transition de type f_{x02} , correspondant à notre signature électromagnétique. La fréquence de transition traduit un changement d'état de la cellule passant de répulsée puis attirée par l'électrode.

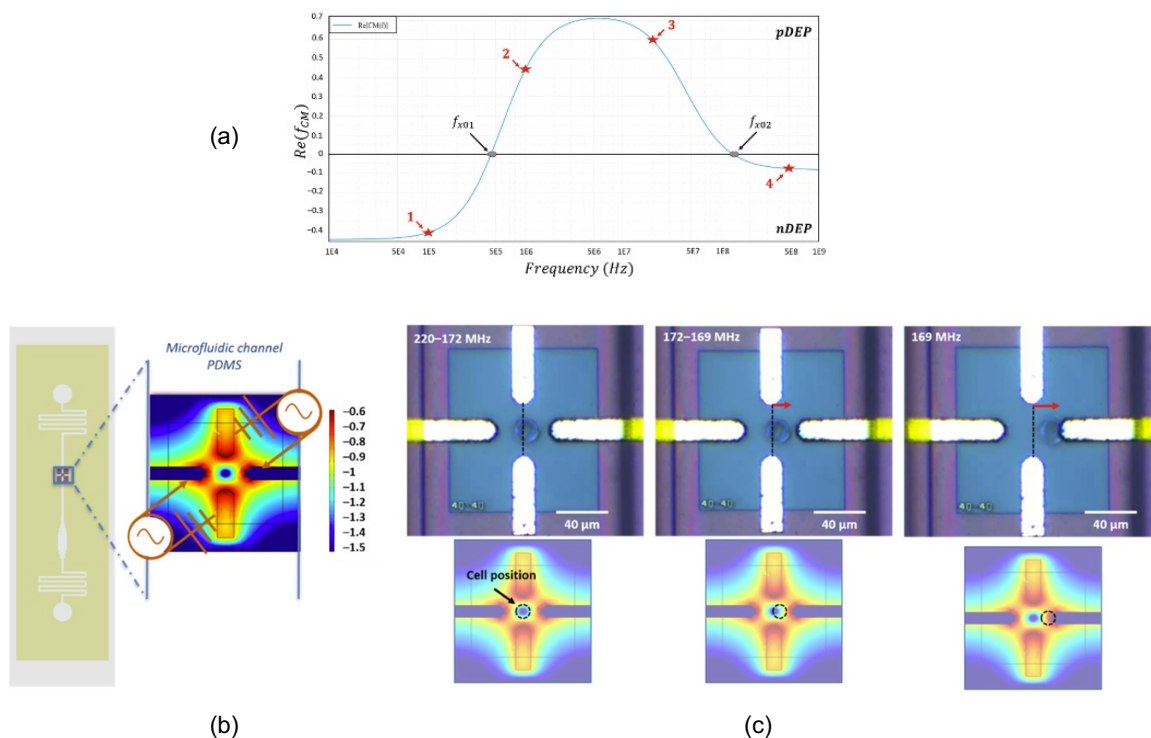


Figure 19 : Principe de mesure de la signature électromagnétique d'une cellule

(D'après Lambert *et al.*, 2021)

- (a) Principe de la diélectrophorèse et fréquences de transition f_{x01} et f_{x02}
- (b) Représentation schématique du laboratoire sur puce et zoom sur un capteur quadripolaire.
- (c) Principe de la mesure de la signature électromagnétique d'une cellule, ici de 169MHz.

Cette technique a précédemment été testée sur des modèles de tumeurs cérébrales et a démontré sa pertinence quant à la discrimination des CSCs par rapport aux cellules différenciées. Les CSCs ayant exhibé des signatures électromagnétiques bien en-deçà de celles des cellules différenciées dans ces modèles (Manczak *et al.* 2019; Casciati *et al.* 2020; Lambert *et al.* 2021).

Afin de vérifier qu'il n'existait pas de biais inter-manipulateur, ma binôme physicienne Élisabeth Lambert et moi-même avons débuté nos travaux de thèse sur un modèle de glioblastome, ayant fait l'objet de la publication Lambert *et al.* signée en co-premier auteur dans le journal *Biosensors* en 2021, retrouvée en Annexe 1. Ensuite, nous sommes passées au modèle de CCR dont les résultats seront exposés dans le Chapitre V.

L'identification et la caractérisation des CSCs sont primordiales pour pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de les éliminer puisque leur présence au sein de la masse tumorale va dicter le parcours clinique des patients.

II.4. Impact des cellules souches cancéreuses sur le processus clinique

Ces cellules, du fait de leurs caractéristiques et leur plasticité, sont une véritable entrave à la prise en charge thérapeutique. Elles présentent un rôle prépondérant sur le pronostic des patients atteints de CCR mais sont également impliquées dans les résistances aux thérapies, la survenue de récurrences et l'initiation de foyers tumoraux secondaires (Hervieu *et al.* 2021).

II.4.1. Pertinence pour le pronostic et la prise en charge des tumeurs

La détection des CSCs dans la masse tumorale semble essentielle pour une meilleure prise en charge thérapeutique afin de limiter les risques de complications. De nombreux marqueurs de CSCs ont été déclarés comme jouant un rôle primordial dans le pronostic des patients, rôle largement délétère (Tableau 5). Le marqueur de CS normales LGR5, fréquemment utilisé pour identifier et discriminer les CSCs de CCR, a été démontré dans de multiples études comme significativement corrélé à un pronostic sombre. En effet, il a été attesté que les patients présentant une surexpression de LGR5 présentaient une survie limitée, étaient principalement atteints d'un stade avancé, plus enclins à l'apparition de métastases mais également à une résistance au 5-FU ou à la survenue de récurrences. Il est donc proposé comme marqueur pronostic du CCR (Wahab *et al.* 2017).

II.4.2. Implications dans la résistance aux thérapies, la survenue de rechutes et la formation de métastases

L'efficacité des thérapies conventionnelles est limitée par des phénomènes de résistances au sein de la tumeur. Cette résistance peut être intrinsèque et donc préexister avant le traitement, mais elle peut également être acquise. En raison de l'hétérogénéité intra-tumorale, la thérapie peut mener à la sélection d'une sous-population résistante, généralement les CSCs (Hervieu *et al.* 2021). De nombreux mécanismes sont engagés dans la résistance thérapeutique et sont exposés en Figure 20.

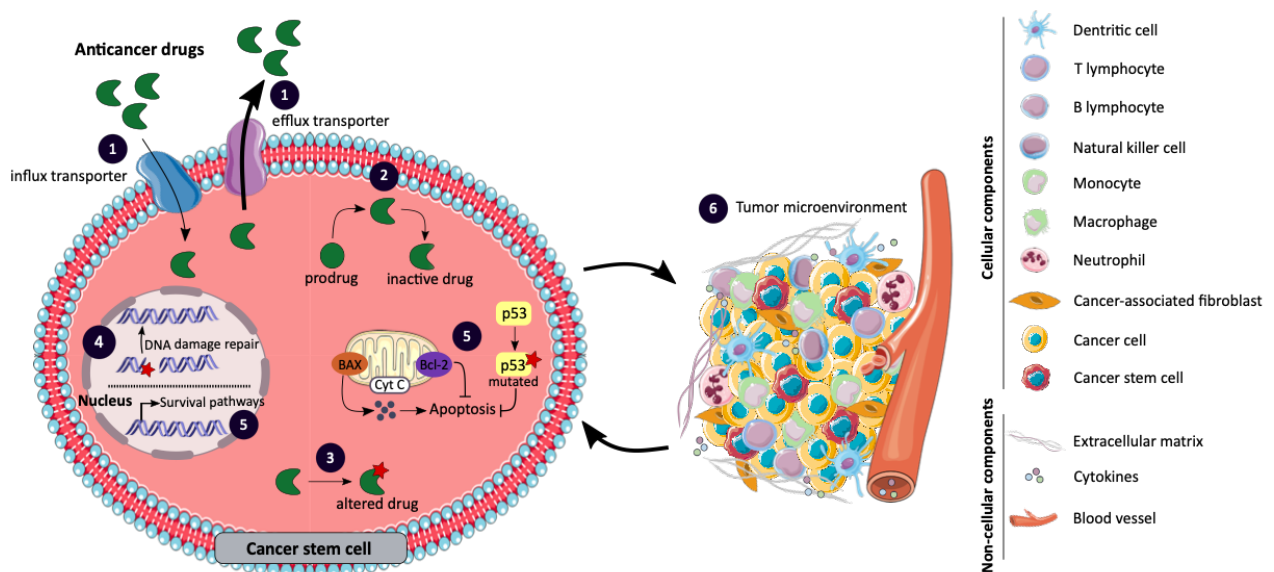


Figure 20 : Mécanismes de résistance thérapeutique attribués aux CSCs

(D'après Hervieu *et al.*, 2021)

Le premier élément expliquant la résistance des CSCs aux thérapies conventionnelles, telles que les chimiothérapies, est leur taux de division plus lent que les cellules différenciées (Y. Zhou *et al.* 2018; Zalewski, Snook, et Waldman 2021). De plus, l'activité d'une thérapie peut être limitée soit par un mauvais afflux soit au contraire par un efflux excessif. La deuxième option est celle mise en place par les CSCs arborant de nombreuses pompes à efflux facilitant le relargage de la substance anticancéreuse dans le milieu extracellulaire. En réponse à un stress, les CSCs peuvent également modifier leur métabolisme et ainsi inactiver la thérapie grâce à la surexpression de certaines enzymes. D'autre part, le processus de transformation lui-même peut mener à la résistance thérapeutique. En effet, il est établi que lorsque *KRAS* est muté, les tumeurs présentent une résistance intrinsèque aux anti-EGFR et les tumeurs mutées *TP53* présentent une forte résistance à l'apoptose. Un énième mécanisme de résistance relève de la puissante capacité des CSCs à réparer les dommages à l'ADN. Il ne

faut pas non plus oublier que les cellules tumorales sont en étroite communication avec le MET et nombreuses et variées sont les cellules favorisant la survie des CSCs *via* leurs sécrétions (Y. Zhou *et al.* 2018; Hervieu *et al.* 2021).

Cette aptitude à contrecarrer l'action des thérapies permet aux CSCs de persister lorsque les cellules différenciées seront éliminées et ceci donne naissance à la maladie résiduelle minimale. Les rechutes seront engendrées par ce phénomène car les CSCs ayant survécu aux thérapies vont devenir plus agressives et bien plus nombreuses lors de la réapparition de la tumeur (Zeuner *et al.* 2014; Y. Zhou *et al.* 2018).

L'acquisition de propriétés plus agressives peut également mener à l'avènement de tumeurs secondaires. En effet, les CSCs sont considérées comme les « graines » de l'invasion et de la formation de métastases pour de nombreuses raisons : leur potentiel de division est infini, leur plasticité leur octroie une adaptation aisée à un nouvel environnement et l'hétérogénéité engendrée par les divisions asymétriques permet la sélection de cet environnement. Toutefois, les CSCs présentes dans la tumeur primaire ne présentent pas toutes un potentiel métastatique et les foyers secondaires sont générés par une sous-population spécifique de CSCs nommée les « CSCs migrantes » et font suite à la TEM (Y. Zhou *et al.* 2018). La TEM est un processus complexe nécessitant la perte des jonctions entre les cellules, la réorganisation du cytosquelette ainsi que le renforcement des capacités de motilité et d'invasion (D. Kong *et al.* 2011). Ces cellules perdent alors leur morphologie épithéliale et acquièrent des caractéristiques mésenchymales permettant la dégradation de la matrice extracellulaire et de ce fait, l'invasion. Ces CSCs migrantes entraînent ainsi une croissance invasive rapide, une dissémination et réalisent des divisions asymétriques pour amorcer localement une nouvelle prolifération et différenciation puis une transition mésenchymato-épithéliale afin de coloniser le site secondaire. Le choix du site métastatique est médié par des signaux provenant du MET mais également par les caractéristiques mêmes des cellules migrantes créant un tropisme (Y. Zhou *et al.* 2018). Par exemple, il semblerait que les tumeurs présentant une forte expression de CD133 et de CD44 présentent un risque plus élevé de développer des métastases hépatiques précoces (Patsalias et Kozovska 2021).

Toutefois, des études démontrent que l'enclenchement de la TEM confère aux cellules des propriétés souche (Gonzalez-Villarreal *et al.* 2020; Lathia et Liu 2017; Nassar et Blanpain 2016). Il est alors difficile de statuer s'il s'agit bien de CSCs réalisant la TEM pour envahir un organe secondaire, ou si c'est par l'engagement de la TEM que des cellules tumorales différenciées deviennent souche et sont alors capables d'invasion.

Tous ces éléments confèrent aux CSCs de puissantes propriétés dictant la course clinique des patients. Puisqu'elles ne sont pas éliminées par les thérapies conventionnelles et qu'elles sont capables de reformer la masse tumorale et d'envahir ; il semble plus que nécessaire de développer des thérapies les ciblant spécifiquement afin d'éradiquer totalement et durablement le cancer.

II.4.3. Les cellules souches cancéreuses en tant que cible thérapeutique

Plusieurs stratégies sont explorées dans la lutte anti-CSCs, il est possible de cibler nombreuses de leurs caractéristiques (Figure 21).

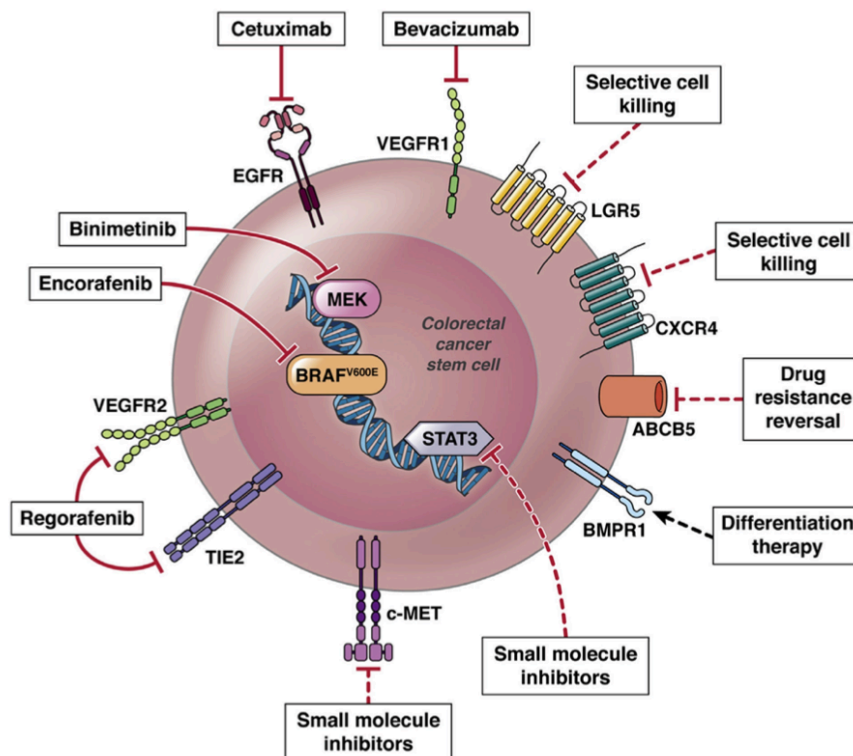


Figure 21 : Stratégies thérapeutiques de ciblage des CSCs

(D'après Frank *et al.*, 2021)

Le développement des thérapies ciblées dans le cadre de la prise en charge du CCR a permis d'améliorer considérablement la survie globale des patients. Ces thérapies, présentées en I.2.5.3, visent à perturber les voies cellulaires essentielles à la croissance mais aussi à la survie et à la formation de métastases. Dans la mesure où ces thérapies sont majoritairement destinées au stade métastatique et que ce stade semble être atteignable grâce aux CSCs, certaines de ces thérapies ciblées permettent d'éliminer spécifiquement ces cellules *via* le ciblage de certaines molécules. C'est ce qui est démontré dans la Figure 21 par les lignes continues, avec le ciblage de *BRAF*, de l'EGFR ou du VEGFR (Frank *et al.* 2021). Depuis

quelques années, s'ajoutent de nouvelles stratégies basées plutôt sur les propriétés de ces CSCs (lignes en pointillés, Figure 21) :

- Le ciblage de marqueurs distinctifs des CSCs tels que LGR5 ou CXCR4.

Dans un modèle murin réalisé à partir d'une xénogreffe, le ciblage des cellules LGR5+ a permis une régression tumorale mais discontinue. Après un certain temps, de nouvelles cellules LGR5+ ont émergé et ont réenclenché une progression tumorale (de Sousa e Melo *et al.* 2017; Parizadeh *et al.* 2019). Concernant CXCR4, son expression semble impliquée dans le processus métastatique et dans un modèle préclinique de métastase, l'élimination des CXCR4+ a permis de réduire l'intravasation tumorale et d'empêcher le développement de tumeurs secondaires chez plus de 80% des souris (Frank *et al.* 2021).

- Le blocage des pompes à efflux afin de sensibiliser les CSCs aux thérapies cytotoxiques.

Le blocage d'une pompe à efflux de la famille ABC (ATP-Binding Cassette), ABCB5, a aidé à sensibiliser les CSCs au 5-FU. Dans le même temps, ceci a permis d'inhiber la croissance et l'invasion tumorales en inversant les fonctions moléculaires intrinsèques de la pompe, liées à la signalisation anti-apoptotique de la TEM (Frank *et al.* 2021).

- L'activation de voies menant à la différenciation des cellules, les rendant sensibles aux thérapies conventionnelles.

L'administration de BMP4 à des souris immunodéprimées présentant des tumeurs dérivées de CSCs a permis d'augmenter les effets antitumoraux du FOLFOX, par induction de la différenciation mais aussi de l'apoptose et de la chimiosensibilisation (Ma *et al.* 2020; Frank *et al.* 2021). Une autre étude a mise en évidence que le BMP7_v, un variant de BMP7, favorisait la différenciation des CSCs et les sensibilisaient à la chimiothérapie, quels que soient les profils mutationnels, MSI ou CMS (Frank *et al.* 2021).

Le ciblage spécifique des CSCs est une approche primordiale dans la lutte anticancéreuse mais encore une fois, la plasticité des cellules tumorales peut entraîner l'échec d'une thérapie prometteuse en régénérant le pool de CSCs. En plus de leurs capacités plastiques, le MET semble jouer un rôle important dans la délivrance de signaux permettant aux cellules tumorales plus différenciées de se reprogrammer en CSCs (Jahanafrooz *et al.* 2020). Ce MET est un acteur fort de l'induction de l'angiogenèse ainsi que de la promotion de l'invasion tumorale et des métastases (Zalewski, Snook, et Waldman 2021). La prise en

charge du CCR nécessite une action multifactorielle pour éradiquer l'ensemble des cellules formant la masse tumorale mais aussi les cellules du MET présentant un rôle pro-survie afin d'être efficace et durable.

Les cellules tumorales mettent en place des tactiques variées afin d'échapper à l'immunité antitumorale ainsi qu'aux nombreuses thérapies engagées dans le but de les éliminer. Une autre de ces stratégies repose sur la sécrétion de vésicules extracellulaires leur permettant de communiquer à distance et ainsi d'assurer leur survie.

Chapitre III. Les vésicules extracellulaires

III.1. Biogenèse des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires sont une grande famille de vésicules incluant les exosomes (nanovésicules), les microvésicules ainsi que les corps apoptotiques. Des différences existent entre ces entités : leur taille, leurs propriétés ainsi que leur voie de sécrétion (Gurunathan, Kang, et Kim 2021). Dans ce travail de thèse, je ne me suis intéressée qu'à une seule entité : les petites vésicules extracellulaires communément appelées exosomes. Toutefois, les techniques et marqueurs d'identification des exosomes étant controversés depuis plusieurs années, je vais les qualifier de vésicules extracellulaires (EVs) dans mon manuscrit (Abels et Breakefield 2016).

Les EVs sont des nanovésicules dont la taille varie entre 50 et 150 nm, sécrétées par tous les types cellulaires du corps humain et donc retrouvées dans tous les fluides biologiques (Sumrin *et al.* 2018; Gurunathan, Kang, et Kim 2021). Généralement, les cellules cancéreuses sécrètent davantage d'EVs que leurs homologues saines (J. Zhou *et al.* 2017). À l'origine, il était admis que leur rôle était simplement d'éliminer les matières indésirables des cellules. Des recherches ultérieures ont permis de comprendre que la libération d'EVs est également un médiateur important de la communication intercellulaire, tout comme le sont la sécrétion de petites molécules solubles et les contacts cellulaires directs (Abels et Breakefield 2016).

Les EVs peuvent être formées de façon dépendante ou indépendante de l'ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) dont les processus sont finement régulés :

- Voie dépendante de l'ESCRT ou voie endosomale, voie majoritaire (Figure 22) : la première étape consiste en l'endocytose des molécules de surface et la fusion de ces vésicules d'endocytose formant les endosomes précoces (EE). Ces derniers suivent deux voies : soit ils renvoient la cargaison vers la membrane plasmique pour être recyclés, soit ils se transforment en endosomes tardifs (LE) ou corps multivésiculés (MVB). La membrane interne de ces MVB va ensuite bourgeonner pour séquestrer la cargaison et la distribuer au sein de vésicules intraluminales (ILV). Les molécules destinées à être dégradées sont triées dans les ILV avant de fusionner avec le lysosome. Les MVB peuvent également fusionner avec la membrane plasmique afin de libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire : c'est la sécrétion des EVs. La machinerie ESCRT se compose d'un complexe multiprotéique (ESCRT-0, I, II et III) allant

ubiquitinyler les substrats sur la partie de la membrane endosomale bourgeonnant vers l'intérieur pour former les ILV. Ces substrats ubiquitinylés seront destinés au lysosome pour leur dégradation ou seront « sauvés » par les enzymes de déubiquitinylation (DUB). Le transit des MVB vers la membrane plasmique est assuré par des Rab-GTPases notamment Rab27a et Rab27b et enfin la fusion du MVB avec la membrane pour libérer les vésicules dans le milieu extracellulaire est assuré par le complexe SNARE (Mashouri *et al.* 2019; Gurunathan, Kang, et Kim 2021).

- Voie indépendante de l'ESCRT, observée dans les mélanosomes, organites présents dans les mélanocytes et relatifs aux lysosomes / endosomes. Des protéines mélanosomales se chargent alors de la formation des ILV, clathrine-dépendante (Mashouri *et al.* 2019).

Une fois libérées, les EVs peuvent être internalisées par les cellules receveuses *via* des phénomènes d'endocytose ou de fusion avec la membrane plasmique libérant ainsi leur contenu ; mais des interactions ligand / récepteur sont également possibles (Abels et Breakefield 2016; Zhang et Yu 2019). La particularité des EVs c'est que leur échange peut avoir lieu dans tout l'organisme (Abels et Breakefield 2016).

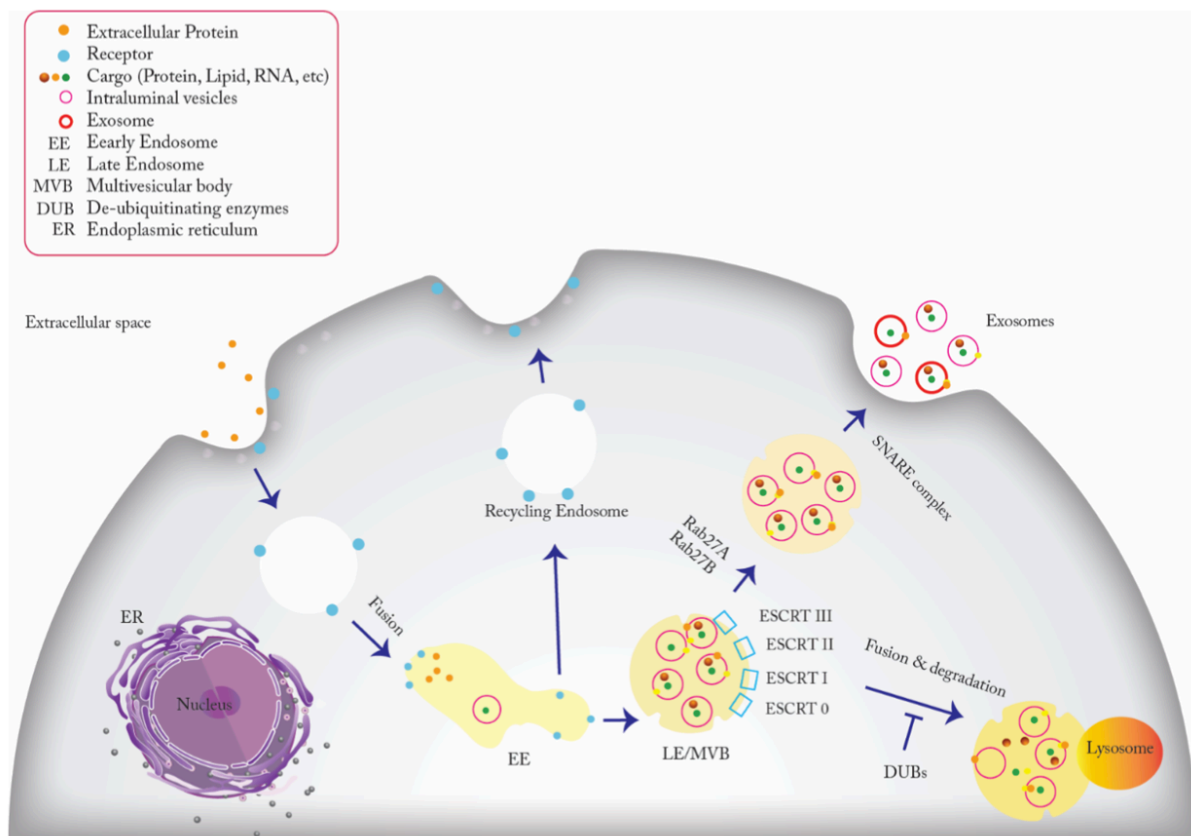


Figure 22 : Biogenèse des vésicules extracellulaires

(D'après Mashouri *et al.*, 2019)

III.2. Structure des vésicules extracellulaires

Les EVs, comme toute vésicule, sont constituées d'une membrane renfermant leur contenu, variable et ne reflétant pas seulement la composition de la cellule donneuse mais aussi le mécanisme de biogenèse ou encore les conditions physiologiques ayant mené à leur sécrétion. À la surface et au sein des EVs sont retrouvées de nombreuses protéines, des lipides ainsi que des acides nucléiques (ADN et ARN) (Figure 23), la majorité de ce cargo étant impliqué dans la biogenèse et la capacité de transport des EVs (Gurunathan, Kang, et Kim 2021). Les études de ce contenu ont entraîné la création de nombreuses bases de données répertoriant le cargo de différentes EVs en fonction de leur origine et de leur procédé de purification (Exocarta, Vesiclepedia, EVpedia) (Abels et Breakefield 2016).

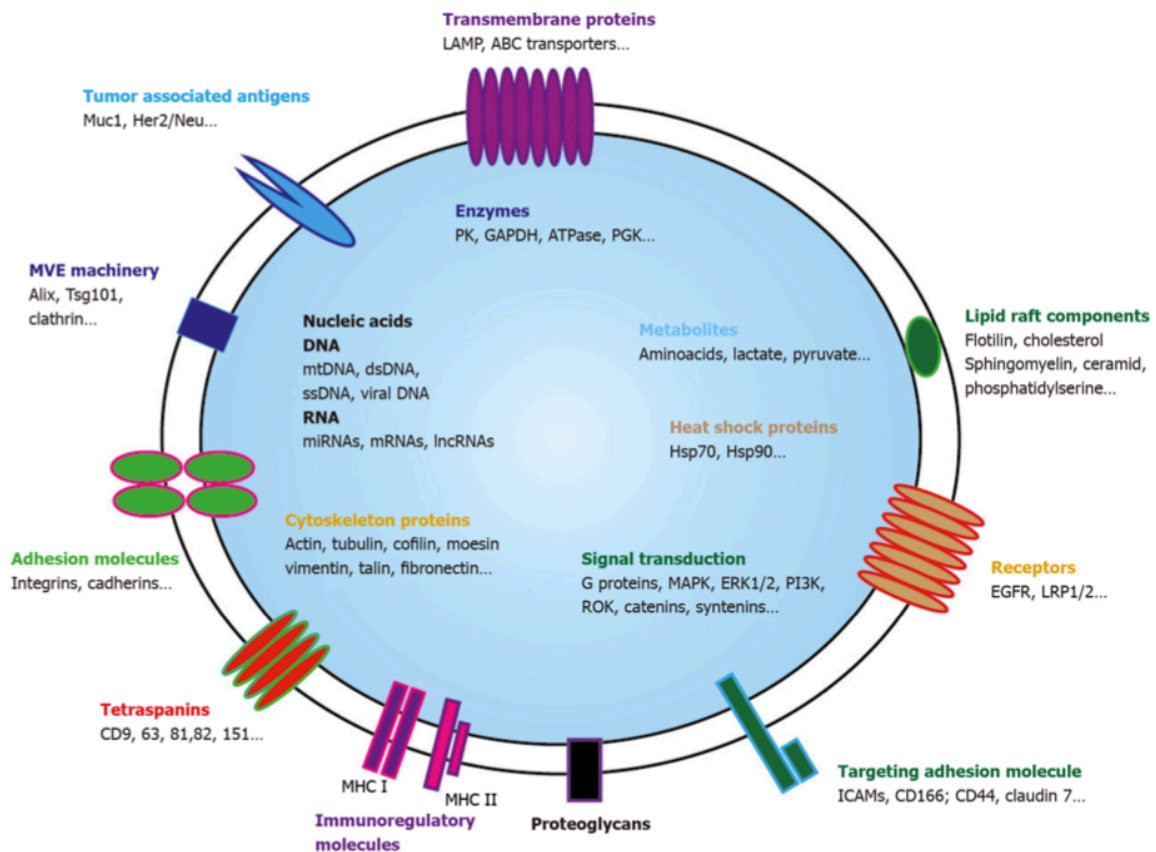


Figure 23 : Composition des vésicules extracellulaires

(D'après Mammes *et al.*, 2021)

Concernant le contenu en protéines, certaines proviennent spécifiquement du tissu d'origine des EVs alors que d'autres, principalement impliquées dans leur biogenèse ou leur transport, sont communes à toutes les EVs et serviront alors de marqueur d'identification (Mathivanan, Ji, et Simpson 2010) (Figure 23). C'est le cas notamment des tétraspanines responsables des événements de pénétration, d'invasion et de fusion des cellules (CD63,

CD81, CD9) mais aussi des protéines favorisant la formation des MVB (Alix, TSG101, Flotiline) ou encore des « heat shock » protéines (Hsc70 Hsc90) (Mashouri *et al.* 2019; Abels et Breakefield 2016; Gurunathan, Kang, et Kim 2021).

Le contenu lipidique peut également être spécifique du type cellulaire émetteur ou bien conservé. Les lipides ne présentent pas seulement un rôle protecteur de la forme des EVs mais participent activement à leur biogenèse ainsi qu'à la régulation de l'homéostasie au niveau des cellules réceptrices. Il a été démontré que leur ingestion pouvait modifier le contenu en cholestérol et en sphingomyéline de la cellule receveuse et donc influencer sur son homéostasie (Mashouri *et al.* 2019).

Enfin, le contenu en acides nucléiques est extrêmement varié notamment en ARN : ARNm, microARN, snRNA (petits ARN nucléaires), lncRNA (ARN non codants). La quantité de microARN contenue dans les EVs est bien plus importante que celle présente dans la cellule d'origine et cette découverte a amené à utiliser ces miARN comme biomarqueurs de certaines maladies (Sumrin *et al.* 2018).

En raison de la diversité des molécules qu'elles contiennent, une fois purifiées des liquides biologiques, ces vésicules peuvent transmettre de nombreuses informations sur un cancer.

III.3. Méthodes d'isolement des vésicules extracellulaires

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour isoler les EVs, basées sur leurs propriétés biophysiques et biochimiques (taille, densité, forme) et sont résumées en Figure 24 (Coumans *et al.* 2017).

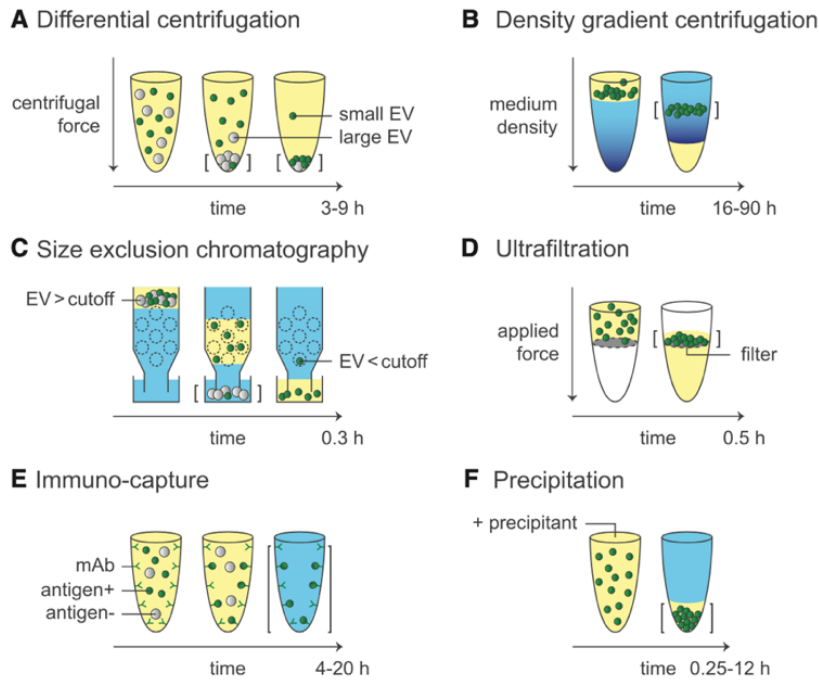


Figure 24 : Méthodes d'isolement des vésicules extracellulaires

(D'après Coumans *et al.*, 2017)

La méthode utilisée durant mes travaux de thèse est la méthode gold standard d'isolement des EVs et correspond à la centrifugation différentielle ou ultracentrifugation (UC). Elle isole les EVs selon leur taille et leur densité par l'augmentation séquentielle de la force centrifuge. Une première et courte centrifugation va culotter les cellules et les débris (30 min à 1500g) puis une première ultracentrifugation à 120 000g durant 90 min va permettre de culotter les EVs. Enfin, une seconde ultracentrifugation aux mêmes réglages permettra de les laver.

Tout comme exposé en Figure 24, il est également possible d'isoler les EVs en fonction de leur densité par centrifugation en gradient de densité ; mais également de leur taille par chromatographie d'exclusion ou ultrafiltration. L'immunocapture se base sur l'utilisation d'un anticorps allant reconnaître spécifiquement une protéine à la surface des EVs tandis que la précipitation repose sur l'utilisation d'un agent allant agglutiner les EVs (Coumans *et al.* 2017).

Il est important de noter que ces méthodes sont nombreuses, ne permettent pas d'isoler seulement les EVs et qu'il est possible de retrouver des contaminants de type : protéines solubles, lipoprotéines ou d'autres types de particules. Toutes ces stratégies d'isolement affectent la concentration en EVs et le choix doit s'effectuer en connaissant les limites de chacune (Tableau 6). Durant ces travaux, nous avons pris le parti d'analyser l'effet produit par les EVs sur les cellules et non les techniques permettant leur isolement.

	DC	DGC	SEC	UF	IC	Precip.
Isolation						
Major contaminant	Similar-sized particles	Lipoproteins	Same size particles	Same size particles	Soluble proteins	Protein
Major artifact	EV-particle aggregates			EV-particle aggregates		Protein complex, EV-particle aggregates
EVs/ μ g protein increase (fold)*	1–15	1–20	70–560	1–10	1–50	1–3
Concentration						
Volume reduction (fold)*	0.2–8	\approx 1	0.2	<240	5	\approx 50
EVs recovery, %*	2–80	10	40–90	10–80		90
Practical						
Assay time, h	3–9	16–90	0.3	0.5	4–20	0.3–12
Sample volume	mL-L	μ L-mL	μ L-mL		μ L-mL	μ L-mL
Clinical applicability	No	No	Yes	No	Yes	Yes

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques d'isolement des EVs

(D'après Coumans *et al.*, 2017 ; DC = Differential Centrifugation, DGC : Density Gradient Centrifugation, SEC : Size Exclusion Chromatography, UF : UltraFiltration, IC : ImmunoCapture, Precip. : Précipitation)

L'isolement des EVs et leur étude a permis de mettre en évidence leurs nombreux rôles dans la progression de nombreux cancers dont le CCR.

III.4. Rôles des vésicules extracellulaires dans le cancer colorectal

Dans le cadre de nombreux cancers, les EVs peuvent être utilisées en tant que biomarqueur à des fins diagnostiques ou pronostiques et les informations concernant leurs rôles dans la progression tumorale ne cessent de s'accumuler. L'avantage de leur étude est qu'elle permet une vue globale des propriétés de la tumeur sans avoir à réaliser d'acte invasif.

III.4.1. Les vésicules extracellulaires en tant que biomarqueurs

Il a été démontré que des patients atteints de CCR présentaient une quantité d'EVs plasmatique deux fois supérieure à celle de témoins sains. De plus, cette forte quantité a été associée à des concentrations élevées d'antigènes cancéreux, à des tumeurs peu différenciées ainsi qu'à une survie limitée. De nombreuses recherches ont confirmé que le niveau

d'expression anormal de certains miARN dans les fluides corporels de patients atteints d'un CCR constituait un biomarqueur fiable pour le diagnostic précoce de la maladie et l'évaluation du stade (J. Zhou *et al.* 2017). Un panel de sept miARN (let-7a, miR-1229, miR1246, miR-150, miR-21, miR-223 et miR-23a) présents dans les EVs s'est avéré être significativement surexprimé en cas de CCR primaire, même à un stade précoce, en comparaison aux témoins sains. Par ailleurs, ces niveaux régressaient fortement et de façon significative suite à la résection de la tumeur. Cette différence d'expression de nombreux miARN dérivés des EVs avant et après thérapie constitue la base de l'évaluation de l'effet thérapeutique d'un traitement ainsi que du pronostic. Par exemple, le niveau d'expression sérique du cluster miR-17-92a est en corrélation avec la récurrence du CCR. La même étude a rapporté que les patients opérés présentant une concentration sérique élevée de miR-19a présentaient un mauvais pronostic comparé à ceux dont l'expression était faible. Un stade avancé de CCR peut être détecté *via* la quantification du miR-193a, bien plus élevée qu'en cas de stade précoce (J. Zhou *et al.* 2017). Les miARN sont très utilisés dans le suivi du CCR en raison de prédominance et de leurs nombreux rôles, résumés en Tableau 7, mais les protéines présentent également un fort potentiel de biomarqueur.

Exosomal miRNAs	Major Conclusions
miR-210	Contributing to EMT, anoikis resistance and metastatic potential
miR-220C, miR-141	Up-regulating EMT, promoting invasion
miR-375	Inducing CRC cell apoptosis through blocking Bcl-2
miR-200c, miR-141, miR-429	Decreasing expressions of ZEB2 and SNAI, reprogramming the stroma in the metastatic process
let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223, and miR-23a	The serum exosomal level of these 7 miRNAs are significantly higher in CRC patients than healthy controls.
miRNA-19a	A prognostic biomarker for recurrence in CRC
miR-379	Inhibiting CRC cells proliferation and migration
miR-193a	Higher levels of exosomal miR-193a are found in advanced stage patients.
miR-100	miR-100 is selectively enriched in exosomes derived from mutant K-Ras CRC cells and transferred into wild type CRC cells.

Tableau 7 : Les miARN dérivés des EVs et leurs rôles fonctionnels dans le CCR

(D'après J. Zhou *et al.*, 2017)

Les protéines présentent aussi des modulations d'expression intéressantes comme l'a démontré une étude ayant mis en évidence que 36 protéines étaient régulées à la hausse et 22 autres à la baisse dans les EVs sériques de CCR. La surexpression de ces protéines a été associée à la formation de métastases tandis que leur sous-expression a été associée à la croissance tumorale et à la survie des cellules. Les protéines Hsp60 et Glypican-1, également

surexprimées dans les EVs de CCR peuvent être considérées comme des biomarqueurs potentiels. Tout comme certains miARN, leur expression revient à la normale après intervention chirurgicale (J. Zhou *et al.* 2017; Mammes *et al.* 2021). À l'inverse, la faible expression dans les EVs de CCR de la protéine Copine III est associée à une meilleure survie (Mammes *et al.* 2021).

Les EVs renferment de nombreuses informations pertinentes et sont de plus en plus étudiées pour leur potentiel de biomarqueur, permettant la détection d'un cancer ou l'estimation du pronostic du patient sans avoir recours à une biopsie. Toutefois, le rôle des EVs demeure de transmettre des informations aux cellules voisines ou distantes et de ce fait, elles sont des actrices majeures de l'oncogénèse.

III.4.2. Rôles dans la progression tumorale

Les cellules tumorales produisent énormément d'EVs afin de communiquer entre elles et avec leur environnement en influant sur les fonctions des cellules cibles. L'échange d'EVs leur permet de favoriser leur croissance, leurs capacités migratoires, la formation de métastases mais aussi de moduler les cellules du MET afin d'inhiber la réponse immunitaire antitumorale et d'approvisionner la tumeur en nutriments (Figure 25).

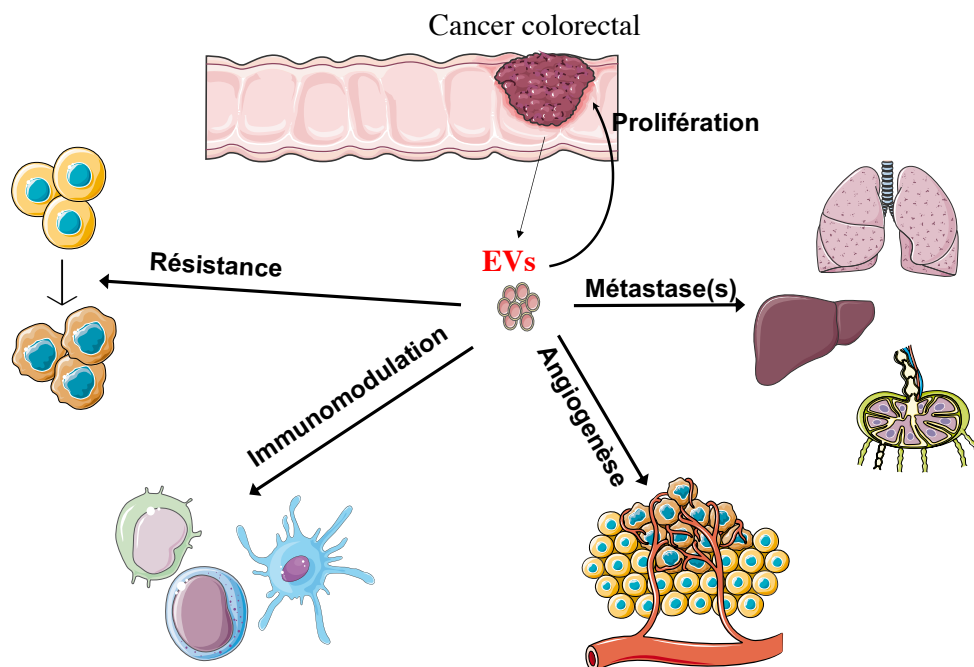


Figure 25 : Rôles des EVs dans la progression du cancer colorectal

(Réalisée d'après Ahmadi *et al.*, 2021)

III.4.2.1. Rôles dans l'angiogenèse et la formation de métastases

La première étape de la formation de métastases consiste en la dissémination locale des cellules tumorales et ce processus passe par la modification du MET, possible en partie par les sécrétions d'EVs (Figure 26). Les cellules tumorales vont induire la transformation des cellules stromales en CAFs (Cancer-Associated Fibroblasts) *via* le transfert d'EVs contenant du TGF- β . Il a été démontré que les EVs provenant de cellules tumorales primaires ou métastatiques pouvaient également influencer sur le phénotype de CAFs : prolifératif ou invasif, par la reprogrammation de leur protéome. Les CAFs ne sont pas les seules cellules du MET à être modifiées : les macrophages environnants vont évoluer en macrophages de type M2 (ou TAMs : Tumor-Associated Macrophages) par le transfert du miR-1246 sécrété au sein des EVs par les cellules tumorales *TP53* mutées. Les cellules endothéliales vont aussi être modifiées par l'échange de VEGF-A, facteur angiogénique, favorisant ainsi la migration de ces cellules et donc l'angiogenèse, notamment en cas d'environnement hypoxique. Cette communication n'est pas unidirectionnelle et les cellules du MET modifiées par les EVs vont en retour pouvoir favoriser la pérennité et l'évolution des cellules tumorales. En effet, le transfert du miR-92a-3p, présent dans les EVs sécrétées par les CAFs, va induire la TEM des cellules tumorales et ainsi favoriser le développement métastatique. Il en va de même pour les TAMs induisant leur migration et l'activation de leurs propriétés souches en leur transférant les miR21-5p et miR-155-5 ou encore la protéine WNT (Lafitte, Lecointre, et Roche 2019). Les cellules tumorales sont également en mesure de s'échanger entre elles des molécules allant favoriser leur prolifération et leur migration par activation autocrine de la voie AKT (Ahmadi *et al.* 2021). De la même façon, elles se stimulent entre elles pour activer la TEM et promouvoir leur capacité invasive *via* l'échange du miR-210 (Mannavola *et al.* 2019).

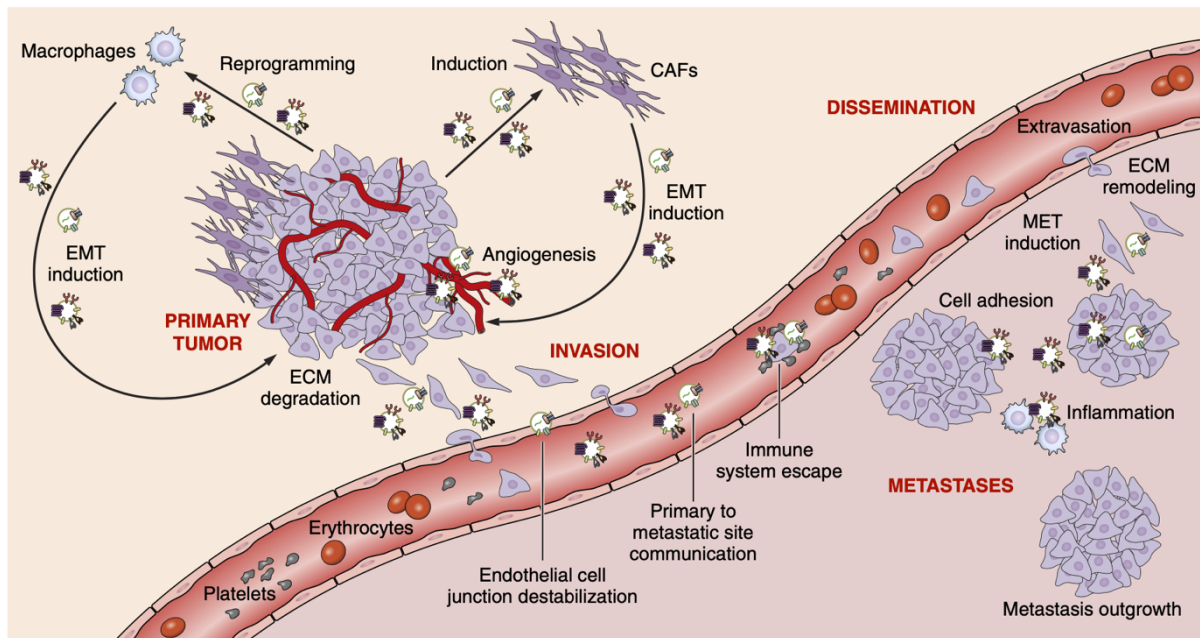


Figure 26 : Vue d'ensemble des rôles des EVs sur le développement métastatique

(D'après Lafitte *et al.*, 2019)

III.4.2.2. Rôles dans la résistance thérapeutique

Le recours aux chimiothérapies est l'option thérapeutique la plus utilisée pour traiter les patients atteints d'un CCR, et la résistance à ces drogues est responsable de la majorité des échecs thérapeutiques. De nombreuses études ont mis en évidence que les EVs dérivées de cellules tumorales ou du MET étaient impliquées dans ces phénomènes (Figure 27). Les CAFs sécrètent des EVs contenant des molécules facilitant la survenue de « stem-like cells » stimulant ainsi la chimiorésistance (Namee et O'Driscoll 2018; Mannavola *et al.* 2019). Ces fibroblastes pro-tumoraux sécrètent également des miRNA et des lncRNA capables d'induire une résistance à l'oxaliplatine par l'activation des voies AKT et β -caténine dans les cellules tumorales. L'activation de la voie STAT3 par internalisation d'EVs contenant le miR-196b-5p est un procédé rendant les cellules tumorales résistantes au 5-FU (Mannavola *et al.* 2019; Ahmadi *et al.* 2021). De plus, une équipe a pu mettre en évidence la présence d'EGFR au niveau de la membrane d'EVs dérivées de cellules tumorales. Cette découverte pourrait expliquer la résistance aux anticorps monoclonaux (mAbs) anti-EGFR. En effet, l'EGFR présent au niveau des EVs pourrait lier les mAbs en circulation, agissant tel un récepteur leurre, afin de réduire la biodisponibilité des drogues. Ce mécanisme a été illustré dans de nombreux autres cancers concernant notamment les anti-VEGFR (Mannavola *et al.* 2019).

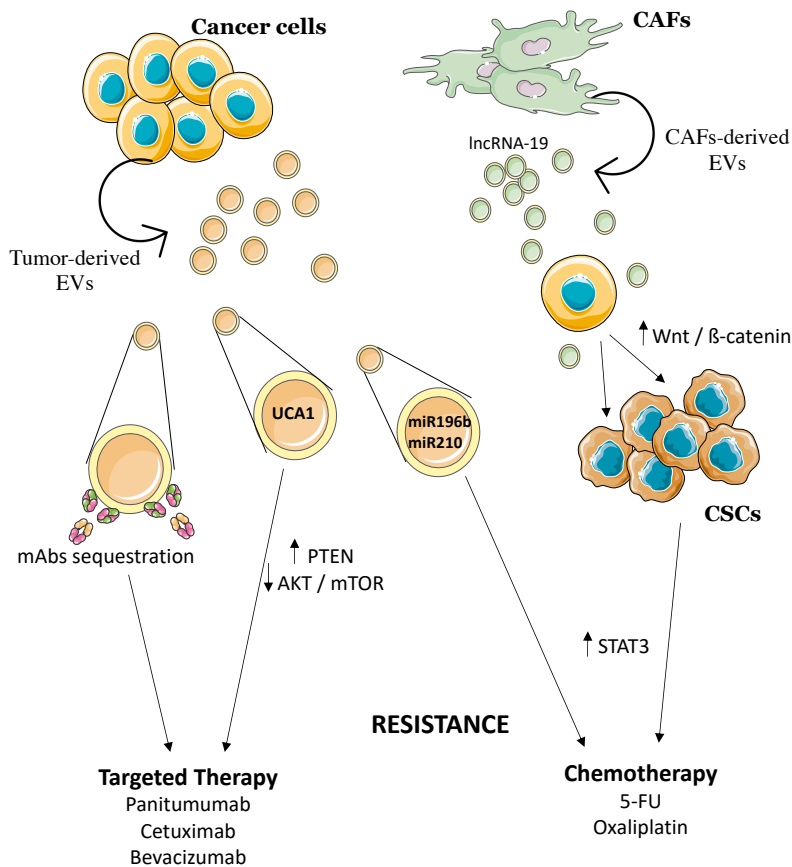


Figure 27 : Mécanismes de résistance thérapeutique médiés par les EVs

(Adaptée de Mannavola *et al.*, 2019 ; mAbs : monoclonal Antibodies)

III.4.2.3. Rôles sur le système immunitaire

Une des étapes critiques du développement tumoral est l'établissement d'un environnement immunosuppresseur, principalement induit par une hypoxie chronique ou une inflammation. Les EVs présentent également un rôle dans la propagation de signaux inhibiteurs du système immunitaire et affectent la prolifération, la maturation mais aussi l'activité antitumorale des cellules immunes (Figure 28). Afin de limiter les contacts directs cellule à cellule, les cellules tumorales vont libérer des EVs allant délivrer des signaux de mort tels que le FasL et TRAIL allant induire l'apoptose des lymphocytes T CD8⁺ (LTc). Elles peuvent également transmettre du TGF-β allant entraîner l'expansion de LT régulateurs, ces derniers pourront alors inhiber l'activité antitumorale de leurs homologues cytotoxiques (Lafitte, Lecointre, et Roche 2019; Mannavola *et al.* 2019; Yamada *et al.* 2016). Il a été évoqué précédemment l'implication des EVs dans la transformation de macrophages en TAMs, ces cellules présentent un rôle immunosuppresseur et vont donc permettre de renforcer cette inhibition (Popēna *et al.* 2018; Mannavola *et al.* 2019).

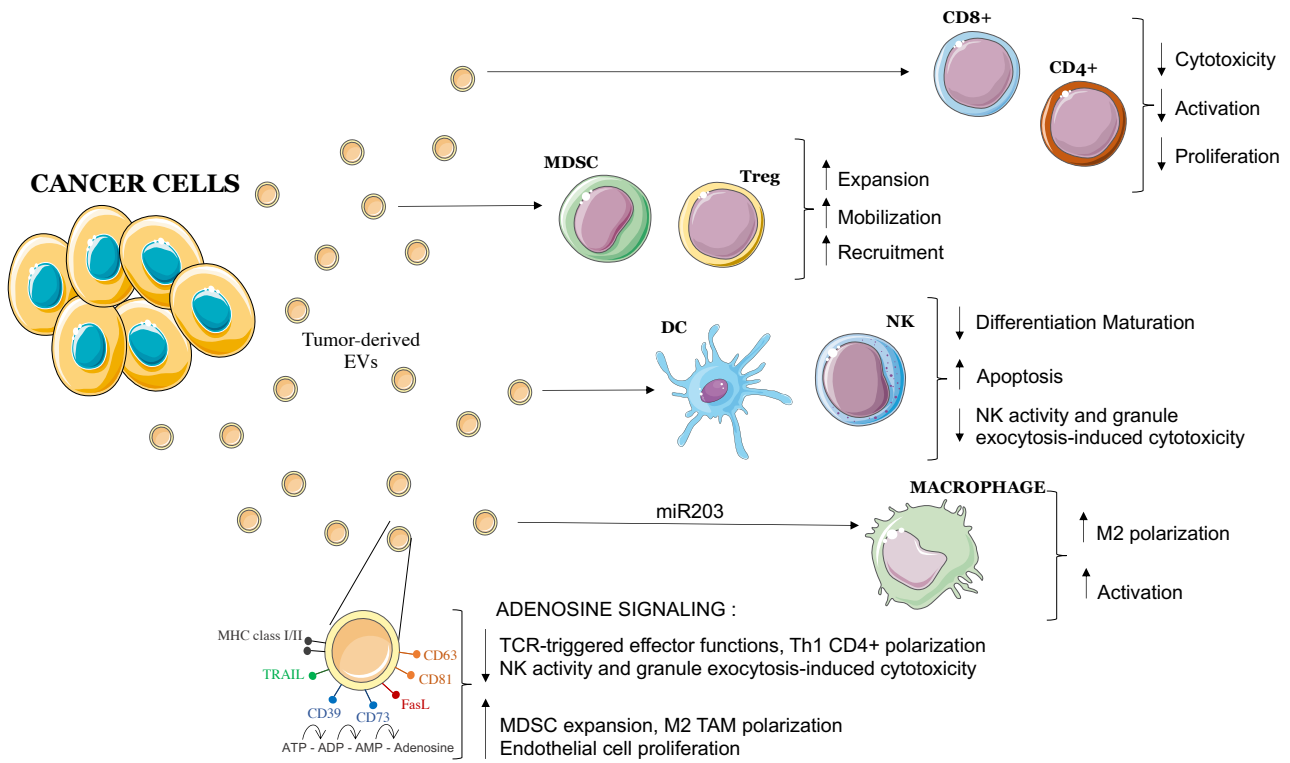


Figure 28 : Effets des EVs de CCR sur le système immunitaire

(Adaptée de Mannavola *et al.*, 2019 ; MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cell, DC : Dendritic Cell)

Les vésicules extracellulaires constituent une armée utilisée par les cellules tumorales dans le but de les protéger du système immunitaire et des thérapies, de favoriser leur expansion et d'utiliser les cellules du MET à leur avantage. Au vu de la diversité de leurs effets, il serait intéressant de développer des molécules thérapeutiques limitant leurs actions.

III.5. Les vésicules extracellulaires en tant que cible thérapeutique

Compte tenu des nombreux rôles des EVs dans la progression tumorale, il serait cohérent qu'une diminution de la quantité d'EVs sécrétée puisse constituer une opportunité thérapeutique pour inhiber la progression tumorale. Trois stratégies potentielles sont explorées (Urabe *et al.* 2020; Mammes *et al.* 2021):

- L'élimination des EVs circulantes : le principe repose sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de protéines présentes à la surface des EVs, qu'il s'agisse de protéines de structure ou des protéines surexprimées spécifiquement dans les EVs dérivées de cellules tumorales (exemple de PD-L1 dans le mélanome métastatique).
- L'inhibition de la sécrétion d'EVs : cette approche repose sur l'inhibition de molécules impliquées dans la biogenèse des EVs. Toutefois, dans la mesure où ces mécanismes sont communs à toutes les EVs et pas seulement à celles dérivées des cellules tumorales, il est nécessaire d'identifier des mécanismes de sécrétion spécifiques des cancers. Une étude portant sur le cancer de la prostate a réussi à identifier un

métabolite microbien capable d'inhiber les sécrétions d'EVs des cellules tumorales sans affecter celles des cellules épithéliales normales de la prostate. Puisque la biogenèse des EVs est complexe, les plateformes de criblage à haut débit sont essentielles pour en révéler tous les détails et ainsi pouvoir identifier des cibles éventuelles.

- La perturbation de l'absorption des EVs : basée également sur le ciblage de protéines exprimées à la surface des vésicules car il a été démontré qu'après un traitement à la protéinase K, l'absorption des EVs était amoindrie. Une fois encore, le mécanisme d'internalisation de ces vésicules nécessite d'être parfaitement compris et pour le moment, aucune étude n'a réussi à démontrer un effet antitumoral de cette perturbation.

Les stratégies d'inhibition des EVs présentent un grand potentiel en tant que stratégie thérapeutique mais n'en sont encore qu'à leurs prémices. À l'inverse, l'utilisation des EVs comme outil thérapeutique est une stratégie bien plus documentée et étudiée.

III.6. Utilisation des vésicules extracellulaires comme outil thérapeutique

Le recours aux EVs en tant que vecteurs naturels pour l'acheminement de thérapies, d'anticorps ou d'ARN est très étudié depuis quelques années en raison de leurs nombreuses plus-values. Ces entités sont biocompatibles, biodégradables et de ce fait, moins toxiques et immunogéniques que d'autres systèmes de transport tels que les liposomes ou les nanoparticules polymériques (Mammes *et al.* 2021). Les EVs améliorent la stabilité des drogues puisqu'elles les protègent de la dégradation des enzymes extracellulaires et leur capacité à cibler les cellules tumorales est 10 fois supérieure à celle des liposomes de même taille. Un autre avantage majeur de ces vésicules est qu'elles peuvent pénétrer les barrières anatomiques et que leur composition en lipides les protège de la phagocytose du système réticulo-endothélial. Nombreuses sont les études ayant démontré le potentiel de la thérapie par les EVs pour délivrer divers médicaments comme la curcumine, le paclitaxel ou la doxorubicine. Dans un modèle murin de CCR, la doxorubicine empaquetée dans des EVs a démontré une meilleure stabilité ainsi qu'une meilleure prise en charge par les cellules tumorales que la doxorubicine libre, normalement utilisée. Cela a permis de supprimer significativement la croissance tumorale et de prolonger la durée de vie des rongeurs (Mammes *et al.* 2021). Des EVs chargées de paclitaxel ont été testées dans le traitement de cancers à résistances multiples et il a été mis en évidence que les vésicules surmontaient les effets négatifs des pompes à efflux, réduisant la croissance métastatique par rapport aux contrôles (Mammes *et al.* 2021).

L'utilisation des EVs en tant que vaccin tumoral est également très prometteuse car elles peuvent délivrer ou présenter des antigènes dérivés de tumeurs allant activer l'immunité. En 2008, un essai clinique de phase I a démontré que combiner les EVs d'ascites des patients avec du GM-CSF induisait une réponse sûre et efficace des LT cytotoxiques dans le traitement du CCR avancé (Mammes *et al.* 2021). Également, le « DC exosome vaccine » correspondant à l'utilisation d'EVs provenant de cellules dendritiques et renfermant des antigènes tumoraux est à l'étude. Les cellules dendritiques jouent alors leur rôle de CPA aux cellules immunitaires. En comparaison au « DC vaccin », rapidement éliminé par les LT cytotoxiques spécifiques de l'antigène, le vaccin à base d'EVs présente une durée de vie plus longue et semble donc être une bonne alternative (Zhang et Yu 2019). Débutés il y a plus de 10 ans, les essais cliniques évaluant l'intérêt thérapeutique antitumoral des EVs sont actuellement nombreux et concernent presque tous les cancers prouvant que cette piste est plus que prometteuse (Shehzad *et al.* 2021).

Objectifs de la thèse

Le CCR est un des cancers les plus diagnostiqués et les plus meurtriers en France, quel que soit le sexe. L'étude de la carcinogénèse colique ainsi que les nombreux systèmes de classification des tumeurs ont permis d'adapter la prise en charge thérapeutique de cette maladie améliorant considérablement la survie des patients. Toutefois, des récurrences surviennent fréquemment et font suite à la maladie résiduelle minimale où une partie des cellules tumorales persiste grâce à une résistance aux thérapies conventionnelles. Ces cellules tumorales sont les CSCs, présentant un phénotype particulièrement plastique les rendant difficiles à éradiquer. Leur caractérisation constitue un véritable challenge puisque les techniques doivent être multiples pour affirmer de leur statut souche : expression de marqueurs particuliers et exploration de nombreuses propriétés fonctionnelles. En plus d'être multiples, ces techniques sont longues, coûteuses et nécessitent des équipements particuliers. Or, lors de la prise en charge d'un cancer, la rapidité d'action est essentielle et la mise en évidence précoce de ces CSCs permettrait d'adapter la prise en charge des patients et ainsi de limiter la survenue de rechutes. Dans cette optique, notre équipe a mené un travail collaboratif avec un laboratoire de l'institut Xlim, ayant permis de développer un laboratoire sur puce capable de mesurer les propriétés électromagnétiques des cellules. Des travaux précédents du laboratoire ont démontré la pertinence de ces propriétés dans la caractérisation des CSCs dans un modèle de glioblastome, ces cellules présentant des propriétés biophysiques distinctes de celles des cellules différenciées ; se traduisant par une signature électromagnétique bien inférieure. Le premier objectif de mes travaux de thèse a donc été de transposer cet outil physique au modèle de CCR afin de déterminer si la discrimination des CSCs par rapport aux cellules différenciées était également possible. Dans un second temps, en raison de l'implication certaine des EVs sur la progression tumorale, nous nous sommes intéressées au transfert d'agressivité intercellulaire médié par ces vésicules. Le second objectif de mes travaux a été d'étudier l'impact biologique d'un transfert d'EVs entre cellules tumorales à différents stades de CCR et dans différentes conditions de culture. Ensuite, d'évaluer la capacité du biocapteur à percevoir les changements induits dans les cellules traitées par les EVs. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée « **UHF-Dielectrophoresis Microfluidic Lab-on-a-Chip to detect the transformation potential of extracellular vesicles derived from Cancer Stem Cells** » déposée sur la plateforme *Preprints* de MDPI et qui sera soumise au journal *Cells* très prochainement.

Enfin, durant mes travaux de thèse nous nous sommes également intéressées au volet immunologique du CCR notamment concernant les phénomènes d'inhibition du système immunitaire. En effet, son rôle est important dans la progression du cancer et l'infiltration de la tumeur par les cellules immunes est un élément pronostique majeur. C'est la raison pour laquelle le troisième objectif de ces travaux de thèse a été l'étude de l'impact des sécrétions vésiculaires de cellules tumorales sur les cellules immunes. Des PBMC d'individu sain ont été mis en contact avec des EVs provenant de cellules tumorales, souches ou différenciées, afin de mesurer leur(s) effet(s) inhibiteur(s) sur les lymphocytes T et les cellules NK ; cellules cytotoxiques majeures de la lutte antitumorale. Ces travaux étant préliminaires, ils n'ont pas fait l'objet d'une publication mais seront présentés en deuxième partie du Chapitre V.

Chapitre IV. Matériels et méthodes

IV.1. Culture cellulaire

IV.1.1. Lignées cellulaires et cultures primaires de patients

Les lignées cellulaires de cancer colorectal SW480 et SW620 ont été achetées auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection) et proviennent du même patient à différents stades de la maladie. La SW480 provient de la tumeur primaire lors du stade II et la SW620 provient du stade III lorsque la tumeur s'est étendue aux ganglions lymphatiques adjacents. Ces cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de sodium pyruvate ainsi qu'un 1% d'antibiotiques de type pénicilline et streptomycine (Gibco).

Deux cultures primaires de patients (CPP) atteints d'un CCR, ont été fournies par Julie Pannequin (Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier) après consentement éclairé des patients (Accord de transfert de matériel CNRS 190287). Ces CPP, dont les caractéristiques sont résumées en Tableau 8, proviennent toutes deux d'une tumeur primaire et sont cultivées en milieu DMEM GlutaMAX™ (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF et 1% de pénicilline / streptomycine (Gibco).

Ces conditions correspondant aux conditions de culture classiques des cellules, elles seront référencées tout au long de ce manuscrit en tant que culture dans un « milieu normal ou NM ».

	CPP14	CPP6
Origine	Côlon gauche	Côlon transverse
Mutation	KRAS	
Métastase(s)		Foie & poumons
Statut TNM	T2N0M0	T4N2M1
Stade	I	IV

Tableau 8 : Caractéristiques des cultures primaires de patients

À l'inverse, dans le but d'enrichir la population en CSCs, les lignées ainsi que les CPP sont cultivées au moins 1 semaine dans un milieu dit « défini », composé de DMEM/F12 (Gibco) dépourvu de SVF mais supplémenté avec 5 µg/mL d'insuline, 1X de suppléments N-2, 1% d'antibiotiques (Gibco) ainsi que 20 ng/mL d'EGF et de bFGF (Miltenyi Biotec). Cette

condition de culture sera quant à elle référencée en tant que culture en « milieu défini ou DM ».

L'entretien des cellules est réalisé deux fois par semaine après décollement par Trypsine-EDTA 0,05% (Gibco) puis ensemencement d'un million de cellules dans 10 mL de milieu de culture en flasque T75.

IV.1.2. Cellules mononucléées du sang périphérique ou PBMC

Du sang est prélevé d'un individu sain sur tube EDTA afin d'en isoler les PBMC par centrifugation sur gradient de densité. Pour se faire, le sang est délicatement déposé sur 5 mL de Ficoll (GE Healthcare) puis le tube est centrifugé 25 min à 700g. L'anneau cellulaire correspondant aux PBMC est ensuite prélevé et les cellules lavées dans du PBS. Une numération est effectuée puis les PBMC sont mis en culture à la concentration de 5 millions de cellules dans 5 mL de milieu de culture, le même que pour les lignées cellulaires (RPMI 1640 GlutaMAX™ + 10% SVF + 1% sodium pyruvate + 1% pénicilline / streptomycine). Afin d'activer spécifiquement les LT, les PBMC sont traités par 1 µg/mL d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (BioLegend) durant 48h. Dans une seconde flasque, les cellules NK sont spécifiquement activées par 20 ng/mL d'IL-15 (R&D) durant 48h également.

Toutes les cultures cellulaires (lignées, CPP, PBMC) sont réalisées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide composée à 95% d'air et 5% de CO₂.

IV.1.3. Traitement des cellules par des EVs

Toutes les cellules traitées par des EVs sont des cellules cultivées en milieu normal (NM).

IV.1.3.1. Traitement de la lignée SW480 et des CPP

La lignée SW480 est traitée avec des EVs provenant de la lignée SW620, cultivée en NM ou DM. Pour se faire, 0,25.10⁶ cellules SW480 sont ensemencées en flasque T25 puis laissées à adhérer durant la nuit. Le lendemain, le milieu de culture est retiré et les cellules lavées en PBS avant d'être mises en contact avec des EVs provenant de la lignée SW620 pour une durée de 48h. Après 48h, les cellules sont récupérées et diverses analyses sont réalisées.

Les CPP14 et CPP6 sont traitées avec des EVs provenant de cellules CPP6, cultivées en NM ou DM concernant les CPP14, ou seulement en DM concernant les CPP6. Comme pour les SW480, les CPP sont ensemencées à 0,25.10⁶ cellules en flasque T25 et laissées à adhérer sur la nuit. Contrairement aux SW480, les CPP sont traitées par deux fois avec des

EVs sur une durée de 72h. Brièvement, une fois adhérentes, les cellules sont lavées en PBS puis mises au contact des EVs. Après 24h, un second traitement a lieu et 72h après le premier traitement, les cellules sont récupérées et les analyses effectuées.

La quantité d'EVs utilisée pour traiter les $0,25 \cdot 10^6$ cellules (SW480, CPP14, CPP6) correspond à la quantité d'EVs sécrétée par $1 \cdot 10^6$ cellules SW620 ou CPP6, cultivées en milieu normal ou défini durant 48h. Après isolement des EVs (IV.2.1), ces dernières sont resuspendues dans 5 mL de milieu de culture exo-free correspondant au milieu de culture classique dont le SVF a été préalablement ultracentrifugé 16h à 120 000g afin de le dépleter en EVs bovines. Ici, le ratio de traitement correspond donc à 250 000 cellules traitées par des EVs sécrétées par 1 million de cellules. Quelques soient les analyses effectuées, ce ratio demeure constant et se trouve seulement ajusté en fonction des conditions expérimentales. Par exemple, si 5000 cellules sont traitées, elles le seront avec 100 μ L d'EVs (100 μ L de la suspension de 5 mL précédemment réalisée).

IV.1.3.2. Traitement des PBMC

Une fois activés, les LT ou NK sont traités durant 48h avec des EVs provenant de la lignée cellulaire SW480, cultivée en NM ou DM. Après centrifugation des suspensions cellulaires puis un lavage en PBS, 5 millions de cellules (LT ou NK) sont mises en contact avec les EVs durant 48h. De façon similaire avec les cellules tumorales, la quantité d'EVs utilisée correspond à la quantité de vésicules sécrétées par $1 \cdot 10^6$ cellules SW480 cultivées 48h en milieu normal ou défini puis resuspendues dans 5 mL de milieu de culture exo-free.

IV.2. Vésicules extracellulaires

IV.2.1. Isolement

Afin d'isoler les EVs sécrétées par les lignées SW480 et SW620, $1 \cdot 10^6$ cellules sont mises en culture dans 10 mL de NM en flasque T75 et laissées à adhérer pour la nuit. Le lendemain, après un lavage en PBS, 10 mL de milieu de culture exo-free est déposé sur les cellules et après 48h de culture, le surnageant contenant les EVs est récupéré.

Concernant la culture en DM, $1 \cdot 10^6$ de cellules sontensemencées dans 10 mL de milieu défini durant une semaine. Au bout de 7 jours, le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf pour 48h puis le surnageant est récupéré pour ultracentrifugation.

Afin d'éliminer les débris, une centrifugation de 30 min à 1500g est réalisée puis l'échantillon est ultracentrifugé une première fois à 120 000g pendant 90 min afin de culotter

les EVs. Une fois le surnageant retiré, les EVs sont resuspendues en PBS et de nouveau ultracentrifugées 90 min à 120 000g afin de laver les vésicules. Elles sont ensuite resuspendues dans 5 mL de milieu de culture exo-free, en PBS ou dans du tampon RIPA en fonction des analyses à réaliser.

IV.2.2. Caractérisation

Afin de vérifier qu'après ultracentrifugations nous récupérons effectivement des EVs, une caractérisation protéique par western blot est réalisée ainsi qu'une analyse de leur distribution en taille par NTA.

IV.2.2.1. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Après ultracentrifugations, les EVs sont resuspendues en PBS puis l'analyse NTA est réalisée à l'aide du NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Ltd.) en se basant sur des paramètres conformes au manuel d'utilisation du fabricant (NanoSight NS300 User Manual, MAN0541-01-EN-00, 2017). Le niveau de la caméra étant réglé sur 14 et le seuil de détection sur 5. Les échantillons sont préalablement dilués dans du PBS afin d'ajuster leur concentration dans le but d'obtenir un nombre de particules par image situé entre 30 et 100. Pour chaque échantillon, cinq vidéos consécutives de 60 s sont enregistrées dans les conditions suivantes : température de la cellule à 25°C, vitesse d'injection de la seringue de 22 $\mu\text{L/s}$ (100 a.u.). Les particules, ici les EVs, sont détectées à l'aide d'un laser à 488 nm (bleu) et d'une caméra scientifique CMOS. Les captures ainsi que les analyses sont réalisées à partir du logiciel NanoSight intégré NTA3.3.301 (Malvern Panalytical Ltd.). Parmi les informations collectées par le logiciel, sont étudiés : le mode (la taille d'EVs la plus représentée dans l'échantillon), le pourcentage d'EVs dont la taille est comprise entre 50 et 150 nm et enfin le nombre de particules par mL. À l'aide de cette dernière information et du nombre de cellules collectées, le ratio du nombre d'EVs sécrété par cellule est calculé pour chaque condition.

IV.2.2.2. Western blot

Après ultracentrifugations, les EVs sont resuspendues et lysées dans 100 μL de tampon RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na-deoxycholate, 0,1% SDS, 50 mM NaF, 2 mM d'EDTA ; pH 7,4) supplémenté extemporanément en inhibiteurs de protéases (Roche). Les échantillons subissent ensuite une étape de sonication durant 30 s puis les protéines sont concentrées à l'aide de colonnes Amicon (Pall) par centrifugation à 14 000g durant 8 min. Les échantillons sont ensuite séparés sur gel 12% de polyacrylamide SDS-

PAGE puis transférés sur membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) par transfert semi-sec (BioRad) durant 1h à 20V. Après saturation de la membrane en TBS-Tween 0,1% (v/v)-BSA 5%, celle-ci est incubée sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires récapitulés en Tableau 9. Le lendemain, suite à plusieurs lavages en TBS-Tween 0,1% ; les membranes sont incubées 1h en présence des anticorps secondaires correspondants, couplés à la HRP (Horseradish Peroxidase) et dilués au 1/1000^{ème} en TBS-Tween 0,1% - BSA 5%. La révélation des protéines a lieu à l'aide d'ECL Ultra (Enhanced Luminol-based Chemiluminescent Ultra, Merck Millipore), le substrat chimioluminescent de la HRP. La détection de cette réaction lumineuse est réalisée à l'aide d'une G-Box et du système d'imagerie GeneSnap (Syngene).

Protéines	Espèces	Clones	Dilution	Références	Fournisseurs
Alix	Souris	3A9	1/500	2171S	Cell Signaling
Hsc70	Souris	B-6	1/500	sc-7298	Santa Cruz
CD9	Lapin	D3HP4	1/500	13403S	Cell Signaling

Tableau 9 : Références des anticorps utilisés en western blot

IV.3. Extraction des ARN totaux et RT-qPCR

L'extraction des ARN totaux des lignées cellulaires ainsi que des CPP, traitées ou non par des EVs, est réalisée à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) sur culot cellulaire sec. Ensuite, la quantification de ces ARN est réalisée à l'aide du NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) et la quantité de 2 µg d'ARN totaux est utilisée pour achever la réaction de transcription inverse grâce au kit cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus sont ajustés à une concentration de 12,5 ng/µL puis la PCR quantitative (qPCR) est exécutée sur 50 ng d'ADNc à l'aide du QuantStudio 5 (Thermo Fisher) et du SensiFAST Probe Hi-ROX kit (Bioline). Les références des sondes Taqman utilisées sont détaillées dans le Tableau 10 et les expressions relatives des transcrits sont estimées par la méthode du $\Delta\Delta C_t$ avec deux gènes de ménage en tant que contrôles endogènes (*HPRT1*, *GAPDH*).

Gènes	Références
<i>PROM1 (CD133)</i>	Hs01009259_m1
<i>NANOG (NANOG)</i>	Hs02384400_g1
<i>SOX2 (SOX2)</i>	Hs01053049_s1
<i>POU5F1 (OCT4)</i>	Hs01570480_s1
<i>BMI1 (BMI1)</i>	Hs00995522_g1
<i>LGR5 (LGR5)</i>	Hs00969422_m1
<i>GAPDH (GAPDH)</i>	Hs02786624_g1
<i>HPRT1 (HPRT)</i>	Hs02800695_m1
<i>PDCD1 (PD1)</i>	Hs01550088_m1
<i>CD274 (PDL1)</i>	Hs00204257_m1
<i>PDCD1LG2 (PDL2)</i>	Hs00228839_m1

Tableau 10 : Références des sondes Taqman utilisées
(Le fournisseur des sondes étant Thermo Fisher)

IV.4. Cytométrie en flux

Les références d'anticorps utilisés pour réaliser cette technique sont résumées en Tableau 11, à la fin de ce sous-chapitre.

IV.4.1. Lignées cellulaires et CPP

IV.4.1.1. Expression des marqueurs souche

Après culture des lignées cellulaires en NM ou DM, 1.10^6 cellules viables sont lavées en PBS puis reprises dans 80 μ L d'une solution de PBS / BSA 3%. Les anticorps membranaires anti-CD133 et anti-Lgr5, ainsi qu'un marqueur de viabilité (Viobility™, MACS Miltenyi Biotec) sont ajoutés et le tout est incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante (RT). Après un lavage au PBS, les cellules sont fixées dans 4% de paraformaldéhyde (PFA) à l'obscurité durant 10 min à RT puis lavées au PBS. Ensuite, dans le but de marquer les protéines intracellulaires, les cellules sont perméabilisées avec un tampon de perméabilisation Perm buffer III (BD Biosciences) durant 30 min à 4°C. Après lavage, les cellules sont resuspendues dans 80 μ L de PBS / BSA 3% et les anticorps intracellulaires anti-Bmi1, anti-Oct4 et anti-Nanog sont ajoutés pour une incubation de 30 min à RT et à l'obscurité. Enfin, un dernier lavage est réalisé puis les cellules sont resuspendues dans 200 μ L de PBS puis passées dans un cytomètre en flux de type CytoFLEX (Beckman Coulter). Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Kaluza (Beckman Coulter, version 2.1).

IV.4.1.2. Expression des checkpoints immuns

Après culture des lignées cellulaires en NM ou DM, 1.10^6 cellules viables sont lavées en PBS puis reprises dans 80 μ L d'une solution de PBS / BSA 3%. Les anticorps

membranaires anti-PD-1, anti-PD-L1 et anti-PD-L2, ainsi qu'un marqueur de viabilité (Viability™, MACS Miltenyi Biotec) sont ajoutés et le tout est incubé 30 min à l'obscurité et à RT. Après un lavage au PBS, les cellules sont fixées dans 4% de PFA à RT et à l'obscurité durant 10 min puis lavées et enfin resuspendues dans 200 μ L de PBS. Les échantillons sont analysés à l'aide du CytoFLEX (Beckman Coulter) et les résultats par le logiciel Kaluza (Beckman Coulter, version 2.1).

IV.4.1.3. Analyse du cycle cellulaire

Une fois les cellules cultivées dans les conditions adéquates dépendantes de l'expérience réalisée, elles sont lavées en PBS froid puis resuspendues dans 1 mL d'éthanol froid (70%) avant d'être placées à -20°C pour la nuit. Le lendemain, elles sont lavées deux fois puis resuspendues dans 200 μ L de PBS et incubées durant 20 min avec 50 μ g/mL d'iodure de propidium (IP) ainsi que 20 μ g/mL de RNase A. La mesure est effectuée à l'aide du CytoFLEX (Beckman Coulter) et l'analyse réalisée sur le logiciel ModFit LT (Verity Software House, version 5.0.9).

IV.4.2. Cellules immunitaires

IV.4.2.1. Analyse des proportions cellulaires

Après traitement des LT avec les EVs des SW480, 1.10^6 cellules viables sont lavées en PBS puis reprises dans 80 μ L d'une solution de PBS / BSA 3%. Les anticorps correspondant au type cellulaire (LT, LTc, LTh ou LTreg), récapitulés en Tableau 11, sont ajoutés à la suspension et incubés 30 min à RT et à l'obscurité. Après lavage des cellules au PBS, elles sont fixées dans 4% de PFA à RT et à l'obscurité durant 10 min. Concernant les LTreg, la protéine Foxp3 étant intracellulaire, les cellules sont perméabilisées dans le Perm buffer III (BD Biosciences) durant 30 min à 4°C puis lavées en PBS. Le marquage intracellulaire est réalisé grâce à l'anticorps anti-Foxp3, incubé 30 min à RT dans l'obscurité. Enfin, un dernier lavage est effectué puis les cellules sont resuspendues dans 200 μ L de PBS, analysées au CytoFLEX (Beckman Coulter) et les résultats sont traités par le logiciel Kaluza (Beckman Coulter, version 2.1).

Concernant les NK traitées avec les EVs des SW480, 1.10^6 cellules viables sont lavées en PBS puis reprises dans 80 μ L d'une solution de PBS / BSA 3%. Les anticorps anti-CD16 et anti-CD56 sont ajoutés à la suspension et incubés 30 min à RT et à l'obscurité. Après lavage des cellules au PBS, elles sont fixées dans 4% de PFA à RT et à l'obscurité durant 10 min puis lavées de nouveau et reprises dans 200 μ L de PBS avant d'être passées au

CytoFLEX (Beckman Coulter). Les résultats sont retraités par le logiciel Kaluza (Beckman Coulter version 2.1).

IV.4.2.2. Expression des checkpoints immuns

Après traitement des cellules avec les EVs des SW480, 1.10^6 cellules viables sont lavées en PBS puis reprises dans $80 \mu\text{L}$ d'une solution de PBS / BSA 3%. Les anticorps correspondant au type cellulaire (LT ou NK) ainsi que les anti-PD-1, anti-PD-L1 et anti-PD-L2 sont ajoutés à la suspension et incubés 30 min à RT et à l'obscurité. Après lavage des cellules au PBS, elles sont fixées dans 4% de PFA à RT et à l'obscurité durant 10 min. Enfin, un dernier lavage est effectué puis les cellules sont resuspendues dans $200 \mu\text{L}$ de PBS, analysées au CytoFLEX (Beckman Coulter) et les résultats traités par le logiciel Kaluza (Beckman Coulter, version 2.1).

IV.4.2.3. Analyse du niveau d'activation des cellules

Après traitement des cellules (LT ou NK) avec les EVs des SW480, 1.10^6 cellules viables sont lavées en PBS puis reprises dans $80 \mu\text{L}$ d'une solution de PBS / BSA 3%. Les anticorps correspondant au type cellulaire (voir IV.4.2.1) sont ajoutés à la suspension ainsi que l'anticorps anti-CD69 étant un marqueur d'activation. Suite à une incubation de 30 min à RT et à l'obscurité, les cellules sont lavées en PBS puis fixées dans 4% de PFA à RT et à l'obscurité durant 10 min. Enfin, un dernier lavage est effectué puis les cellules sont resuspendues dans $200 \mu\text{L}$ de PBS, analysées au CytoFLEX (Beckman Coulter) et les résultats sont traités par le logiciel Kaluza (Beckman Coulter, version 2.1).

Protéines	Fluorochromes couplés	Clones	Références	Fournisseurs
CD133	Brilliant Violet™ 421	7	BLE372807	Ozyme
Lgr5	PE-Vio 770	DA03-22H2.8	130-100-847	Miltenyi Biotec
Bmi1	PE	F-9	sc-390443	Santa Cruz
Oct4	Alexa Fluor® 488	3A2A20	BLE653705	Ozyme
Nanog	Alexa Fluor® 594	23D2-3C6	BLE674004	Ozyme
PD-1	FITC	NAT105	BLE367411	Ozyme
PD-L1	APC	29E.2A3	BLE329707	Ozyme
	Brilliant Violet™ 510	29E.2A3	BLE329733	Ozyme
PD-L2	PE	MIH18	BLE345505	Ozyme
	Brilliant Violet™ 421	MIH18	BDB563842	Ozyme
CD3	Violet Fluor™ 450	SK7	TNB75-0036-T100	Ozyme
CD4	PE	RPA-T4	12-0049-42	Ozyme
CD8	APC	SK1	BLE344721	Ozyme
Foxp3	FITC	236A/E7	11-4777-41	Ozyme
CD25	APC	M-A251	BLE356109	Ozyme
CD16	APC	3G8	BLE302011	Ozyme
CD56	PE	5.1H11	BLE362507	Ozyme
CD69	Alexa Fluor® 488	FN50	BLE310916	Ozyme

Tableau 11 : Références de l'ensemble des anticorps utilisés en cytométrie en flux

En tant que contrôles de référence, des anticorps isotypiques de chaque fluorochrome ont été utilisés et pour chacune des expériences de CMF, à la même concentration que les anticorps tests afin d'assurer la reconnaissance spécifique des protéines d'intérêt. Ces contrôles isotypiques nous ont également permis de régler les gains des lasers et donc les différentes fenêtres (gates) d'acquisition.

IV.5. Mesure de la prolifération cellulaire

Les lignées SW480 et SW620, cultivées en NM ou en DM, sontensemencées au nombre de 5000 cellules par puits dans une plaque 96 puits afin de mesurer leur taux de prolifération à l'aide du kit BrdU Cell Proliferation Kit (Cell Signaling). Dans un délai d'une heure post-ensemencement, le BrdU est ajouté sur les cellules pour une durée de 2h puis la révélation est réalisée conformément aux instructions du fabricant.

En ce qui concerne la lignée SW480 traitée avec des EVs de la lignée SW620, les cellules sontensemencées et également laissées à adhérer sur la nuit. Le lendemain, le milieu

de culture est retiré, un lavage est réalisé en PBS puis sont ajoutés le BrdU et les EVs pour une incubation allant de 24 à 72h. La révélation de l'incorporation du BrdU est réalisée conformément aux instructions du fabricant.

IV.6. Mesure de l'activité métabolique

IV.6.1. Des lignées cellulaires

Une quantité de 5000 cellules, cultivées en milieu normal ou défini, sont ensemencées dans les puits d'une plaque 96 puits et laissées sur la nuit afin que les cellules cultivées en NM puissent adhérer. Le lendemain, les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes de 5-FU durant 48h. L'activité métabolique est ensuite mesurée à l'aide du CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) conformément aux instructions du fournisseur. La valeur d'IC50, concentration de 5-FU inhibant l'activité métabolique de la moitié des cellules, est déterminée graphiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.04.

IV.6.2. De la lignée SW480 traitée par des EVs

Une quantité de 5000 cellules de la lignée SW480 est ensemencée dans les puits d'une plaque 96 puits et laissée à adhérer sur la nuit. Le lendemain, les cellules sont lavées en PBS puis traitées avec des EVs provenant de la lignée SW620 durant 24h. Suite à ce traitement, les cellules sont mises en contact avec des doses croissantes de 5-FU durant 48h puis l'activité métabolique est mesurée à l'aide du kit présenté en IV.6.1.

IV.6.3. Des CPP traitées par des EVs

Un nombre de 5000 cellules CPP14 ou CPP6 est ensemencé dans des puits d'une plaque 96 puits et laissé à adhérer sur la nuit. Le lendemain, les cellules sont lavées en PBS puis traitées deux fois avec des EVs provenant des CPP6 ; chaque traitement étant d'une durée de 24h. Suite à ces deux rounds de traitement, les cellules sont mises en contact avec des doses croissantes de 5-FU durant 48h puis l'activité métabolique est mesurée selon les recommandations du fournisseur (voir IV.6.1).

IV.7. Tests de migration et d'invasion

IV.7.1. Test de migration

Un nombre de 50 000 cellules SW480 est ensemencé dans les puits d'une plaque 96 puits IncuCyte® Imagemock (Sartorius) et laissé à adhérer sur la nuit. Le lendemain, les

blessures sont créées à l'aide du WoundMaker™ (Sartorius) puis deux lavages sont réalisés avec du milieu de culture afin de retirer les cellules décollées lors de la création des blessures. Les cellules sont ensuite recouvertes de 100 μL de milieu de culture contenant ou non des EVs de SW620 puis la plaque est placée dans le système IncuCyte®. Cette dernière est scannée toutes les 2h durant 48h afin d'observer la fermeture de la blessure puis l'analyse est réalisée à l'aide du logiciel IncuCyte 2021A (Sartorius).

IV.7.2. Test d'invasion

Comme pour le test de migration, 50 000 cellules de la lignée SW480 sont ensemencées et laissées à adhérer sur la nuit. Le lendemain, les blessures sont créées de la même façon à l'aide du WoundMaker™ puis les cellules lavées avec du milieu de culture. Ensuite, les cellules sont recouvertes de 50 μL / puits d'une solution de Matrigel® (Corning) à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puis la plaque est placée à 37°C durant 30 min afin de laisser polymériser le Matrigel®. Enfin, 100 μL de milieu de culture contenant ou non des EVs de SW620 est ajouté dans chaque puits et la plaque placée dans le système IncuCyte®. Cette dernière est scannée toutes les 2h durant 48h et l'analyse réalisée dans les mêmes conditions que concernant le test de migration, à l'aide du logiciel IncuCyte 2021A (Sartorius).

IV.8. Mesure de la capacité d'auto-renouvellement

Un nombre de 500 cellules, provenant des lignées SW480 et SW620 cultivées en milieux normal ou défini, est ensemencé dans une plaque 96 puits classique dans 200 μL de milieu défini. La plaque est ensuite placée dans le système IncuCyte® (Sartorius) et scannée toutes les 24h durant 7 jours afin d'observer la formation de sphères. L'analyse du nombre de sphères formé ainsi que de leur taille est réalisée à l'aide du logiciel IncuCyte 2021A (Sartorius).

IV.9. Mesure de la signature électromagnétique (DEP-UHF)

Une fois les cellules cultivées dans les conditions adéquates en fonction de l'expérience réalisée, elles sont culottées puis une numération ainsi qu'un test de viabilité par exclusion au bleu trypan (Gibco) sont réalisés. Après un lavage en PBS, les cellules sont reprises dans 500 μL de milieu DEP à une concentration de 1.10^6 cellules / mL. Le milieu DEP étant un milieu osmotique adapté à l'électromanipulation et composé d'eau déionisée supplémentée en sucrose. La mesure de la signature électromagnétique par technique de DEP est réalisée à l'aide d'un laboratoire sur puce implémenté dans un canal microfluidique et composé d'une microélectrode quadripolaire générant un champ électrique non uniforme

(Figure 19). Brièvement, la suspension cellulaire est injectée dans le canal microfluidique puis une fois les cellules arrivées au niveau de la microélectrode, le flux est stoppé afin de permettre leur caractérisation individuelle. Un champ électrique à UHF est produit à l'aide d'un générateur de signaux radiofréquence et reçu par la cellule individuelle stoppée au niveau du quadripôle. Cette dernière se retrouve alors repoussée par ce champ et donc bloquée au centre de la microélectrode quadripolaire. Dans le but de déterminer la signature électromagnétique de cette cellule, la valeur du champ lui étant appliquée est modifiée manuellement de façon décroissante dans le but de scanner l'ensemble de son contenu intracellulaire. Une fois la signature électromagnétique spécifique de cette cellule atteinte, cette dernière se retrouve attirée par le champ et vient alors se coller à une des électrodes. La fréquence obtenue pour attirer la cellule constitue sa fréquence de transition puis cette mesure individuelle est réalisée sur un nombre conséquent de cellules et reflète la signature électromagnétique du type cellulaire étudié. Les éléments techniques concernant les caractéristiques du laboratoire sur puce ainsi que le principe même de la DEP sont présentés dans l'article Lambert *et al.*, 2021 exposé en Annexe 1.

IV.10. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées sur au moins 3 réplicats biologiques en one-way ANOVA à l'aide du logiciel PAST (version 2.17c). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type de type SEM (Standard Error of Mean), excepté pour les mesures de signatures électromagnétiques exprimées en moyenne \pm écart type de type SD (Standard Deviation). Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs avec : * : *p-value* < 0,05 ; ** : *p-value* < 0,01 ; *** : *p-value* < 0,001.

Chapitre V. Résultats

Utilisation d'un biocapteur basé sur la technique de DEP à UHF pour la détection du potentiel de transformation des vésicules extracellulaires dérivées de cellules tumorales

Mes travaux de thèse ont porté sur l'influence des EVs sécrétées par des cellules de CCR sur la progression tumorale. La technique de DEP à UHF a été utilisée dans le but de détecter cette influence. Dans un premier temps, cette technique, utilisée précédemment dans un modèle de glioblastome (Manczak *et al.* 2019; Lambert *et al.* 2021), a été transposée au modèle de CCR afin de mesurer les signatures électromagnétiques des cellules en fonction des conditions de culture. Deux lignées cellulaires de CCR ainsi que deux CPP ont été utilisées et cultivées soit en milieu normal pour favoriser la croissance de cellules différenciées, soit en milieu défini pour enrichir en CSCs. Après analyses phénotypiques et fonctionnelles des cellules en fonction des conditions de culture, elles ont été caractérisées à l'aide du biocapteur. Les résultats obtenus étant similaires à ceux observés dans le modèle de glioblastome avec une signature électromagnétique systématiquement plus faible des CSCs dans les lignées cellulaires et les CPP. Ensuite, nous avons étudié le transfert des EVs entre les cellules tumorales colorectales. Une fois isolées et caractérisées, les EVs sont utilisées pour traiter des cellules toujours cultivées en milieu normal durant ces expériences, tandis que les cellules émettrices des EVs ont été cultivées en milieux normal ou défini. Ceci, dans le but de comparer leurs effets en fonction de leur cellule d'origine. Les premières expérimentations ont été réalisées avec les lignées cellulaires SW480 et SW620 provenant du même patient. La lignée SW480, correspondant à un stade II, a été traitée par des EVs provenant de la lignée SW620, correspondant à un stade III, dans l'objectif d'expérimenter un transfert d'agressivité. La caractérisation biologique des cellules traitées par les EVs a démontré de nombreuses modifications, différentes en fonction de l'origine des EVs. En effet, les EVs provenant de cellules différenciées ont favorisé la prolifération des cellules cibles mais aussi une résistance thérapeutique au 5-FU. Les capacités d'invasion des cellules traitées ont également été favorisées par ces EVs mais seulement après 48h de contact. Le traitement des cellules par des EVs provenant de CSCs a favorisé l'acquisition de propriétés de résistance au 5-FU, a mené à une régulation positive de nombreux transcrits de marqueurs souche ainsi qu'à une capacité d'invasion facilitée après 6h de traitement. La mesure des signatures électromagnétiques des cellules traitées a quant à elle mise en évidence des résultats très différents en fonction de l'origine des EVs. Les cellules traitées avec des EVs provenant de

CSCs ont présenté une signature électromagnétique plus faible que les cellules non traitées et cette évolution a été dépendante du nombre de traitements effectué. À l'inverse, aucune différence n'a été observée concernant la signature électromagnétique des cellules traitées avec des EVs provenant de cellules différenciées. Toutefois, une évolution de la répartition de ces signatures a malgré tout été relevée.

Ensuite, la même expérience a été réalisée avec des CPP provenant de cultures primaires de tumeurs colorectales. Dans un premier temps, la CPP14, stade II, a été traitée avec des EVs provenant de la CPP6 étant un stade IV. Les cellules CPP14 traitées avec des EVs provenant de CPP6 cultivées en milieu défini (CSCs) ont présenté une surexpression de marqueurs souche ainsi qu'une tendance (non significative) à la résistance au 5-FU. Concernant les cellules CPP14 traitées par des EVs de cellules CPP6 différenciées, aucune des expérimentations biologiques testées n'ont mises en évidence un quelconque effet des EVs. À l'inverse, la signature électromagnétique des cellules CPP14 traitées par des EVs de CPP6, quel que soit le phénotype des cellules émettrices, a augmenté par rapport aux cellules non traitées. Dans un second temps, la CPP6 a été traitée avec des EVs provenant du même type cellulaire mais cultivé en milieu défini (CSCs). Cette fois, aucune expérience biologique réalisée n'a permis de mettre en évidence un effet des vésicules sur les cellules traitées tandis que leur signature électromagnétique a diminué en comparaison aux CPP6 non traitées.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'intérêt de l'utilisation du biocapteur permettant une caractérisation du phénotype cellulaire plus rapide et moins coûteuse que les techniques biologiques classiques. En effet, l'expérience ne dure que quelques heures et ne nécessite aucun marquage cellulaire préalable. Son utilisation en clinique pourrait donc permettre de détecter précocement des CSCs et ainsi d'adapter la prise en charge thérapeutique.

Concernant l'influence du transfert des EVs entre cellules tumorales, le biocapteur permet de mettre en évidence des changements d'état des cellules traitées, se traduisant par une évolution de leur signature électromagnétique. Ce changement d'état a parfois même été mis en évidence par le biocapteur lorsque les techniques biologiques utilisées ne témoignaient d'aucun effet. Ceci souligne de la sensibilité et de l'intérêt de ce type de dispositif car les techniques biologiques sont très variées et parfois celles testées ne mettent pas en évidence des changements pourtant bien réels, démontrés par le biocapteur.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée « UHF-Dielectrophoresis Microfluidic Lab-on-a-Chip to detect the transformation potential of extracellular vesicles derived from Cancer Stem Cells » déposée sur la plateforme *Preprints* de MDPI, en cours de soumission au journal *Cells*.

Article Barthout *et al.*, 2022

Article

UHF-Dielectrophoresis Microfluidic Lab-on-a-Chip to detect the transformation potential of extracellular vesicles derived from Cancer Stem Cells

Élodie Barthout ^{1,†}, Élisabeth Lambert ^{2,†}, Céline Hervieu ¹, Sofiane Saada ¹, Rémi Manczak ², Julie Pannequin ³, Arnaud Pothier ², Claire Dalmay ², Fabrice Lalloué ^{1,†}, Muriel Mathonnet ^{1,4,*,†} and Barbara Bessette ^{1,†,*}

¹ UMR INSERM 1308 CAPTuR, University of Limoges, 87025 Limoges, France; elodie.barthout@unilim.fr (E.B.); celine.hervieu@unilim.fr (C.H.); sofiane.saada@hotmail.fr (S.S.); fabrice.lalloue@unilim.fr (F.L.); muriel.mathonnet@unilim.fr (M.M.); barbara.bessette@unilim.fr (B.B.)

² UMR 7252 XLIM, University of Limoges / CNRS, 87060 Limoges, France; elisa.lambert@xlim.fr (E.L.); remi.manczak@xlim.fr (R.M.); arnaud.pothier@xlim.fr (A.P.); claire.dalmay@xlim.fr (C.D.)

³ UMR 5203 INSERM / CNRS Institute of Functional Genomics, University of Montpellier, 34094 Montpellier, France; julie.pannequin@igf.cnrs.fr (J.P.)

⁴ Department of General, Endocrine and Digestive Surgery, University Hospital of Limoges, 87025 Limoges, France

* Correspondence: barbara.bessette@unilim.fr; muriel.mathonnet@unilim.fr

† These authors contributed equally to this work

Abstract: Cancer stem cells remain a challenge to isolate and characterize because of their plastic phenotype. Using a microfluidic lab-on-a-chip based on ultra-high frequency dielectrophoresis, we measured the electromagnetic signature of colorectal cancer cells and demonstrated that cancer stem cells show a distinct and lower electromagnetic signature than differentiated cells. The release of extracellular vesicles from tumor cells can drive tumor progression and metastasis development. As extracellular vesicles from cancer stem cells carry more aggressive content, we treated colorectal cancer cells with these vesicles to test whether the lab-on-a-chip can detect a change in phenotype. The electromagnetic signature of treated cells is modified in comparison to untreated cells and sometimes even when no biological change is observed. The lab-on-a-chip provides rapid and relevant result without prior labeling compared to conventional biological approaches. It could be useful in the clinic for early detection of cancer stem cells in the tumor mass and for monitoring the aggressive potential of extracellular vesicles in the bloodstream in order to adapt therapeutic management and prevent relapse.

Keywords: colorectal cancer; cancer stem cells; extracellular vesicles; high frequency dielectrophoresis; microfluidic lab-on-a-chip

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second most diagnosed cancer in women and third most in men yet mortality in women is 25% lower than in men. Industrialized countries have the highest rates of CRC but they appear to be stabilizing or even decreasing due to screening campaigns and increased use of colonoscopy. Despite this, CRC is the fourth most deadly cancer in the world with nearly 900 000 deaths per year [1]. Furthermore, almost 25% of newly diagnosed CRC show distant metastasis [2] 50% of patients will develop metastasis during their lifetime [3,4]. Over the last decades, the diagnosis and care of CRC patients have improved considerably but relapses still occur and may be related to therapeutic resistance and/or the presence of a minimal residual disease (MRD).

A particular subpopulation within the heterogeneous tumor mass, known as cancer stem cells (CSCs) or tumor-initiating cells, is incriminated for both phenomena [5,6]. These are highly plastic undifferentiated cells, resistant to conventional therapies due to their

stemness and self-renewal capabilities. In CRC, it has been reported a direct correlation between the number of undifferentiated cells and high risks of relapse [4,7].

Inside the stem cell niche, CSCs communicate with their microenvironment and this crosstalk relies on the secretion of extracellular vesicles (EVs). These are nanosized membrane vesicles ranging in size from 50 to 150 nm released by exocytosis of multivesicular bodies (MVB) from both tumor and healthy cells. They are found in all body fluids but usually, tumor cells release more EVs than their healthy counterparts [15,16].

The function of EVs in tumor development [2-8], drug resistance [2,8] and the transfer of aggressiveness [2,9-14] in solid cancers is widely documented. EVs act as a way of communication between cells by the exchange of genetic material [15]. We previously demonstrated that EVs can induce an aggressive phenotype by transferring neurotrophin receptors (TrkB) to YKL-40-inactivated glioblastoma cells that have lost their aggressive potential [9]. Similarly, in glioblastoma (GBM), EVs can transfer the EGFRvIII, the truncated EGFR receptor associated with tumor progression [17]. In CRC, many studies have highlighted the role of EVs on the transfer of aggressiveness. EVs derived from CRC cell lines can deliver mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs to other solid cancer cell lines to control their gene expression [10] or to promote the cell migration of a hepatocellular cancer cell line [11]. Colon cancer-derived EVs may stimulate the tumor angiogenesis by activating endothelial cells [13], promote acquired resistance to 5-FluoroUracil (5-FU) [18] and facilitate the development and metastasis of CRC [14]. EVs can also affect the antitumor immune response. Indeed, they facilitate immune escape by inhibiting macrophage activation [19], by blocking T cell proliferation and promoting regulator T cell expansion [20]. In summary, EVs are considered an important source of circulating tumor biomarkers. Therefore, they could represent an efficient strategy to remotely monitor exchanges between CSCs and their microenvironment and thus predict drug resistance, tumor progression or the risk of relapse.

Isolation and characterization of CSCs are difficult because they represent less than 10% of the tumor mass [24] and the biological markers commonly used are shared with normal stem cells. Moreover, the level of expression of biological markers is not sufficient to characterize these cells and functional properties need to be explored. All these techniques are time consuming and quite expensive. Thus, the last few years, we developed a new label-free approach based on the detection of biophysical cell properties. It consists in measuring the electromagnetic (EM) signature of individual cells by dielectrophoresis (DEP) technique in the ultra-high frequency (UHF) range. A lab-on-a-chip implemented in a microfluidic channel allows the manipulation of individual cells to determine their EM signature called "crossover frequency". This precise frequency is related to the intracellular content of the characterized cell. CSCs and differentiated cells from brain tumors have already been characterized with this device [21,22] making it an interesting tool for CSCs diagnosis in clinical routine.

In this work, we used this lab-on-a-chip on colorectal cancer-derived cells to investigate whether CSCs exhibit a different EM signature than differentiated cells, as previously observed in brain tumors [21,22]. In addition, EVs derived from CSCs carry more aggressive content than differentiated cells. We therefore performed aggressiveness transfer to demonstrate that the lab-on-a-chip can monitor phenotypic transformation. Here, we reported that CSCs show a lower EM signature than their differentiated counterparts, in both cell lines and primary CRC cultures. Moreover, this lab-on-a-chip can detect cellular changes caused by EVs intake that may eventually be missed in biology. This label-free technique allows biophysical characterization of cells and could be useful for early detection of CSCs in the tumor mass to improve the management of CRC patients.

2. Materials and Methods

2.1 Cell culture

2.1.1 Cell lines and primary cultures of patient

SW480 and SW620 cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC/LGC Promochem, Molsheim, France) and were grown in RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco™, Thermo Fisher, MA, USA) medium supplemented with 10% FBS, 1% sodium pyruvate and 1% of penicillin / streptomycin (Thermo Fisher).

Two primary cultures from patients (CPP) were gently provided by Julie Pannequin from the Institute of Functional Genomics (Univ. Montpellier, France) after informed consent of patients (Material Transfer Agreement CNRS 190287). CPP were grown in DMEM GlutaMAX™ medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin / streptomycin (Thermo Fisher).

Culture under FBS will be referenced as “Normal Medium” (NM).

2.1.2 Cancer stem cells (CSCs) enrichment

To enrich the cell population in CSCs, cell lines or CPP were cultured for at least one week in a “Define Medium” (DM): DMEM/F-12 (Thermo Fisher) medium without FBS but supplemented with 5 µg/mL of insulin, N-2 supplement (1X), 1% of penicillin / streptomycin (Thermo Fisher), 20 ng/mL of EGF and 20 ng/mL of bFGF (MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

All cell types were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

2.1.3 Cell treatment with extracellular vesicles (EVs)

To undergo EVs transfer aggressiveness, cells were seeded in a 6-wells plate at 0,25.10⁶ cells and treated with EVs from 1.10⁶ cells (NM or DM cultured cells) resuspended in a “exo-free” culture medium. Exo-free culture medium is a conventional culture medium with EVs-deprived FBS by ultracentrifugation at 120 000g for 16h. Cells were treated for 24h or 72h, once or twice with the same amount of EVs each time.

2.2 Extracellular vesicles

2.2.1 Isolation

Cells were seeded in a T75 flask at 1.10⁶ cells for 10 mL of medium and cultured for 48h before collection of culture supernatant. To collect EVs, the culture supernatant was ultracentrifugated at 120 000g for 90 min twice to pellet and wash vesicles. Then, EVs were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS, Thermo Fisher) for nanoparticle tracking analysis (NTA) or in culture medium for cell treatment or in RIPA buffer for western blot analysis.

2.2.2 Nanoparticle tracking analysis (NTA)

NTA was performed using NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Ltd.) with specific parameters according to the manufacturer’s user manual (NanoSight NS300 User Manual, MAN0541-01-EN-00, 2017). Captures and analysis were achieved by using the built-in NanoSight Software NTA3.3.301 (Malvern Panalytical Ltd.). The camera level was set at 14 and the detection threshold was fixed at 5. Samples were diluted in PBS (Thermo Fisher) and their concentration was adjusted by observing a particles/frame rate of around 50 (30–100 particles/frame). For each measurement, five consecutive 60-s videos were recorded under the following conditions: cell temperature—25 °C, syringe speed—22 µL/s (100 a.u.). Particles (EVs) were detected using a 488 nm laser (blue), and a scientific CMOS camera. Among the information given by the software, the following were studied: mode (i.e., the most represented EVs size population), the percentage of EVs between 50-150 nm

and particles/mL. Using the last one and the number of cells collected, we calculated an EVs/cell ratio for each condition.

2.3 RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and quantified by NanoDrop 2000 (Thermo Fischer). For RT-qPCR analyses, 2 µg of RNA was reverse-transcribed into cDNA using the cDNA Archive kit (Applied Biosystems, MA, USA). Quantitative gene expression was performed using SensiFAST Probe Hi-ROX kit (Bioline, London, UK) on QuantStudio 5 (Thermo Fischer) and stemness related genes (*PROM1*, *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1*, *BMI1*, *LGR5*) were analyzed. Results were normalized to *GADPH* and *HPRT1* expressions and analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method (control condition defined as 1).

2.4 Western blot

After collection, EVs were resuspended and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF) supplemented extemporaneously with a cocktail of protease inhibitors (Roche, Bâle, Switzerland). Samples were separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, blocked for 1 h in 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS and probed overnight at 4 °C with primary antibodies specific of EVs (Alix, Hsc70 and CD9). Membranes were then incubated with the proper secondary antibodies for 1 h and proteins revealed by Immobilon ECL Ultra (Merck Millipore, MA, USA) using a G-box imager with GeneSnap software (Syngene).

2.5 Flow cytometry

2.5.1 Stemness markers

Differentiated cells (NM) or CSCs (DM) were rinsed in PBS and 1.10^6 cells were labelled with extracellular anti-CD133, anti-Lgr5 and viability marker antibodies. Cells were incubated 30 min at RT in the dark, washed in PBS and then fixed 10 min in 4% PFA. After a wash, cells were permeabilized 30 min at 4°C in Perm buffer III (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Finally, cells were labelled with intracellular antibodies of anti-Bmi1, anti-Oct4 and anti-Nanog for 30 min at RT in the dark. Samples were analyzed with a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, CA, USA). Data analysis was performed using Kaluza software (v2.1, Beckman Coulter).

2.5.2 Cell cycle analysis

Cells were washed with ice-cold PBS, resuspended in ice-cold 70% ethanol and placed at -20°C overnight. The next day, after a wash, cells were incubated 20 min with RNase A (Sigma Aldrich, MO, USA) and Propidium Iodide (PI) before analysis on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter). Results were analyzed using ModFit LT™ software (v5.0.9, Verity Software House, ME, USA).

2.6 Proliferation Assay

Five thousand cells were seeded in a 96-well plate and proliferation was measured using BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Cell Signaling, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 450 nm with a Multiskan FC Thermo Scientific microplate photometer (Thermo Fisher).

2.7 Metabolic activity assay

Five thousand cells were seeded in a 96-well plate and treated or not by EVs from NM or DM cultured cells for 24 or 72h at the same ratio as. After 24 or 72h of treatment,

cells were treated with decreasing doses of 5-FU for 48h (500 μ M to 1 μ M). Cell toxicity was measured using CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, WI, USA) according to the manufacturer's instructions and IC₅₀ was determined graphically (GraphPad Prism 7.04).

2.8 Migration and invasion assays

Fifty thousand cells were seeded in an Incucyte[®] Imagelock 96-well Plate (Sartorius, Goettingen, Germany) and scratch migration and invasion assays were performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded and allowed to adhere overnight. The next day, wounds were created with the 96-well WoundMaker[™] (Sartorius), cells were washed twice and 100 μ L of culture medium containing or not EVs was added to the wells.

For invasion assay, after wound creation, cells were overlay with 50 μ L of Matrigel[®] (Corning, NY, USA) solution. After 30 min at 37°C for Matrigel[®] polymerization, 100 μ L of culture medium containing or not EVs was added to the wells. The plate was placed in the Incucyte[®] system (Sartorius) and wound closure was analyzed every 2h for 2 days using IncuCyte 2021A software (Sartorius).

2.9 Self-renewal capacity

Five hundred of NM or DM cultured cells were seeded in a 96-well plate in define medium for 7 days and analyzed every 24h with the Incucyte[®] system (Sartorius) and analyzed using IncuCyte 2021A software (Sartorius).

2.10 UHF-DEP Crossover frequency measurement

With UHF-DEP, we are able to electromanipulate particles, such as biological cells. In a microfluidic channel is implemented a quadrupole electrode in which a suspension of individual cells is injected. The microfluidic flow allows to stop a single cell at the center of the microelectrode for its individual DEP characterization (Figure 1H). Signals in the Ultra-High Frequency (UHF) range of 30-450 MHz are used to probe the intracellular content of the cell. The movement of the cells from a "repulsive" state (nDEP) at the center of the quadrupole to an "attractive" state (pDEP) at one edge of the electrodes is done at a specific frequency called "crossover frequency" which is the cell's electromagnetic signature. The measurement of this crossover frequency allows to discriminate cells by measuring the dielectric properties of their cytoplasmic content without any labeling. For further information, please see our precedent publication [21].

2.11 Statistical analysis

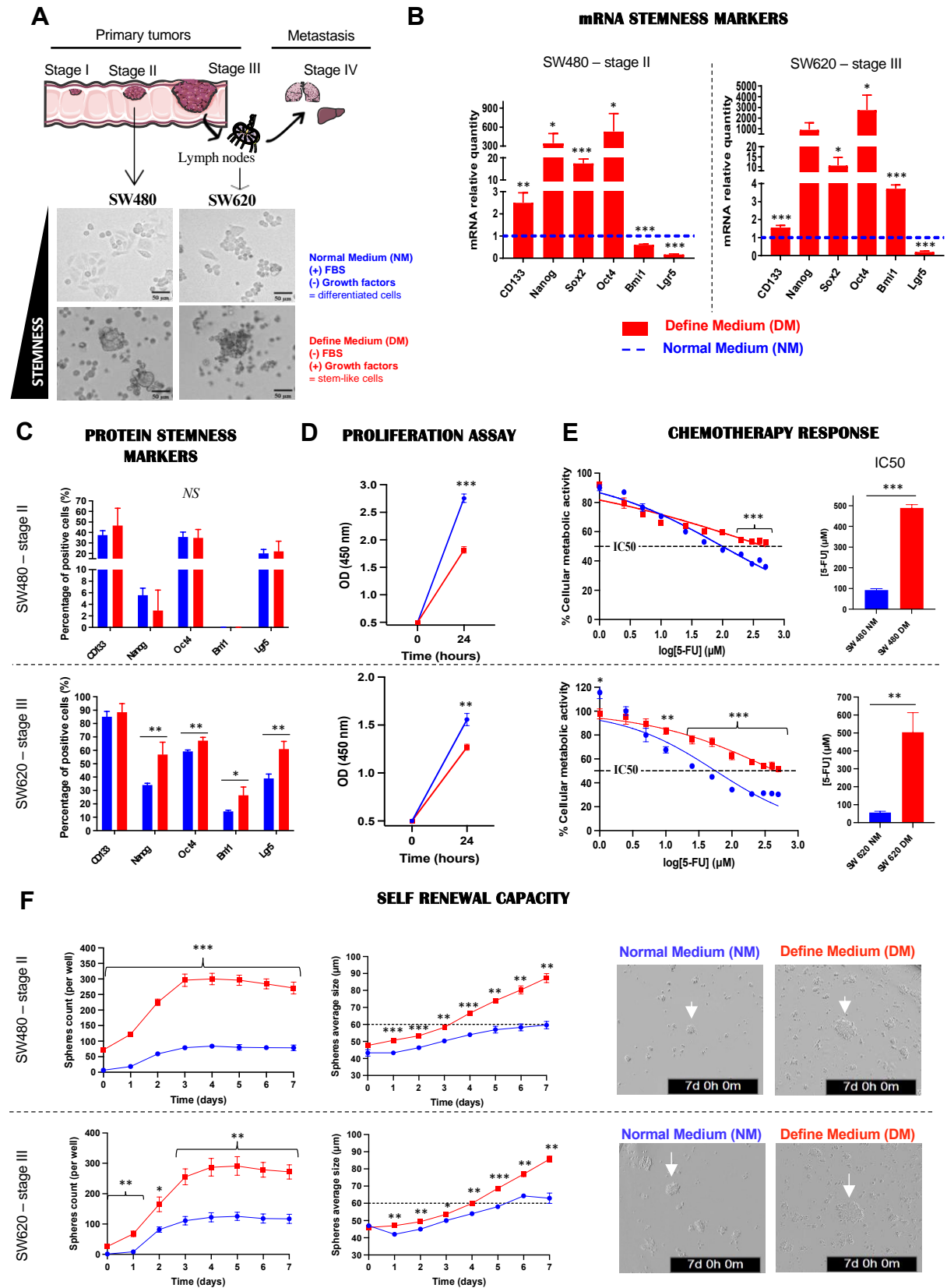
Values are represented by mean \pm SEM obtained from at least three independent experiments except values from DEP analyses, represented as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using PAST software (version 2.17c) by one-way ANOVA (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

3. Results

3.1. Cancer stem cells from colorectal cancer cell lines show a lower EM signature than their differentiated counterparts

To test the lab-on-a-chip on CRC, two cell lines from the same CRC patient: SW480 as a stage II and SW620 as a stage III (tumor-invaded lymph nodes) were chosen. Each cell line was cultured under two distinct conditions: Normal Medium (NM) to enrich cell population in differentiated cells or Define Medium (DM) to enrich in CSCs. Define medium

is a medium without FBS but supplemented with growth factors to generate stress on cells and force them to acquire stem-like cells properties. As shown in Figure 1A, cells cultured in DM are no longer adherent but grow as colonospheres, resulting in the acquisition of “stemness” properties. To confirm that these conditions induce a phenotypic shift to CSCs, we assessed their phenotypical and functional properties. Both cell lines cultured under define medium overexpress almost all stemness tested genes (*CD133*, *Sox2*, *Oct4*). Interestingly for both cell lines, stem-like cells underexpress *Lgr5* which is related to the level of cell activation, and SW620-DM overexpress *Bmi1* which is correlated to a quiescence state (Figure 1B). The same markers were investigated by flow cytometry to analyze their protein counterparts. No significant differences were observed with SW480 cell line whereas all markers were overexpressed by SW620 cells cultured in DM compared to SW620-NM, except from CD133 (Figure 1C). The SW480 cell line appears to require a longer time in define medium to overexpress these markers than the SW620 cell line, suggesting that stage III-derived cells have a more pronounced “cancer stem cells” burden. Indeed, SW620 cells always overexpress stemness related proteins compared to SW480 cells, regardless of culture conditions (Figure S1B). Since an overexpression of stemness related markers is not sufficient to consider a cell as a CSC, we explored its functional properties as well. For both cell lines, stem-like cells show a lower proliferation rate than differentiated cells (Figure 1D). Furthermore, the proportion of SW480-DM cells in the G2/M phase of the cell cycle is higher than that of SW480-NM cells, while the rate of cells in the G0/G1 phase is higher for SW620-DM cells than for SW620-NM cells (Figure 1G), consistent with the aforementioned overexpression of *Bmi1*. In a similar way, cellular response to 5-FU chemotherapy treatment (chemoresistance) was assessed by measuring metabolic activity and stem-like cells show a 5-fold higher IC50 than the differentiated ones (Figure 1E). Finally, we explored the ability of cells to self-renew by culturing them in define medium for seven days. For both cell lines, stem-like cells form more and larger colonospheres (Figure 1F). Altogether, these results allow us to consider cells cultured under define medium as cancer stem cells. In a previous work, we biophysically characterized brain tumor cells and the U87-MG glioblastoma cell line with the lab-on-a-chip and established a first EM signature related to it. Our results demonstrated that CSCs display a lower EM signature in the fx02 range whereas no difference was observed in the fx01 range [21]. On this basis, the fx02 range was selected to test CRC cells in our experiments. Similar results were observed for both CRC cell lines, as previously in the brain model, the EM signature is lower in CSCs than in differentiated cells (Figure 1I). Furthermore, we observe a complete change in electromagnetic signatures between CSCs and differentiated cells. For both cell lines, almost 100% of the differentiated cells show a cross-over frequency between 200 and 400 MHz (88% for SW480 and 100% for SW620) while both CSCs show 100% of the cells between 0 and 100 MHz (Table 1, Figure S1I).



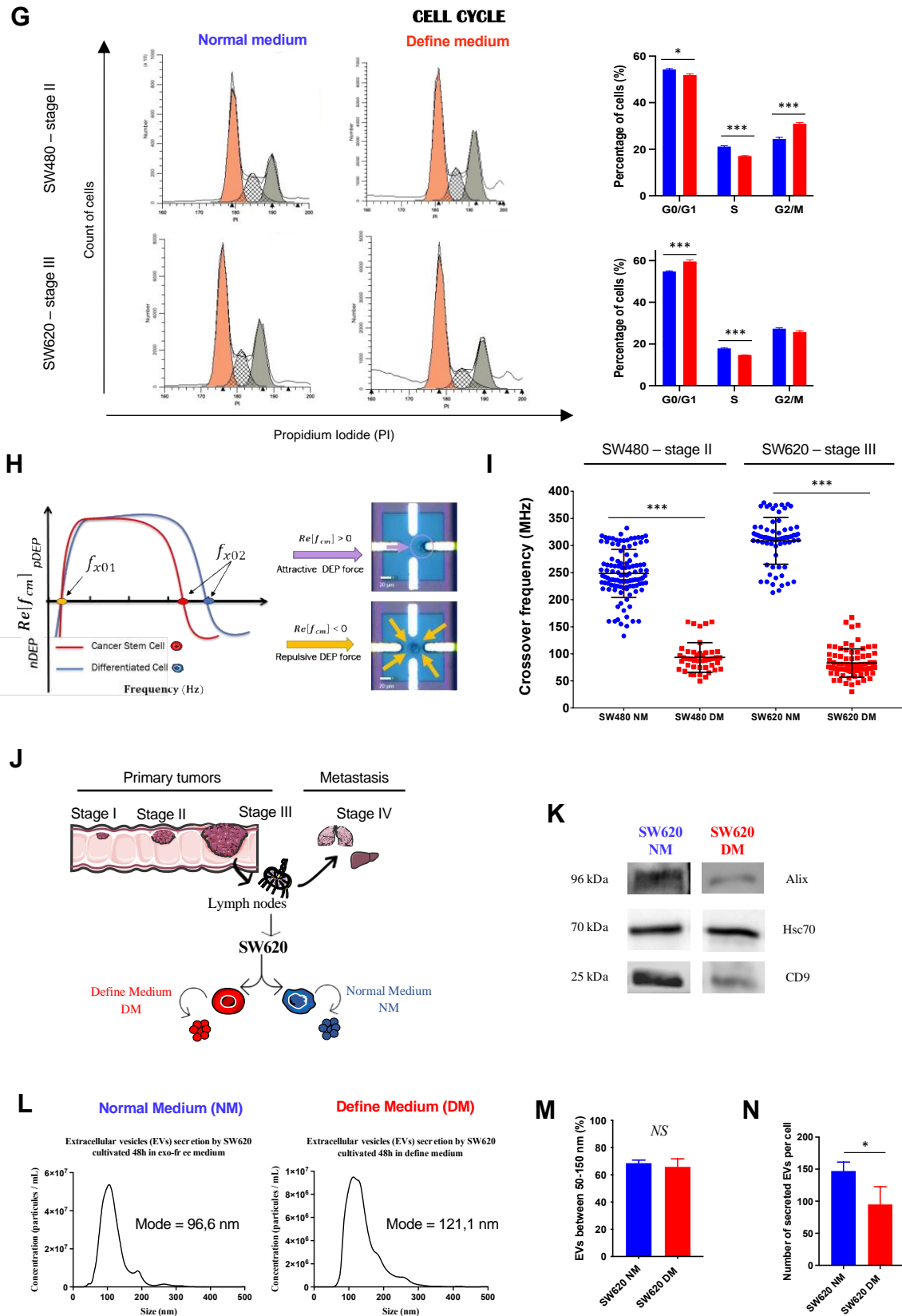


Figure 1. Characterization of cell lines and their extracellular vesicles according to culture conditions. (A) Cells were cultured under Normal Medium (NM) or Define Medium (DM) to enrich cell population in differentiated cells or CSCs. To validate culture conditions, stemness related genes (B)

and stemness markers (C) were analyzed. Functional properties were explored with proliferation (D), response to chemotherapy (E), self-renewal capacity (F) and cell cycle analysis (G). The EM signature of both cell types was measured at UHF (fx02) with a lab-on-a-chip (H-I). EVs from SW620 cells (differentiated cells or CSCs) were collected by ultracentrifugation (J) and expression of EVs markers was assessed by western blot (K). NTA was performed on EVs regarding size distribution (L), percentage of EVs between 50 and 150 nm (M) and number of secreted EVs per cell (N). All results are represented as mean \pm SEM except EM signatures represented as mean \pm SD, NS p -value indicate not significant result, * p -value < 0.05, ** p -value < 0.01, *** p -value < 0.001 using one-way ANOVA test.

Table 1. Cell proportions per frequency range for colorectal cancer cell lines

	SW480		SW620	
	Normal medium	Define medium	Normal medium	Define medium
0-100 MHz	0%	70%	0%	78%
100-200 MHz	12%	30%	0%	22%
200-300 MHz	68%	0%	24%	0%
300-400 MHz	20%	0%	76%	0%

Although these results confirm that CSCs are enriched in both CRC cell lines cultured in define medium, SW480-DM and SW620-DM are not dependent of the same step of cell cycle. Thus, SW480-DM appear to be a proliferative type of CSCs while SW620-DM appear to be a quiescent one. This EM signature is consistent with those previously obtained for glioblastoma and medulloblastoma tumors [21,22].

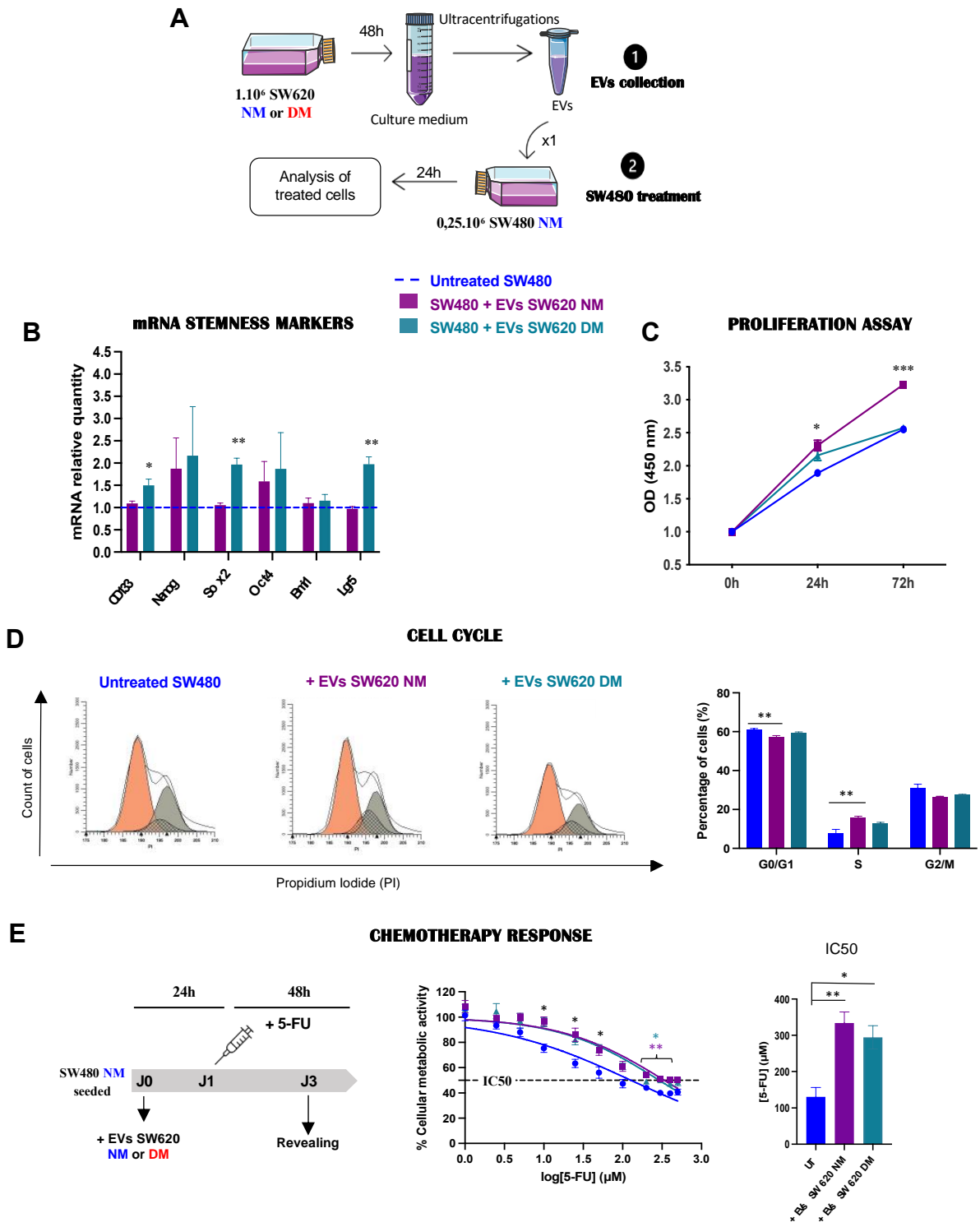
3.2. Extracellular vesicles transfer some aggressive properties and this change in state can be detected by biophysics in colorectal cancer cell lines

As EVs transfer genetic and protein materials derived from tumors, CSCs-derived EVs might transfer additional tumor aggressiveness compared to differentiated cells due to their more aggressive content. Indeed, our previous results put on evidence that EVs from undifferentiated cells related to CSCs transferred tumor aggressiveness to less aggressive tumor cells. In this context, SW480-NM (early-stage) was treated with EVs from the SW620 cell lines (late-stage) to assess a putative aggressiveness transfer. After culturing the SW620 cell line under both culture conditions, supernatant were ultracentrifugated to collect EVs (Figure 1J). NTA and western blot analyses confirmed their characteristics and CSCs secrete less EVs than differentiated cells (Figure 1K-N). The SW480 cell line, cultured in NM, was treated once for 24h with EVs derived from SW620 cell line (cultured in NM or DM) (Figure 2A). Analysis of stemness-related gene expression demonstrated that cells treated with EVs from SW620-DM overexpress *CD133*, *Sox2* and *Lgr5* whereas no difference was observed with EVs from SW620-NM (Figure 2B). Conversely, cells treated with EVs from SW620-NM show a higher proliferation rate that increases overtime, although no change was observed with EVs from SW620-DM (Figure 2C). Strikingly, this lack of change when cells are treated with EVs derived from CSCs suggests that these cells may be blocked in G0/G1 phase like SW620-DM cells, but the distribution in the cell cycle remains unchanged (Figure 2D). Regarding the response to chemotherapy, both types of EVs result to a 3-fold higher IC50 of treated cells (Figure 2E). Migration and invasion can lead to metastasis, a main hallmark of cancer [24]. These abilities were investigated upon EVs treatment, and no difference is observed on migration (Figure 2F) but both types of EVs improve the invasion of SW480-NM. Nevertheless, EVs derived from SW620-DM significantly enhance invasion properties that are triggered only 6 hours after treatment whereas the effect of EVs from SW620-NM is delayed to 48 hours (Figure 2G). Since the phenotype of targeted cells could be influenced by EVs derived from CSCs, the EM signatures of SW480-NM treated with EVs from the SW620 cell line

were measured to demonstrate that the effects of EVs are not restricted to biological modifications. Cells treated with EVs from CSCs show a lower EM signature than untreated cells (Figure 2I), whereas the EM signature remains the same with EVs from differentiated cells (Figure 2H). To determine if the amount of EVs influences the treated cells in a dose-dependent manner, cells were treated twice for 72h. No dose effect is observed for cells treated with EVs from SW620-NM while the EM signature is even lower for cells treated with EVs from CSCs (Figure 2H,I). However, we observe a slight redistribution of the EM signatures with the appearance of cells with an EM below 100 MHz and 10% of additional cells with an EM higher than 300 MHz for cells treated once with EVs from SW620-NM, and 17% when treated twice (Table 2 and Figure S2B).

Table 2. Cell proportions per frequency range for SW480 treated with EVs

	SW480	+ EVs SW620 NM		+ EVs SW620 DM	
	Normal medium	24h	72h	24h	72h
0-100 MHz	0%	3%	2%	12%	15%
100-200 MHz	12%	19%	19%	31%	51%
200-300 MHz	68%	48%	42%	45%	27%
300-400 MHz	20%	30%	37%	11%	8%



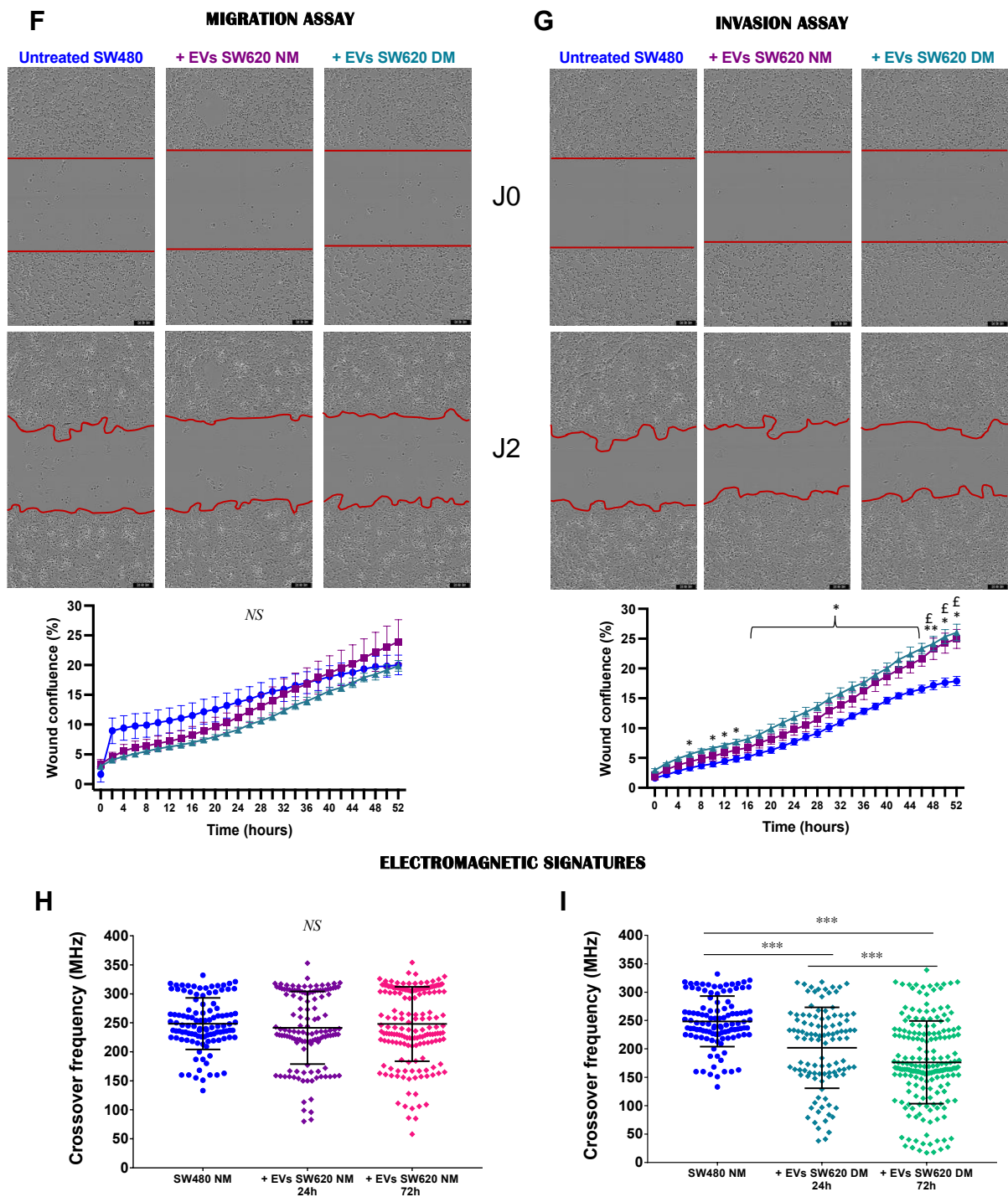


Figure 2. Impact of EVs derived from SW620 on the SW480 cell line. (A) SW480-NM cells were treated once for 24 h with EVs derived from the SW620 cell line (NM or DM cultured cells) to test an aggressiveness transfer. To assess the biological effects of this treatment, stemness related genes (B) were analyzed, as well as the proliferation rate (C), cell cycle (D) and chemotherapy response (E). The ability of cells to migrate (F) or invade (G) has also been explored (*: +EVs SW620 versus untreated SW480, £: +EVs SW620 NM versus untreated SW480) and EM signatures measured (H-I). All results are represented as mean \pm SEM except EM signatures represented as mean \pm SD, NS p -value indicate not significant result, * and £ p -value < 0.05, ** p -value < 0.01, *** p -value < 0.001 using one-way ANOVA test.

Both types of EVs influence treated cells but not at the same level. EVs from CSCs lead to the overexpression of some stemness-related genes, EVs from differentiated cells

promote proliferation while both types enhance invasion and metabolic activity. Regarding the EM signatures, the lab-on-a-chip appears to detect a difference only for cells treated with EVs from CSCs. Since part of the biological changes triggered by CSCs derived-EVs are correlated with the change in EM signature, EM signature might be of primary importance to monitor the phenotypic transformation induced by the transfer of aggressive content from EVs.

3.3. Cancer stem cells from primary cultures of patient show a lower EM signature than their differentiated counterparts

To achieve a proof of concept in clinical conditions, our first results were transposed to tumor cells from CRC patients. Two primary cultures of patient (CPP) from primary tumors were used: CPP14 from a stage I and CPP6 from a stage IV (metastasis stage). As above, cells were cultured in the same two culture conditions and in define medium, they grow as colonospheres (Figure 3A) and overexpress all stemness related genes except *Bmi1* and *Lgr5* (Figure 3B). As for cell lines, CSCs show a lower EM signature compared to differentiated cells (Figure 3C). Compared to cell lines and CPP6, EM signature of CSCs from CPP14 is not opposite to that of differentiated CPP14, there is just a loss of cells between 200 and 300 MHz and an enrichment of cells between 0 and 100 MHz. For CPP6, 100% of differentiated cells are between 100 and 400 MHz while only 15% of CSCs are (Table 3 and Figure S3B).

Table 3. Cell proportions per frequency range for primary cultures of patient

	CPP14		CPP6	
	Normal medium	Define medium	Normal medium	Define medium
0-100 MHz	29%	55%	0%	85%
100-200 MHz	53%	45%	35%	15%
200-300 MHz	18%	0%	49%	0%
300-400 MHz	0%	0%	16%	0%

Like CRC cell lines, both CPP show the same behavior with a distinct EM signature for CSCs and always lower than cells cultured in normal medium.

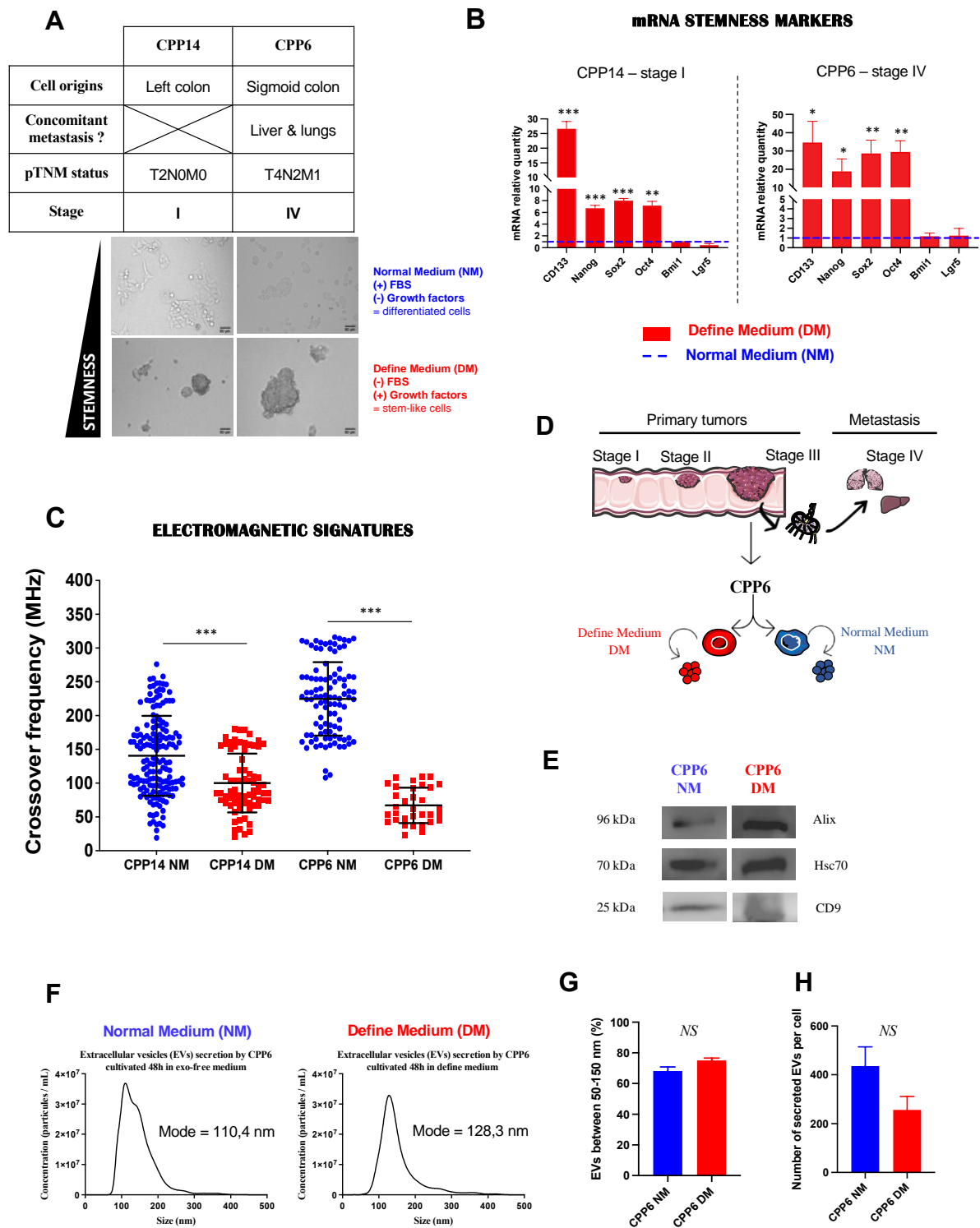


Figure 3. Characterization of primary cultures of patient and their extracellular vesicles according to culture conditions. (A) Two primary cultures of patients at different stages of CRC were cultured under NM or DM to enrich cell population in differentiated cells or in CSCs. The expression of stemness-related genes (B) was explored and EM signatures (C) measured. EVs from CPP6 (NM or DM cultured cells) were collected by ultracentrifugation (D) and expression of EVs markers was assessed by western blot (E). NTA was performed on EVs regarding size distribution (F), percentage of EVs between 50 and 150 nm (G) and number of secreted EVs per cell (H). All results are represented as mean \pm SEM except EM signatures represented as mean \pm SD, NS *p*-value indicate not significant result, * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001 using one-way ANOVA test.

3.4. Extracellular vesicles from primary cultures of patient can transfer aggressive properties and induce EM signature changes detected by biophysics

To demonstrate the transfer of aggressiveness due to EVs derived from aggressive cells, CPP14-NM cells were treated with EVs from CPP6 derived from a metastatic tumor (stage IV). CPP6 was cultured under normal or define medium to collect EVs by ultracentrifugation (Figure 3D). Both types of vesicles express specific EVs markers such as Alix, Hsc70 and CD9 (Figure 3E) and are between 50 and 150 nm in size (Figure 3F,G). Nevertheless, as previously described, CSCs tend to secrete less EVs than differentiated cells (Figure 3H). As with the cell lines, CPP14-NM were treated with EVs from CPP6-NM or CPP6-DM. Since the EM signature result for SW480-NM treated with EVs from SW620-DM was more pronounced with a two-step treatment for 72h, we chose to keep only this treatment (Figure 4A). When CPP14-NM are treated with EVs from CPP6-DM, they overexpress *Nanog*, *Sox2* and *Oct4*, whereas with EVs from CPP6-NM, cells significantly underexpress *CD133*, *Nanog* and *Oct4* (Figure 4B). In contrast, no significant effect of EVs on cell cycle (Figure 4C) or 5-FU response is obtained, although there is a trend toward increased metabolic activity, especially for cells treated with EVs from CSCs (Figure 4D). Strikingly, regardless of the origin of EVs used to treat CPP14-NM cells, the EM signatures increase significantly upon treatment suggesting that the biological changes (increase of CSCs-related genes) that were previously observed are not related to the change in EM signatures (Figure 4E,F, Table 4).

Table 4. Cell proportions per frequency range for CPP14 treated with EVs

	CPP14 Normal medium	+ EVs CPP6 NM 72h	+ EVs CPP6 DM 72h
0-100 MHz	0%	2%	2%
100-200 MHz	12%	34%	37%
200-300 MHz	68%	60%	60%
300-400 MHz	20%	5%	1%

Both EVs alter the state of treated cells with a distinct higher EM signature. Biologically, we only see an overexpression of some stemness related genes for cells treated with EVs from CSCs and a trend toward increased metabolic activity.

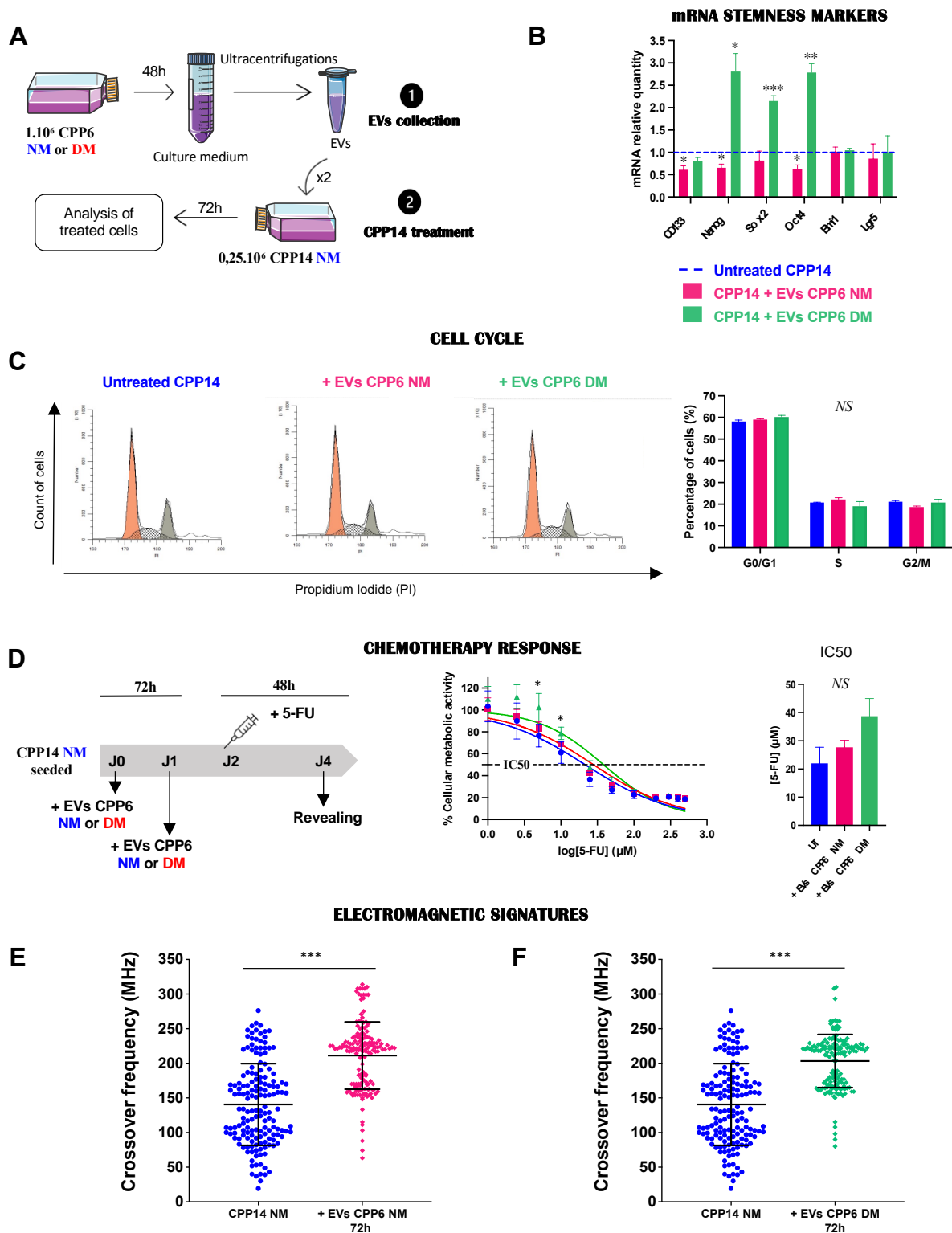


Figure 4. Impact of extracellular vesicles from CPP6 on CPP14 cells. (A) EVs from CPP6 cells (NM or DM) cultured cells) were used to treat CPP14-NM cells twice and for 72h. To assess the biological effect of EVs, expression of stemness related genes (B), cell cycle (C), chemotherapy response (D) and EM signatures (E-F) were analyzed. All results are represented as mean \pm SEM except EM signatures represented as mean \pm SD, NS *p*-value indicate not significant result, * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001 using one-way ANOVA test.

3.5. Extracellular vesicles from the same primary culture of patient have an impact on their EM signature

Because CPP14 and CPP6 come from two CRC patients, they are genetically different and come from a different microenvironment, so we treated CPP6-NM with EVs from the same CPP but cultured in define medium, twice for 72h (Figure 5A). Unfortunately, we do not see any difference in stemness markers expression, cell cycle distribution or response to 5-FU upon treatment (Figure 5B-D). Interestingly, we observe a distinct and lower EM signature when cells are treated with EVs from CSCs (Figure 5E).

Table 5. Cell proportions per frequency range for CPP6 treated with EVs

	CPP6 Normal medium	+ EVs CPP6 DM 72h
0-100 MHz	0%	7%
100-200 MHz	35%	46%
200-300 MHz	49%	45%
300-400 MHz	16%	2%

No biological effects are observed when CPP6-NM are treated with EVs from CPP6-DM but the EM signature is lower. This does not mean that no biological change has occur but that those testes have not evolved with EVs intake. Moreover, this result highlights the relevance of the EM signature which is complementary to biological analysis and can reveal changes that may be missed in biology.

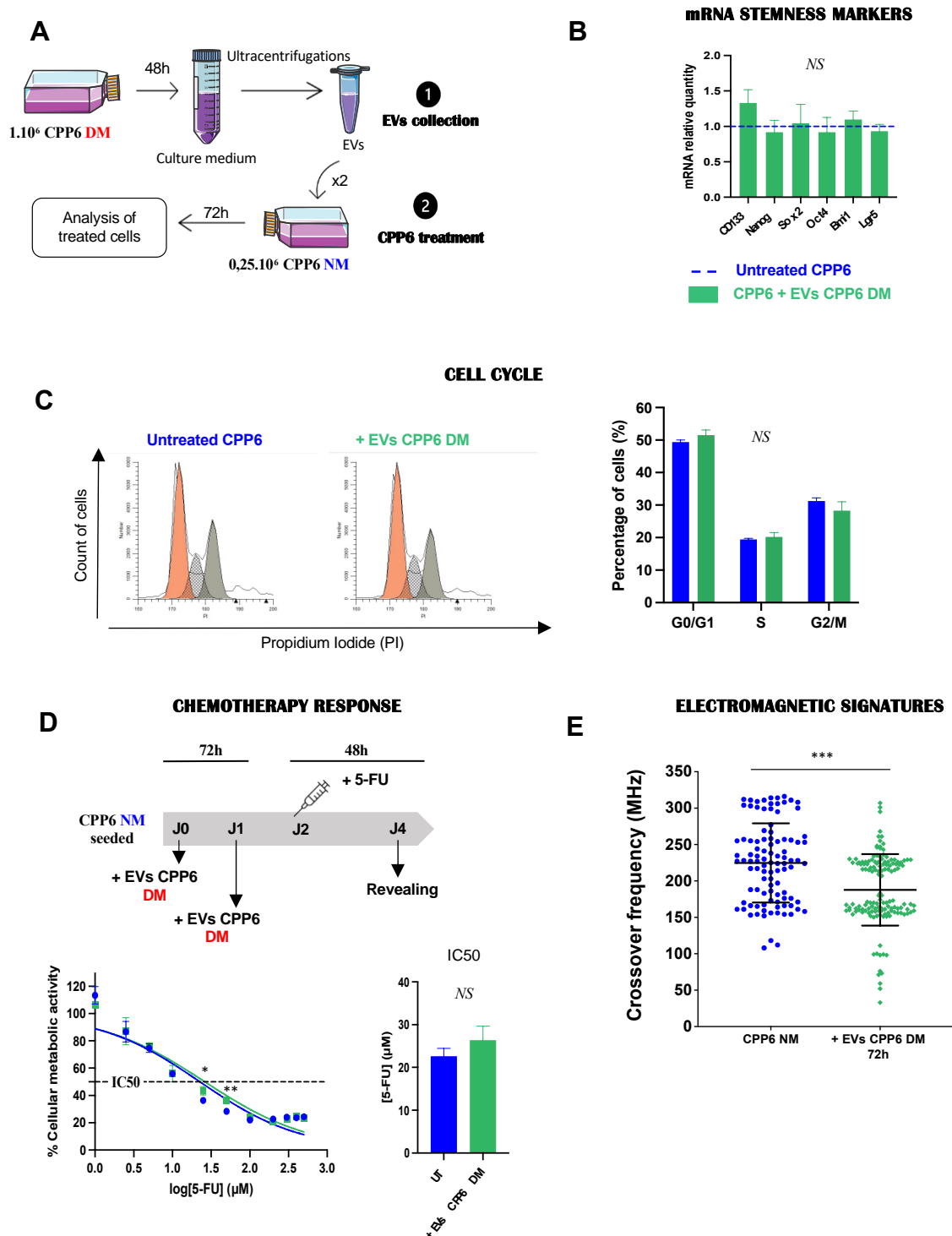


Figure 5. Impact of extracellular vesicles from CPP6 on the same type of cells. (A) EVs from CPP6 cultured under define medium were used to treat CPP6-NM cells twice and for 72h. To undergo the biological effect, stemness related genes (B), cell cycle (C), chemotherapy response (D) and EM signatures (E) were analyzed. All results are represented as mean \pm SEM except EM signatures represented as mean \pm SD, NS p -value indicate not significant result, * p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 , *** p -value < 0.001 using one-way ANOVA test.

4. Discussion

Our work highlights the relevance of our lab-on-a-chip using UHF-DEP analysis to discriminate and track cells status. Previously, the lab-on-a-chip allowed us to distinguish differentiated cells and CSCs in two types of brain tumors. In both cases, the study revealed that CSCs show a distinct and consistently lower EM signature than differentiated

cells [21,22]. Our first goal was to transfer this technology to CRC to determine if the changes in EM signatures are solely a signature of brain tumors or if they can be applied to other tumors. Our main objective is to demonstrate that EM signatures can be modified when tumor cells are treated with EVs derived from aggressive tumor cells related to CSCs. By culturing cells in a define medium to enrich in CSCs, we observed in cell lines and in primary cultures of CRC patient that CSCs show a distinct and consistently lower EM signature than differentiated cells.

The characterization and discrimination of CSCs in a heterogeneous tumor mass remains a challenge since their discovery two decades ago. Initially, the scientific community thought that only stemness markers were needed to label a cell as a CSC. For many years, a lot of scientists have tried to find the best markers and characterization techniques to identify CSCs [5]. Since these markers are also expressed by normal stem cells, only their expression level could be useful to distinguish normal from cancer stem cells. Next, functional properties were assessed to complete the phenotypic characterization and to overcome the lack of universal CSC markers. Unfortunately, new evidence of massive cellular plasticity has emerged in recent years and has been adopted by the scientific community as a new “Hallmark of Cancer” in 2022 [24]. Due to this dynamic plasticity, it is more complicated to qualify a cell as a CSC based on phenotypic and functional characterizations. Moreover, these techniques are expensive, time consuming and require special equipment not still available in laboratories. Although these approaches are time consuming, they were necessary to ensure that cells cultured in define medium were enriched in CSCs. In contrast, UHF-DEP analysis allows us to characterize and discriminate CSCs in a short time of about one hour without prior labeling.

Second, as EVs have received increasing interest in recent years due to their ability to transfer aggressive properties to other cells or cells in the tumor microenvironment [2,9-14] (tumor cells, immune cells, stromal cells ...), we wanted to test whether the lab-on-a-chip could detect a phenotypic change induced by EVs intake. We started with two cell lines from the same CRC patient. Based on EVs cargo secreted by CSCs carry more aggressive properties than those secreted by differentiated cells, SW480 cell line cultured under normal medium (SW480-NM) was treated with EVs from the SW620 cell line cultured under normal or define medium (SW620-NM or SW620-DM). Biological results confirm that stemness related genes (*CD133*, *Sox2*, *Lgr5*) were overexpressed by cells treated with EVs from CSCs. In contrast to the proliferation rate which was mainly increased in cells treated with EVs from differentiated cells. Regardless of the EVs treatment, resistance to chemotherapy increased threefold. No EM signature changes were detected between native SW480 and SW480 treated with EVs derived from SW620-NM suggesting that the EV content of the latter is unlikely to increase SW480 aggressiveness and induce the acquisition of stemness properties. On the contrary, when SW480 were treated with SW620-DM, the EM signature was significantly reduced compared to untreated SW480. Similar experiments were performed with primary CRC cells derived from two patients. However, treatment of early-stage primary cells (CPP14) with EVs from primary cells derived from a late-stage tumor (CPP6) was achieved to determine if EVs are able to transfer tumor aggressiveness as previously demonstrated in glioblastoma [9]. As expected, gene expression analysis confirms that only CPP14 treated with EVs from CPP6-DM overexpress genes related to CSCs (*Nanog*, *Sox2*, *Oct4*), suggesting that the ability of EVs to transfer aggressiveness depends on the nature of the cells that released them. The results also show that the cell cycle distribution was not altered by EVs intake compared to untreated cells and that the metabolic activity tended to increase by the supply of EVs from CSCs. Strikingly, the EM signatures increased with both EVs indicating a phenotypic change even for cells treated with EVs from differentiated cells while no biological changes were detected. This experiment suggests that the lab-on-a-chip might help to detect changes that are difficult to demonstrate by conventional biological approaches. In contrast, the last experiment showed that when CPP6-NM cells were treated with EVs from CPP6-DM, they retained similar phenotypic characteristics. However, the EM signature is significantly

reduced upon treatment, confirming that biophysical properties are relevant for detecting changes that can potentially be missed in biology. The lab-on-a-chip provides relevant results without pre-labeling and is less expensive to use than most biological techniques. It allows to distinguish CSCs from differentiated cells in several types of solid tumors but also to follow the cells to see their evolution [21, 22]. We used it to track cells treated with EVs, but it could be used on liquid biopsies to detect EVs in peripheral blood and monitor their aggressive potential even before analyzing their contents. The analysis of the EM signature of EVs would complement their biological analysis and allow assessment of tumor heterogeneity and the risk of relapse induced by the transfer of genetic and protein materials from therapy resistant cells. In addition, the development of a sorting device based on this technology could be used to isolate CSCs from the tumor mass. The isolation of CSCs will be faster and less expensive than conventional techniques based on phenotypic and functional properties of the cells without altering their properties by prior labeling. As a high number of undifferentiated cells is known to correlate with a high risk of relapse in CRC [4,7], this tool would allow potential early detection of the CSCs subpopulation in the tumor and therefore adapt the care of CRC patients.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Characterization of cell lines according to culture conditions; Figure S2: Impact of EVs derived from SW620 on the SW480 cell line; Figure S3: Characterization of primary cultures of patient according to culture conditions; Figure S4: Impact of EVs derived from CPP6 on cells.

Author Contributions: Conceptualization, E.B., E.L., A.P., C.D., F.L., M.M., and B.B.; Methodology, E.B., E.L., C.H., S.S., R.M., J.P., A.P., C.D., F.L., M.M., and B.B.; Writing—original draft preparation, E.B.; writing—review and editing, E.B., E.L., C.H., S.S., R.M., J.P., A.P., C.D., F.L., M.M., and B.B.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Funding: This research was funded by the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under grant number 737164, by the Nouvelle Aquitaine Council with the Oncosome-track project, and by the “Comité Départemental de la Haute-Vienne de la Ligue Nationale Contre le Cancer”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: UMR INSERM 1308-CAPTuR “Control of Cell Activation in Tumor Progression and Therapeutic Resistance” lab.

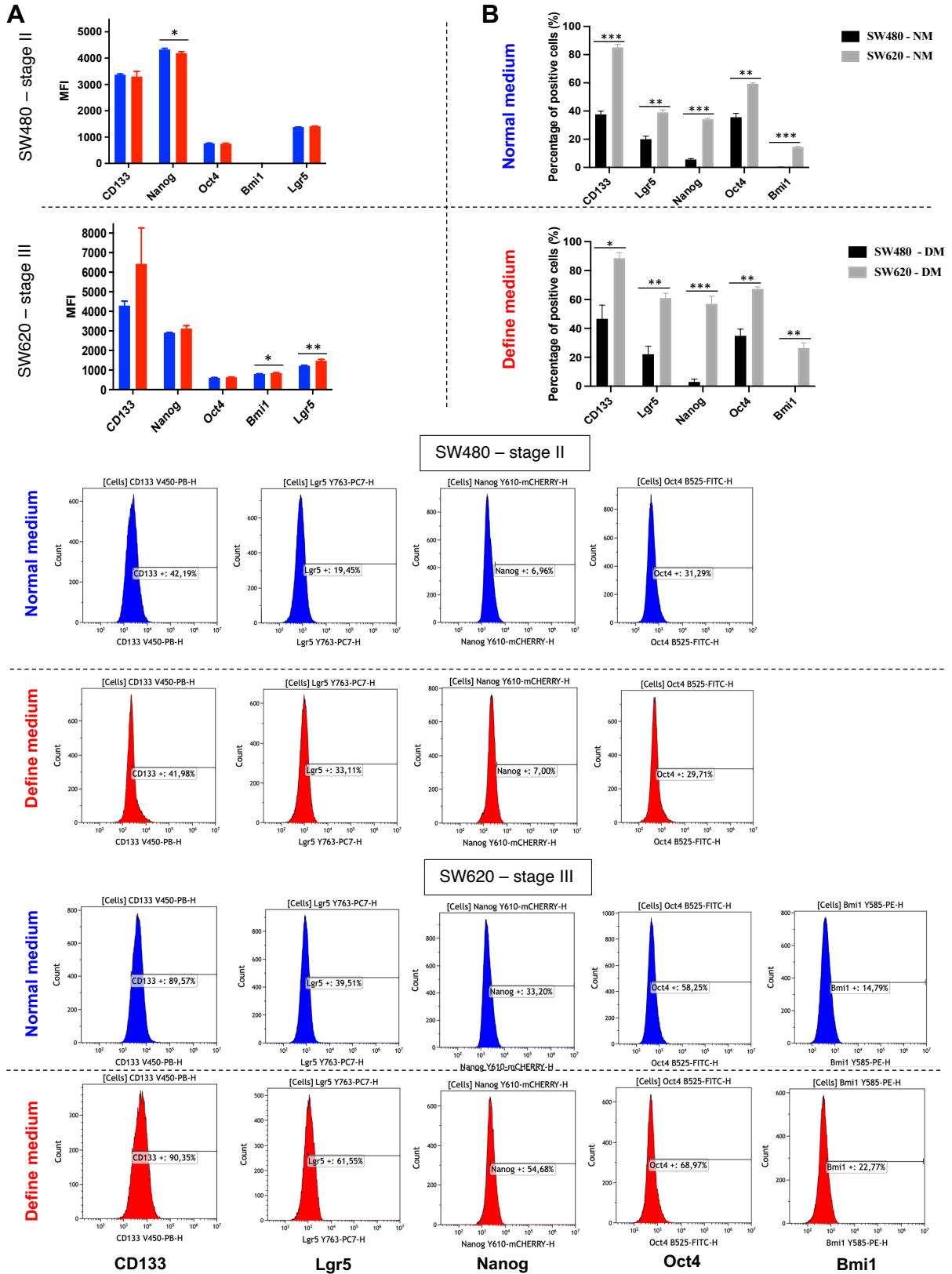
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

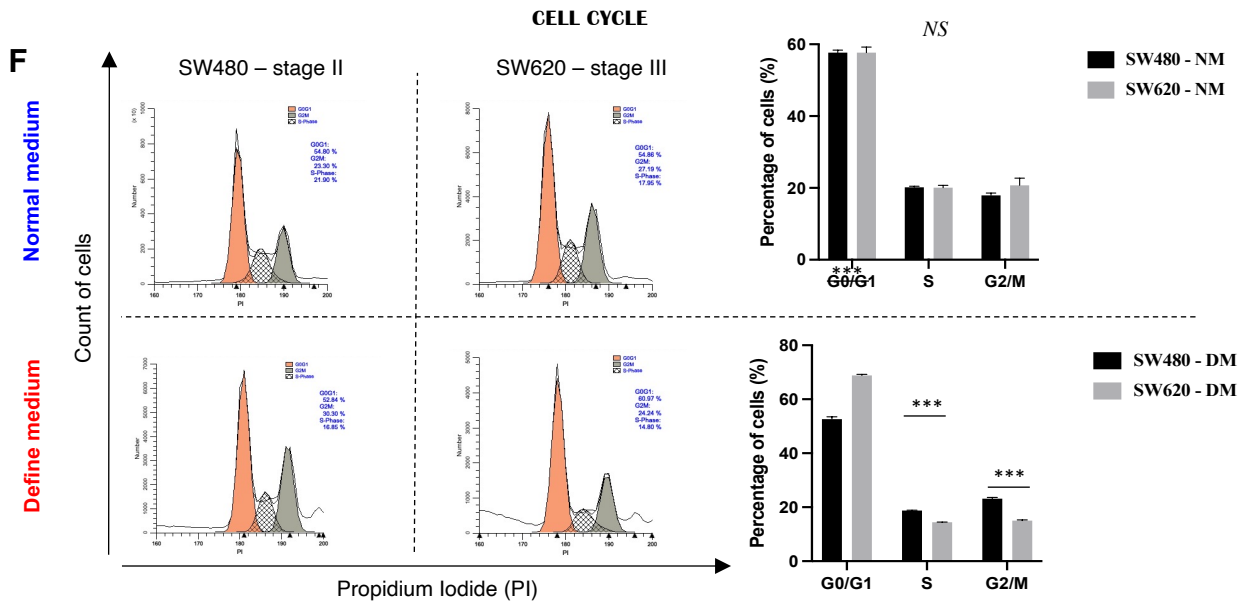
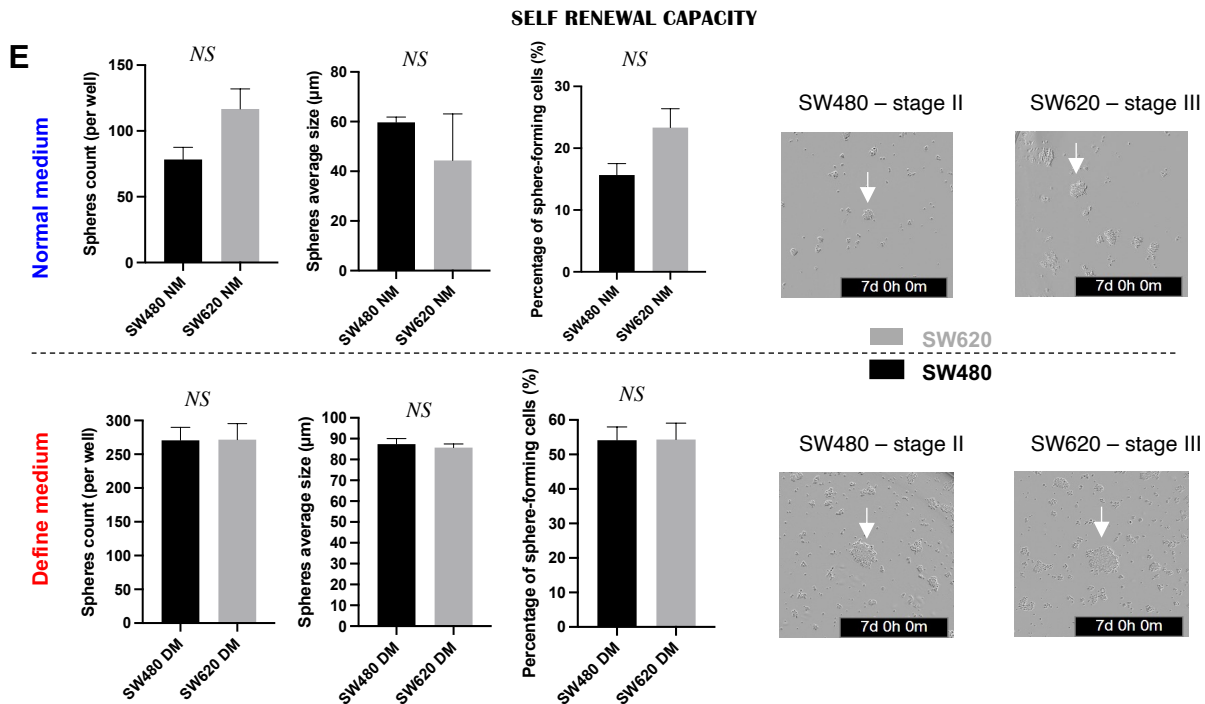
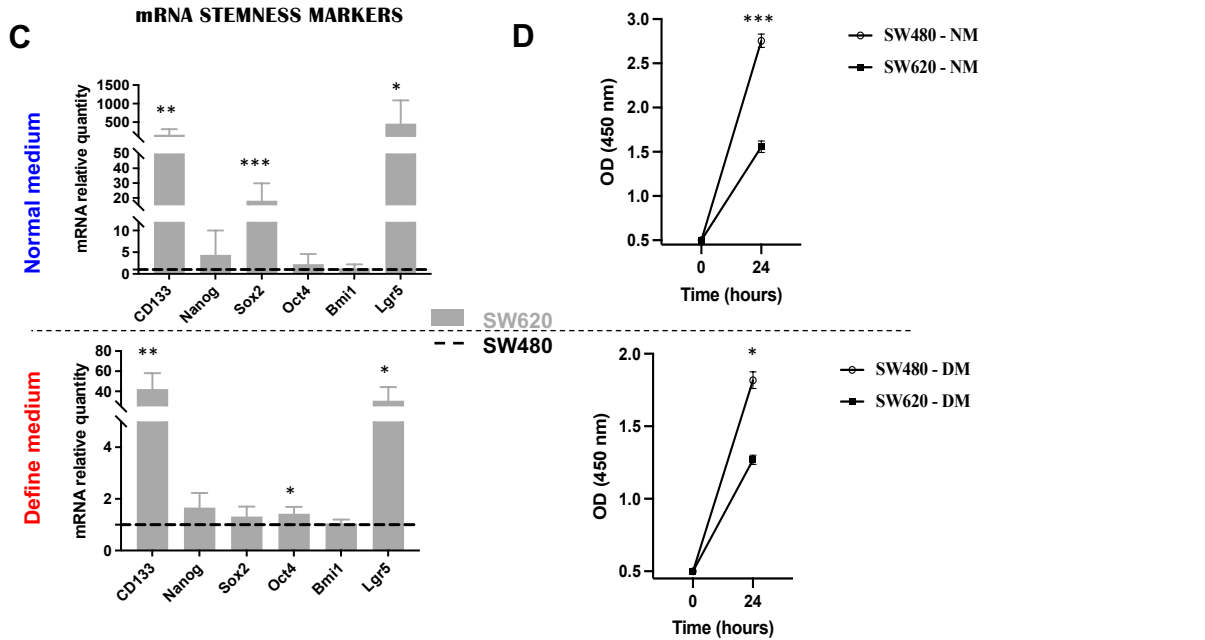
1. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet*. **2019** Oct 19;394(10207):1467-1480. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0. PMID: 31631858
2. Zhou J, Li XL, Chen ZR, Chng WJ. Tumor-derived exosomes in colorectal cancer progression and their clinical applications. *Oncotarget*. **2017** Aug 10;8(59):100781-100790. doi: 10.18632/oncotarget.20117. PMID: 29246022; PMCID: PMC5725064
3. Bounaix Morand du Puch C, Nouaille M, Giraud S, Labrunie A, Luce S, Preux PM, Labrousse F, Gainant A, Tubiana-Mathieu N, Le Brun-Ly V, Valleix D, Guillaudeau A, Mesturoux L, Coulibaly B, Lautrette C, Mathonnet M. Chemotherapy outcome predictive effectiveness by the Oncogramme: pilot trial on stage-IV colorectal cancer. *J Transl Med*. **2016** Jan 12;14:10. doi: 10.1186/s12967-016-0765-4. PMID: 26791256; PMCID: PMC4721000
4. Manhas J, Bhattacharya A, Agrawal SK, Gupta B, Das P, Deo SV, Pal S, Sen S. Characterization of cancer stem cells from different grades of human colorectal cancer. *Tumour Biol*. **2016** Oct;37(10):14069-14081. doi: 10.1007/s13277-016-5232-6. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27507615
5. Hervieu C, Christou N, Battu S, Mathonnet M. The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials. *Cancers (Basel)*. **2021** Mar 4;13(5):1092. doi: 10.3390/cancers13051092. PMID: 33806312; PMCID: PMC7961892
6. Hirata A, Hatano Y, Niwa M, Hara A, Tomita H. Heterogeneity of Colon Cancer Stem Cells. *Adv Exp Med Biol*. **2019**;1139:115-126. doi: 10.1007/978-3-030-14366-4_7. PMID: 31134498

7. Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers* (Basel). **2011** Feb 21;3(1):716-29. doi: 10.3390/cancers30100716. PMID: 21643534; PMCID: PMC3106306
8. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* **2013** Dec;32(3-4):623-42. doi: 10.1007/s10555-013-9441-9. PMID: 23709120; PMCID: PMC3843988
9. Pinet S, Bessette B, Vedrenne N, Lacroix A, Richard L, Jauberteau MO, Battu S, Lalloué F. TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget.* **2016** Aug 2;7(31):50349-50364. doi: 10.18632/oncotarget.10387. PMID: 27385098; PMCID: PMC5226587
10. Chiba M, Kimura M, Asari S. Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines. *Oncol Rep.* **2012** Nov;28(5):1551-8. doi: 10.3892/or.2012.1967. Epub 2012 Aug 10. PMID: 22895844; PMCID: PMC3583404
11. Chiba M, Watanabe N, Watanabe M, Sakamoto M, Sato A, Fujisaki M, Kubota S, Monzen S, Maruyama A, Nanashima N, Kashiwakura I, Nakamura T. Exosomes derived from SW480 colorectal cancer cells promote cell migration in HepG2 hepatocellular cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol.* **2016** Jan;48(1):305-12. doi: 10.3892/ijco.2015.3255. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26647805
12. Wang X, Ding X, Nan L, Wang Y, Wang J, Yan Z, Zhang W, Sun J, Zhu W, Ni B, Dong S, Yu L. Investigation of the roles of exosomes in colorectal cancer liver metastasis. *Oncol Rep.* **2015** May;33(5):2445-53. doi: 10.3892/or.2015.3843. Epub 2015 Mar 9. PMID: 25760247
13. Huang Z, Feng Y. Exosomes Derived From Hypoxic Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis Through Wnt4-Induced β -Catenin Signaling in Endothelial Cells. *Oncol Res.* **2017** May 24;25(5):651-661. doi: 10.3727/096504016X14752792816791. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27712599; PMCID: PMC7841118
14. Wang S, Zhang Z, Gao Q. Transfer of microRNA-25 by colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles facilitates colorectal cancer development and metastasis. *Mol Ther Nucleic Acids.* **2020** Nov 26;23:552-564. doi: 10.1016/j.omtn.2020.11.018. PMID: 33510943; PMCID: PMC7810909
15. Aleena Sumrin, Shumaila Moazzam, Aleena Ahmad Khan, Irsa Ramzan, Zunaira Batool, Sana Kaleem, Moazzam Ali, Hamid Bashir, Muhammad Bilal. Exosomes as Biomarker of Cancer. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* Vol.61: e18160730, **2018**. doi: 10.1590/1678-4324-2018160730
16. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* **2016** Apr 1;126(4):1208-15. doi: 10.1172/JCI81135. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27035812; PMCID: PMC4811149
17. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* **2008** May;10(5):619-24. doi: 10.1038/ncb1725. Epub 2008 Apr 20. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2008 Jun;10(6):752. PMID: 18425114
18. Zhang Q, Liu RX, Chan KW, Hu J, Zhang J, Wei L, Tan H, Yang X, Liu H. Exosomal transfer of p-STAT3 promotes acquired 5-FU resistance in colorectal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* **2019** Jul 19;38(1):320. doi: 10.1186/s13046-019-1314-9. PMID: 31324203; PMCID: PMC6642525
19. Popēna I, Ābols A, Saulīte L, Pleiko K, Zandberga E, Jēkabsons K, Endzeliņš E, Llorente A, Linē A, Riekstiņa U. Effect of colorectal cancer-derived extracellular vesicles on the immunophenotype and cytokine secretion profile of monocytes and macrophages. *Cell Commun Signal.* **2018** Apr 24;16(1):17. doi: 10.1186/s12964-018-0229-y. PMID: 29690889; PMCID: PMC5937830
20. Yamada N, Kuranaga Y, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Akao Y. Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor- β 1-mediated suppression. *Oncotarget.* **2016** May 10;7(19):27033-43. doi: 10.18632/oncotarget.7041. PMID: 27081032; PMCID: PMC5053630
21. Lambert E, Manczak R, Barthout E, Saada S, Porcù E, Maule F, Bessette B, Viola G, Persano L, Dalmay C, Lalloué F, Pothier A. Microfluidic Lab-on-a-Chip Based on UHF-Dielectrophoresis for Stemness Phenotype Characterization and Discrimination among Glioblastoma Cells. *Biosensors* (Basel). **2021** Oct 13;11(10):388. doi: 10.3390/bios11100388. PMID: 34677344; PMCID: PMC8534203
22. Casciati A, Tanori M, Manczak R, Saada S, Tanno B, Giardullo P, Porcù E, Rampazzo E, Persano L, Viola G, Dalmay C, Lalloué F, Pothier A, Merla C, Mancuso M. Human Medulloblastoma Cell Lines: Investigating on Cancer Stem Cell-Like Phenotype. *Cancers* (Basel). **2020** Jan 17;12(1):226. doi: 10.3390/cancers12010226. PMID: 31963405; PMCID: PMC7016648
23. Gonzalez-Villarreal Carlos A., Quiroz-Reyes Adriana G., Islas Jose F., Garza-Treviño Elsa N. Colorectal Cancer Stem Cells in the Progression to Liver Metastasis. *Frontiers in Oncology* (Vol.10). **2020**. doi: 10.3389/fonc.2020.01511
24. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022** Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204

PROTEIN STEMNESS MARKERS



PROLIFERATION ASSAY



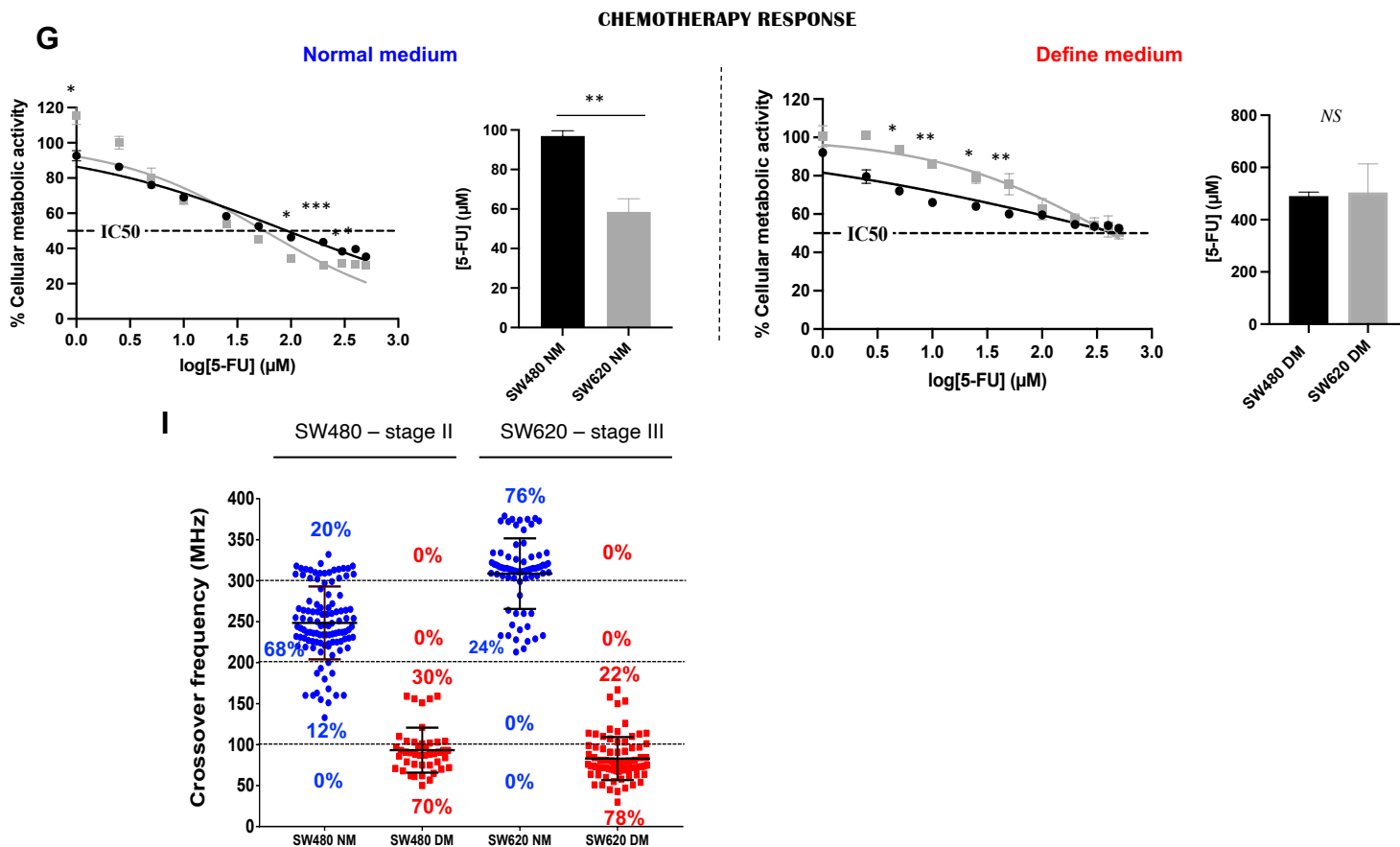


Figure S1. Characterization of cell lines according to culture conditions. Two colorectal cancer cell lines (SW480 and SW620) were cultured in Normal Medium (NM) or Define Medium (DM) to enrich cell population in differentiated cells or in CSCs, respectively. Mean Fluorescence Intensity (MFI) of stemness markers was assessed according to culture conditions for each cell line (A-B). Cell lines were compared to each other according to culture conditions for stemness markers (B), stemness related genes expression (C), proliferation rate (D), self-renewal capacity (E), cell cycle (F) and response to chemotherapy (G). The EM signature of both cell types was measured at UHF and cell proportions in 100 MHz increments are shown (I). All results are represented as mean \pm SEM except EM signatures represented as mean \pm SD, NS *p*-value indicate not significant result, * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001 using one-way ANOVA test.

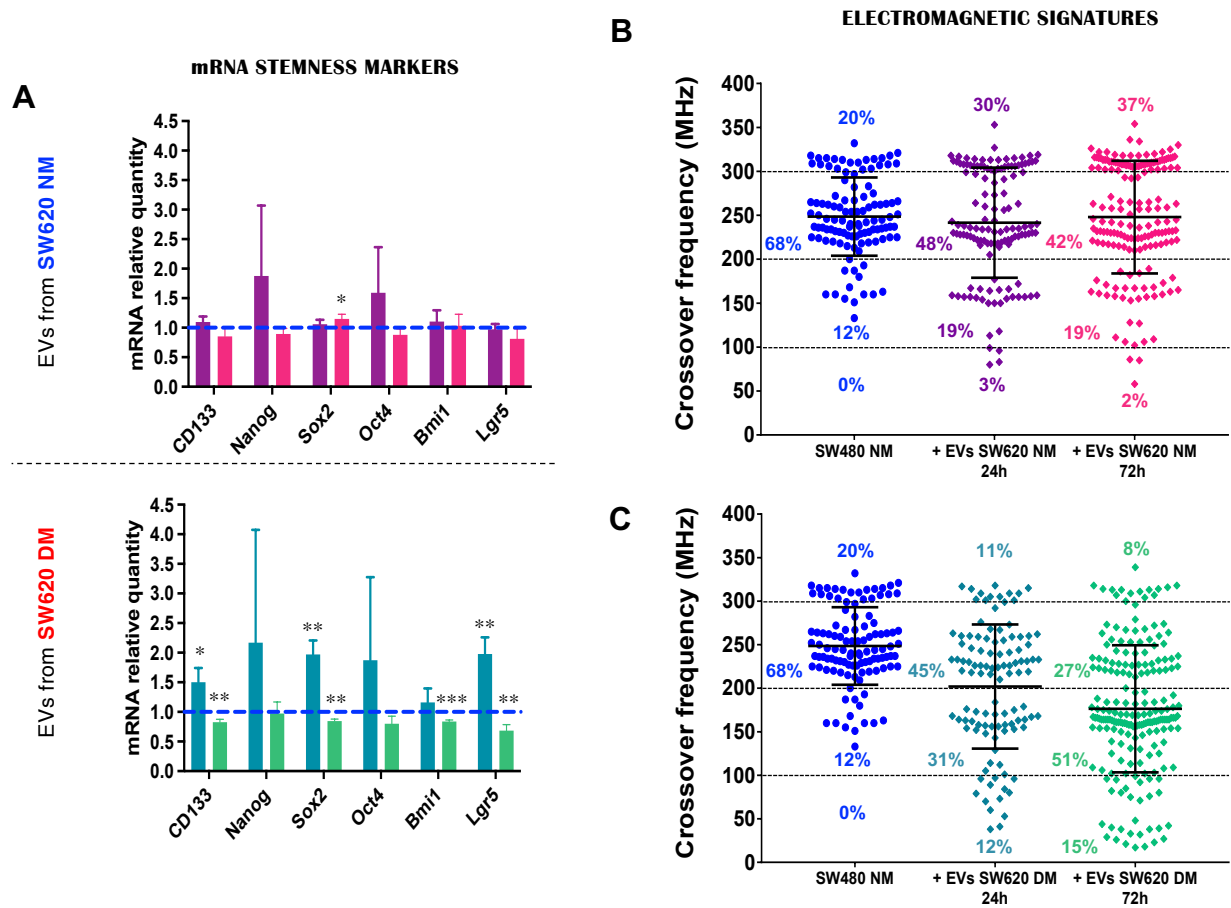


Figure S2. Impact of EVs derived from SW620 on the SW480 cell line. SW480-NM cells were treated once for 24 h (purple and light blue conditions) or twice for 72h (pink and green conditions) with EVs derived from the SW620 cell line (NM or DM cultured cells). Stemness-related genes were analyzed (A) according to treatment conditions, blue dotted line corresponding to untreated cells. The EM signature of cells treated with EVs from SW620-NM (B) or SW620-DM (C) were measured at UHF and cell proportions in 100 MHz increments are shown. All results are represented as mean \pm SEM except EM signatures represented as mean \pm SD, NS *p*-value indicate not significant result, * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001 using one-way ANOVA test.

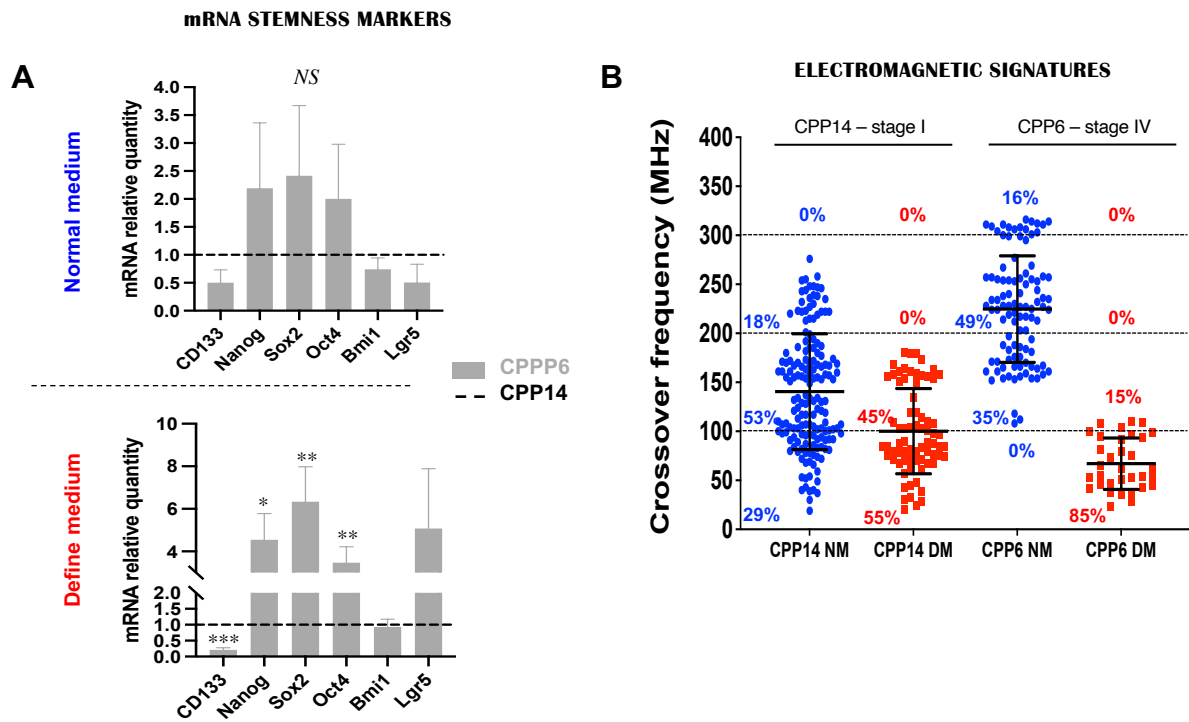


Figure S3. Characterization of primary cultures of patient according to culture conditions. Two colorectal primary cultures of patients (CPP14 and CPP6) were cultured in Normal Medium (NM) or in Define Medium (DM) to enrich cell population in differentiated cells or in CSCs, respectively. CPP were compared to each other according to culture conditions for stemness related genes (A). The EM signature of CPP according to culture was measured at UHF and cell proportions in 100 MHz increments are shown (B). All results are represented as mean \pm SEM except EM signatures represented as mean \pm SD, NS p -value indicate not significant result, * p -value < 0.05, ** p -value < 0.01, *** p -value < 0.001 using one-way ANOVA test.

ELECTROMAGNETIC SIGNATURES

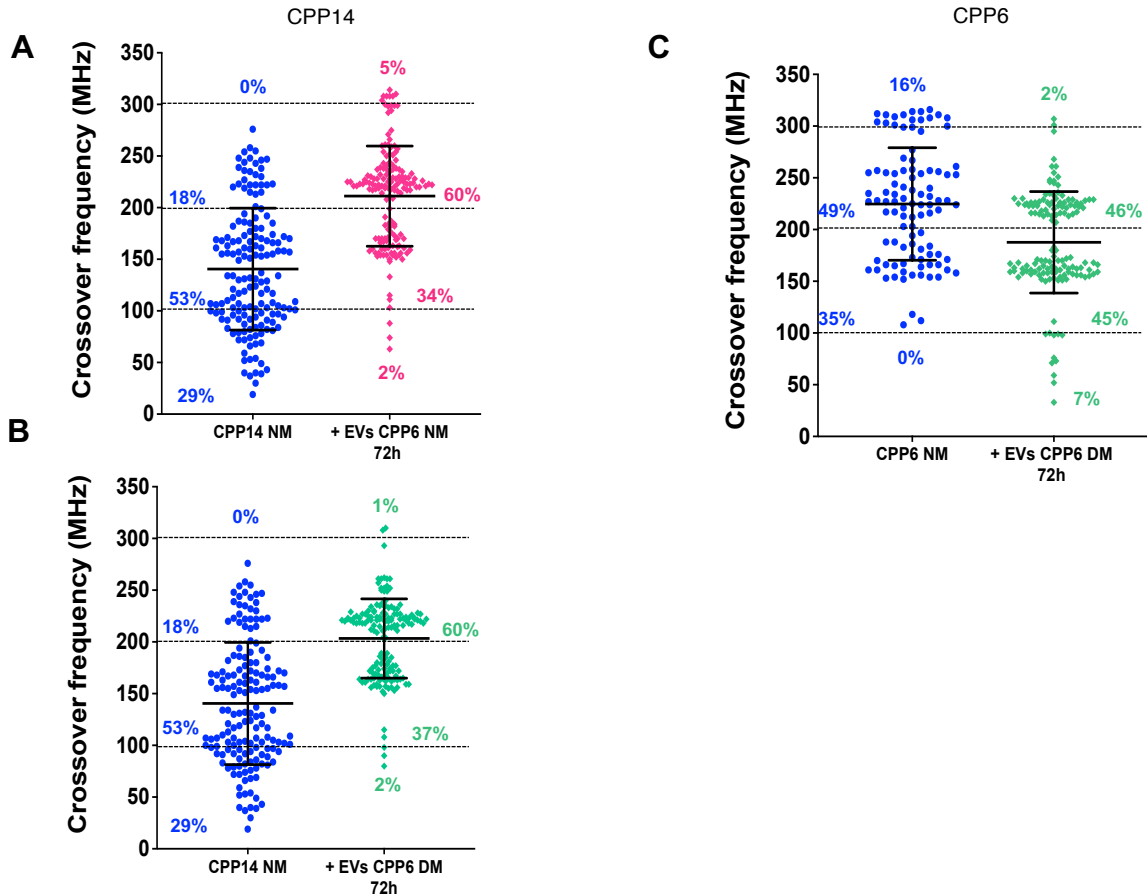


Figure S4. Impact of EVs derived from CPP6 on cells. CPP14-NM cells were treated twice for 72h with EVs from CPP6-NM (A) or CPP6-DM (B). CPP6-NM cells were treated twice for 72h with EVs from CPP6-DM (C). The EM signature of treated cells was measured at UHF and cell proportions in 100 MHz increments are shown. All results are represented as mean \pm SEM except EM signatures represented as mean \pm SD, NS *p*-value indicate not significant result, * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001 using one-way ANOVA test.

Effets de vésicules extracellulaires sécrétées par des cellules tumorales colorectales sur le profil des cellules immunitaires à activité cytotoxique

Mes travaux de thèse ont porté sur l'influence des EVs sécrétées par des cellules de CCR sur la progression tumorale. Dans un premier temps, cette influence a été étudiée entre les cellules tumorales à l'aide du biocapteur afin de mettre en évidence une potentielle coopération entre les différents types cellulaires formant la masse tumorale. Dans un second temps, cette influence a été étudiée vis-à-vis des cellules immunitaires. Comme évoqué en Chapitre III, les EVs présentent de nombreux rôles pro-tumoraux et l'un d'entre eux est l'immunomodulation. En effet, elles sont sécrétées par les cellules tumorales afin d'inhiber spécifiquement les cellules immunes et d'échapper à la surveillance antitumorale. Dans le CCR, il a été démontré que les EVs de cellules tumorales pouvaient avoir une influence sur de nombreux types cellulaires immuns (Lafitte, Lecointre, et Roche 2019; Mannavola *et al.* 2019; Popēna *et al.* 2018; Yamada *et al.* 2016). Nous avons donc souhaité évaluer quels seraient les impacts des sécrétions d'EVs par des cellules tumorales colorectales sur le profil des cellules immunitaires. Nous nous sommes principalement intéressées au potentiel effet inhibiteur sur ces cellules, physiologiquement traduit par l'engagement de PD-1 et ses ligands.

Afin d'étudier le rôle des EVs sur les cellules immunes, nous avons de nouveau utilisé la lignée SW480, cultivée en milieu normal ou défini dans le but d'évaluer les effets des vésicules en fonction de leur origine (cellules différenciées ou CSCs). Le phénotype de CSC ayant été vérifié précédemment et les résultats étant à retrouver dans l'article prochainement soumis au journal *Cells*. Dans un premier temps, nous avons vérifié que cette lignée exprimait bien les checkpoints d'intérêt et ce, peu importe les conditions de culture (Figure 29).

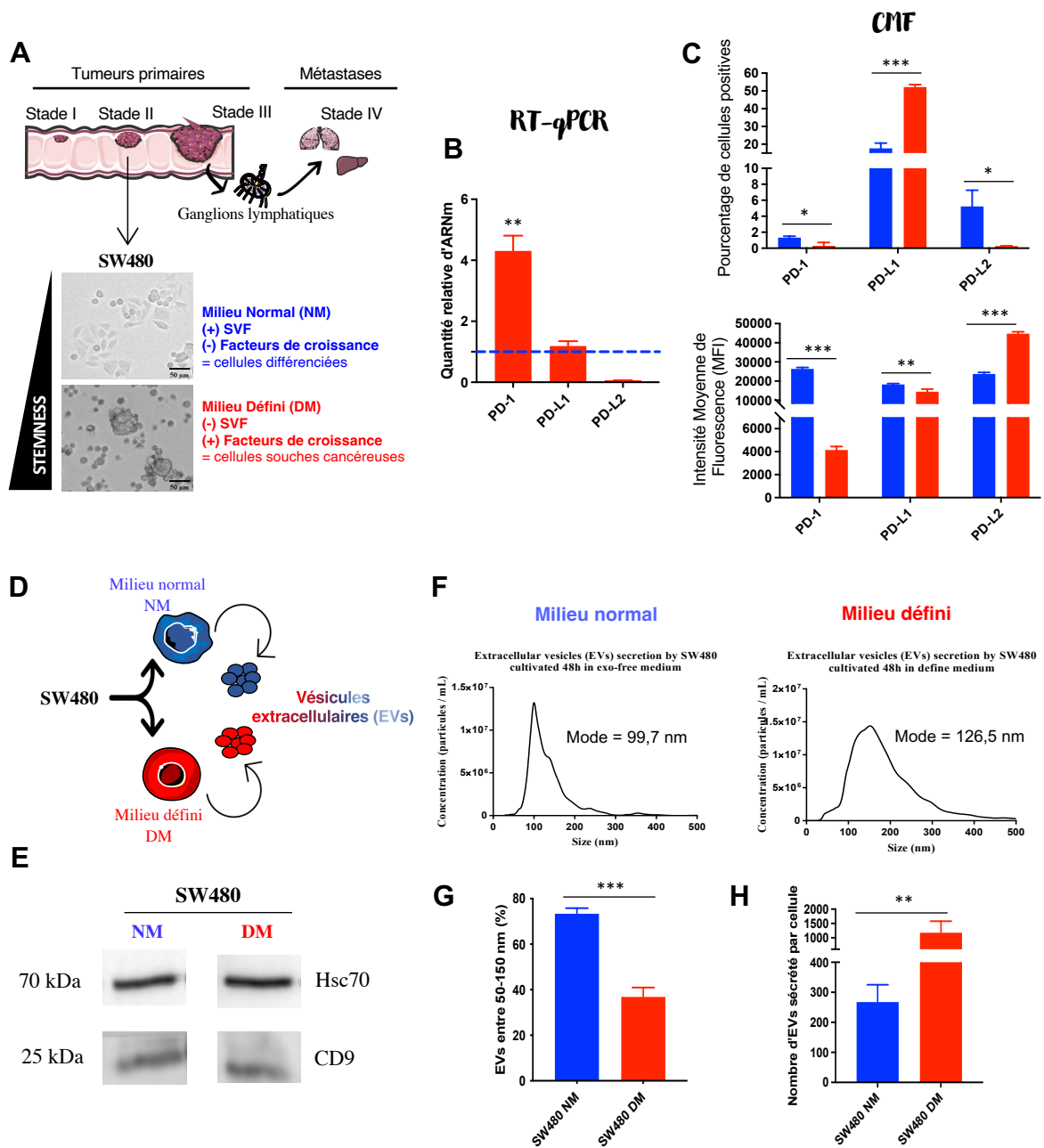


Figure 29 : Caractérisation de la lignée SW480 concernant l'expression des checkpoints immuns

La lignée cellulaire SW480 a été cultivée en milieux normal ou défini (NM ou DM) dans le but d'enrichir en cellules différenciées (bleu) ou en CSCs (rouge), respectivement (A). Les expressions transcriptomique (B) et protéomique (C) des checkpoints immuns ont été évaluées en fonction du phénotype cellulaire ; la condition NM correspondant à la condition contrôle dans le panel B (ligne bleue en pointillés). Les EVs sécrétées par ces cellules ont été récupérées par ultracentrifugations (D) et leurs caractéristiques ont été analysées par NTA (F, G, H) ainsi que par western blot (E). Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM et obtenus en $n=3$ sauf le western blot obtenu en $n=1$,

* : p -value < 0,05 ; ** : p -value < 0,01 ; *** : p -value < 0,001

L'expression des checkpoints immuns a été évaluée à la fois par RT-qPCR et par CMF. Des profils d'expression différents sont observés en fonction des conditions de culture, les CSCs surexprimant le transcrit *PD-1* tandis qu'elles surexpriment très fortement la

protéine PD-L1. Le transcrit *PD-L2* n'avait pas été détecté en condition DM, signifiant que l'expression de cet ARNm semble diminuer lors du passage vers le phénotype de CSC. Quant à *PD-L1*, il semblerait que le transcrit subisse des modifications menant à sa régulation positive dans les CSCs (50% de CSCs positives contre 20% de cellules différenciées). Ensuite, en ce qui concerne les protéines PD-1 et PD-L2, PD-1 est très peu exprimée par les cellules différenciées et semble l'être encore moins par les CSCs ; cette différence étant davantage marquée concernant PD-L2 (Figure 29B,C). Au vu de ces résultats, il est probable que les cellules SW480 interagissent avec les cellules immunes *via* l'expression de PD-L1. Ensuite, il a été vérifié que les vésicules récoltées après ultracentrifugations différentielles étaient bien des EVs (Figure 29D). L'expression des marqueurs Hsc70 et CD9, spécifiques des EVs, a été vérifiée par western blot (Figure 29E) puis les vésicules ont été analysées par NTA. Pour les deux conditions de culture, le mode, c'est-à-dire la taille de particules la plus représentée dans l'échantillon, se trouve entre 50 et 150 nm (Figure 29F). Toutefois, les CSCs sécrètent davantage d'EVs (Figure 29H) et de plus grande taille, réduisant le pourcentage d'EVs entre 50 à 150 nm de 75% pour les cellules différenciées à 40% pour les CSCs (Figure 29G). Puisque l'objectif est de déterminer le(s) rôle(s) des EVs provenant de cellules tumorales sur les cellules immunitaires, il aurait été intéressant de déterminer la présence des checkpoints au niveau de ces vésicules. Ceci a été testé mais malheureusement, ni les transcrits, ni les protéines codant ces checkpoints n'ont pu être mises en évidence car de grandes quantités de matériel sont nécessaires. Malgré ce manque, l'effet fonctionnel des EVs sur les cellules immunitaires a été exploré.

Dans un premier temps, l'impact des EVs sur la proportion des LT et des NK, acteurs cytotoxiques majeurs de la lutte antitumorale, a été étudié (Figure 30). Les valeurs de CMF obtenues pour l'ensemble des figures étant répertoriées en Annexes 2 et 3.

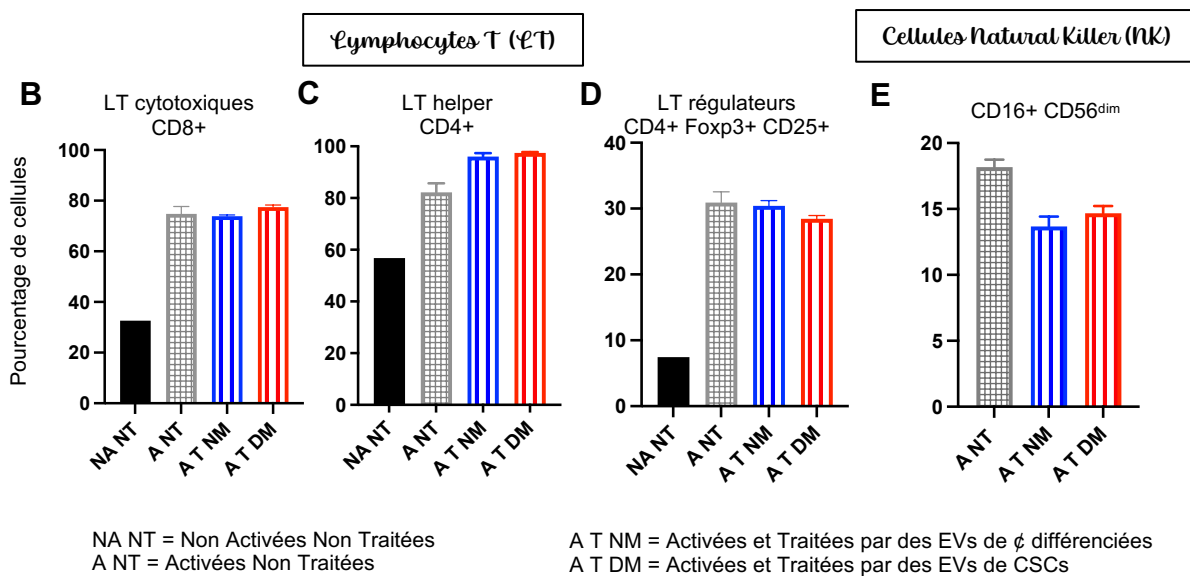
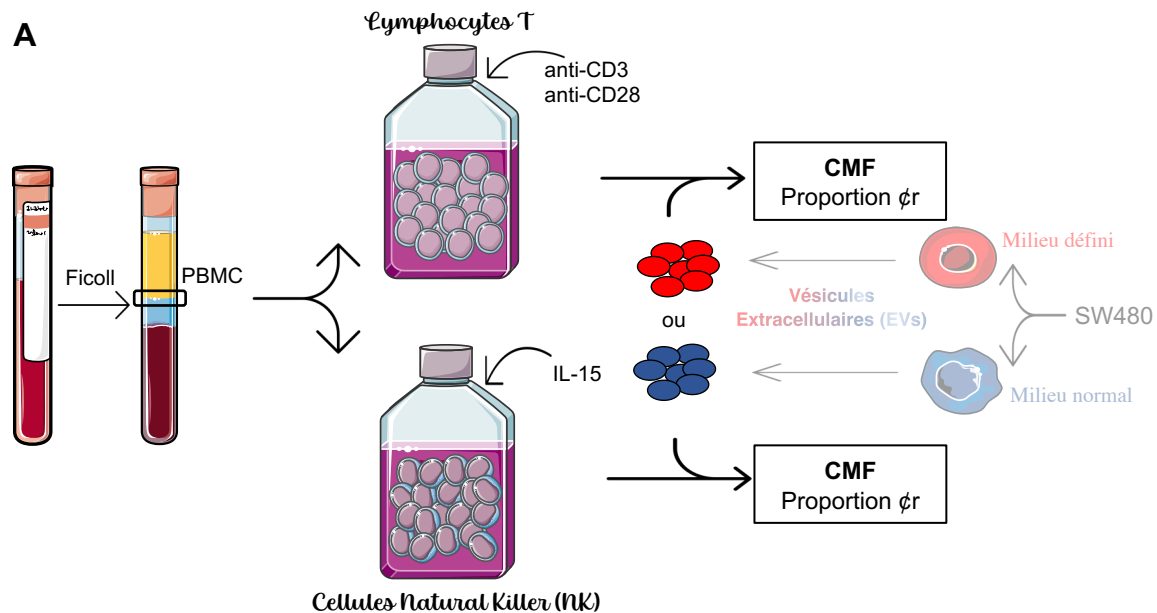


Figure 30 : Incidence du traitement de cellules immunitaires par des EVs tumoraux sur leur proportion. Du sang d'un individu sain a été récupéré puis les PBMC isolés du reste des composants sanguins. À l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ou d'IL-15, les LT et les NK ont été spécifiquement activés durant 48h puis ces cellules ont été mises au contact d'EVs provenant de cellules tumorales durant 48h supplémentaires (A). La proportion de LT cytotoxiques (B), de LT helper (C), de LT régulateurs (D) et de cellules NK (E) a ensuite été analysée par CMF.

Pour se faire, des tubes de sang provenant d'un individu sain ont été récupérés puis les cellules mononucléées, ou PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells), ont été extraites par gradient de densité en Ficoll. Ensuite, dans le but d'activer spécifiquement les LT ou les NK, les PBMC ont été traités avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ; ou de l'IL-15 (Interleukine 15). Après 48h de traitement, les deux types cellulaires ont été mis en contact des EVs provenant de CSCs ou de cellules différenciées durant 48h supplémentaires (Figure 30A) puis analysés par CMF. Les deux catégories principales de LT ont été étudiées : la fraction « cytotoxique » caractérisée par l'expression du CD8 (LTc) et la fraction « auxiliaire » exprimant le CD4 (LTh). La fraction LTc correspond à la fraction d'intérêt dans

la lutte antitumorale puisqu'il s'agit des cellules capables d'éliminer les cellules cancéreuses, la fraction LTh est une fraction très variée pouvant jouer de multiples rôles. Comme le montre le panel B de la Figure 30, aucun effet n'est observé sur la proportion de LTc après contact avec les EVs. À l'inverse, une augmentation de la proportion de lymphocytes T CD4⁺ est notable. En effet, il semble que quel que soit le type d'EVs, ceux-ci entraînent une augmentation de la proportion de LTh passant d'environ 80% pour les cellules non traitées (A NT) à plus de 95% suite au traitement (A T) (Figure 30C). Ce résultat a conduit les recherches à explorer une sous-population de CD4⁺, les LTreg exprimant en plus du CD4, les protéines Foxp3 et CD25. Cette sous-population a pour rôle de réguler les autres lymphocytes T, régulation notamment négative afin de permettre une tolérance immune. L'objectif étant de déterminer si l'augmentation du nombre de LTh provient d'une augmentation du nombre de LTreg pouvant jouer un rôle pro-tumoral. Il s'est avéré que ce n'est pas le cas puisque les résultats obtenus sont inversés avec une légère décroissance du nombre de LTreg en cas de traitement par des EVs provenant de CSCs (-2%, voir Annexe 2) (Figure 30D). Enfin, en ce qui concerne les cellules NK, caractérisées par l'expression des marqueurs CD16 et CD56, une diminution de leur proportion d'environ 5% suite au traitement par les EVs est observée (Figure 30E). Ce phénomène a déjà été précédemment rapporté (Bae, Brumbaugh, et Bonavida 2018) et ici, il concerne les EVs provenant de cellules tumorales différenciées ou de CSCs.

Ces résultats, réalisés sur un seul individu sain donc préliminaires, semblent indiquer que les EVs sécrétées par les cellules SW480 sont capables d'aller réguler les cellules immunitaires en inhibant les NK et en activant les LTh. Dans ces travaux, les LTc et LTreg n'ont pas été impactés dans leur proportion par les EVs alors que les cellules NK semblent inhibées. De plus, les LTh subissent une expansion suite au contact avec les EVs, quel qu'en soit le type. Ces LTh regroupent une grande variété de cellules en plus des LTreg : Th1, Th2, Th17 ... dont les rôles varient. Ici, il ne s'agit pas de la population lymphocytaire d'intérêt donc leur sous-type n'a pas été déterminé avec précision.

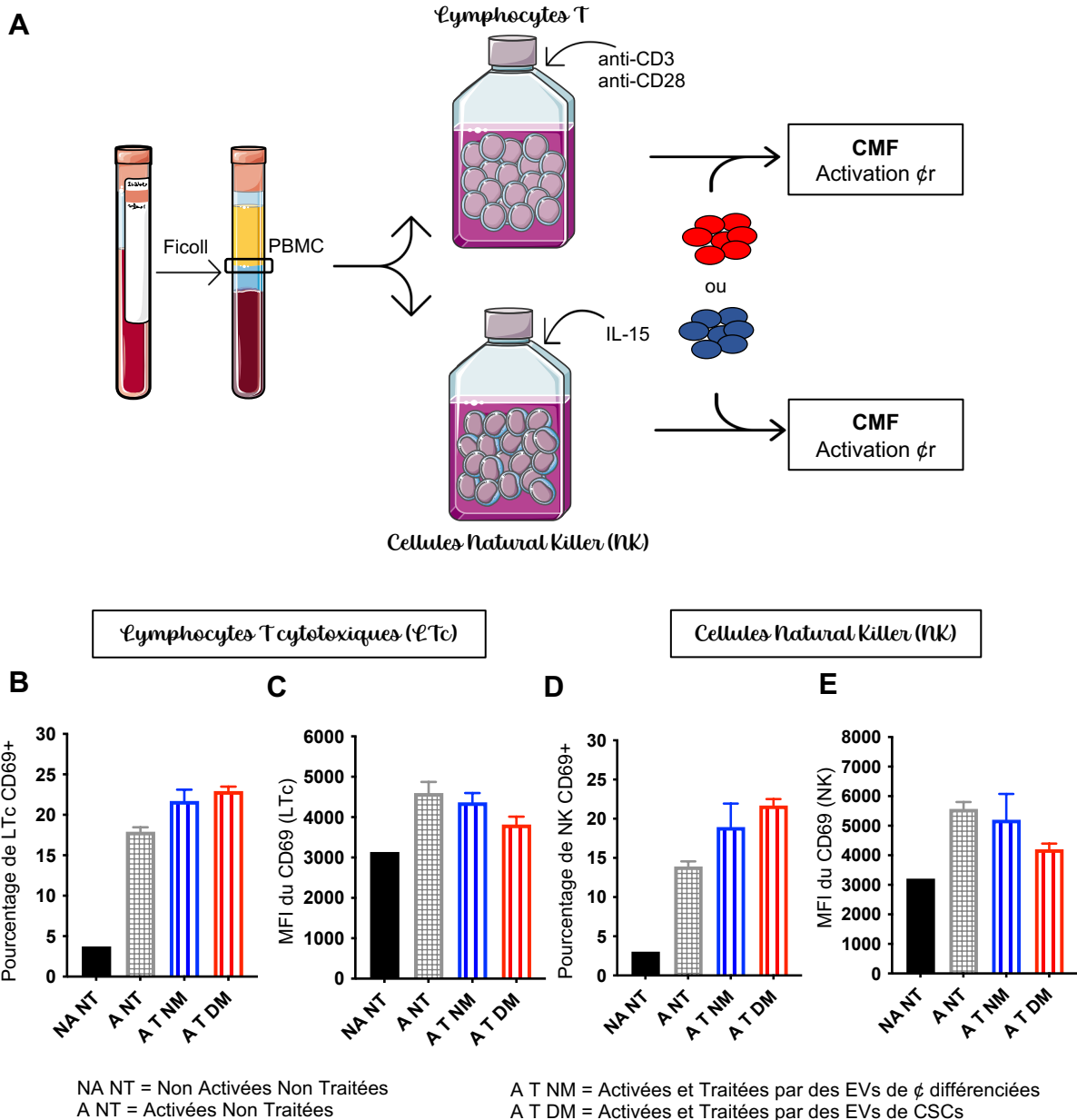


Figure 31 : Incidence du traitement de cellules immunitaires par des EVs tumoraux sur leur activation. Du sang d'individu sain a été récupéré puis les PBMC isolés du reste des composants sanguins. À l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ou d'IL-15, les LT et les NK ont été spécifiquement activés durant 48h puis ces cellules ont été mises au contact d'EVs provenant de cellules tumorales durant 48h supplémentaires (A). L'analyse du nombre de cellules positives au marqueur d'activation CD69 ainsi que la MFI correspondante a été réalisée par CMF sur les LT cytotoxiques (B, C) ainsi que sur les cellules NK (D, E).

Puisque les cellules immunitaires impliquées dans l'élimination des cellules tumorales sont de type cytotoxique, seuls les LTc et les NK ont été étudiés dans la suite des expériences. Tout d'abord, l'activation de ces cellules a été mesurée *via* l'expression d'un marqueur spécifique, le CD69 (Figure 31). Une surexpression est observée seulement lorsque les cellules immunitaires ont reçu les signaux nécessaires entraînant leur expansion (condition « A NT »), servant de contrôle interne à l'expérience. Ensuite, des résultats similaires sont obtenus entre les LTc et les NK. En effet, au contact de vésicules extracellulaires, qu'elles proviennent de cellules tumorales différenciées ou de CSCs, elles entraînent une augmentation du nombre de LTc et de NK exprimant le CD69 d'environ 5% (Figure 31B,D).

Ceci signifie qu'au contact des EVs, les cellules immunitaires vont effectivement les reconnaître comme un danger. Par contre, l'étude de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI), traduisant la quantité de molécules présente sur une même cellule ; démontre que le contact avec les EVs diminue cette MFI, particulièrement celles provenant des CSCs (Figure 31C,E). Les EVs vont entraîner une activation supplémentaire des LTc et des NK, ce qui mène à une augmentation du nombre de cellules exprimant le CD69 mais à l'inverse, ces cellules expriment individuellement moins fortement ce marqueur d'activation. De plus, cette même tendance est observée mais d'intensité différente selon l'origine des EVs. L'hypothèse émise serait que l'impact des EVs sur les cellules immunitaires dépende de la cellule émettrice.

Physiologiquement, la régulation de l'activité des cellules immunes est réalisée par l'engagement de checkpoints immuns exprimés à leur surface. L'expression de PD-1 et de ses ligands PD-L1 et PD-L2 par les lymphocytes T et les NK a été explorée dans le but de déterminer si le contact avec des EVs tumoraux régulait à la hausse leur expression (Figures 32 et 33). L'hypothèse étant qu'une surexpression de ces checkpoints médiée par les EVs pourrait sensibiliser les cellules immunes à l'inhibition et donc favoriser la croissance tumorale.

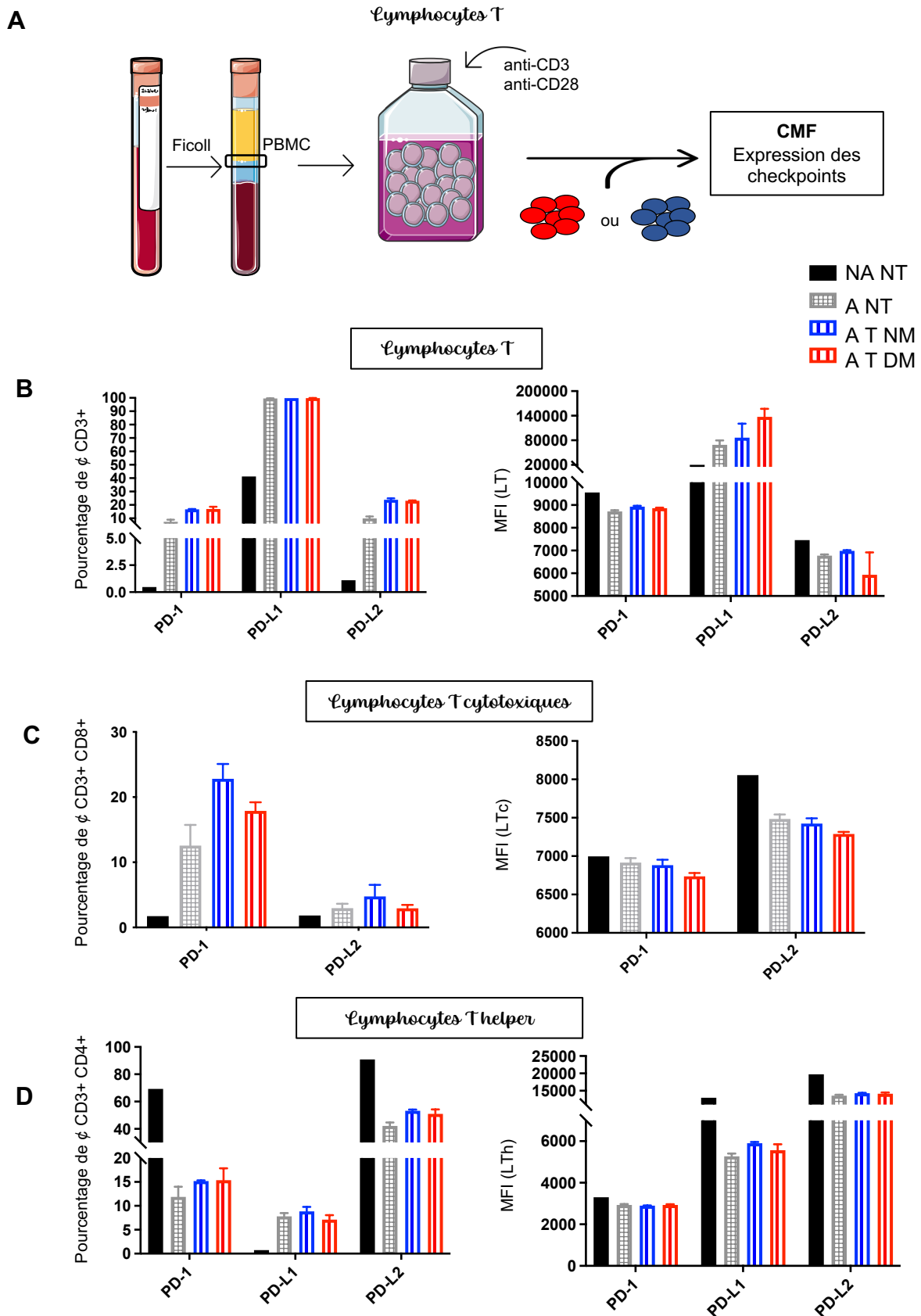


Figure 32 : Expression des checkpoints immuns par les lymphocytes T

Du sang d'individu sain a été récupéré puis les PBMC isolés du reste des composants sanguins. À l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28, les LT ont été spécifiquement activés durant 48h puis ces cellules ont été mises au contact d'EVs provenant de cellules tumorales durant 48h supplémentaires (A). L'expression des checkpoints immuns et leur MFI ont été évaluées par CMF sur les LT totaux (B), les LTc (C) et les LTh (D).

Dans un premier temps, l'expression des checkpoints par CMF dans tous les lymphocytes T a été étudiée par l'analyse des cellules CD3⁺ (Figure 32B). Une fois activés, presque tous les LT expriment la protéine PD-L1 et un contact avec des EVs tumoraux n'entraîne pas de modification visible à ce niveau. Par contre, la MFI de PD-L1 évolue considérablement et positivement suite au contact avec des EVs provenant de CSCs. Concernant PD-1 et PD-L2, le traitement par des EVs provenant des cellules SW480 entraîne une augmentation de l'expression de ces deux protéines par les LT ; la différence d'expression par rapport à la condition non traitée étant plus importante pour PD-L2 (+9% pour PD-1, +13% pour PD-L2, voir Annexe 3). La MFI de PD-1 reste similaire à la condition contrôle, tout comme celle de PD-L2 malgré un résultat très hétérogène concernant le traitement par des EVs de CSCs. Ensuite, l'analyse en fonction du sous-type de LT démontre que les LTc présentent une surexpression de PD-1 suite au contact avec les EVs tumoraux (+10% NM, +5% DM), ainsi que de 2% pour PD-L2 si les EVs proviennent de cellules tumorales différenciées. Quant aux MFI, elles semblent diminuer suite à ce contact pour les deux protéines mais de façon plutôt modérée (Figure 32C et Annexe 3). Ici, PD-L1 n'a pas été analysé pour cause de fluorochromes identiques entre les protéines CD8 et PD-L1. Enfin, les LTh présentent une expression similaire de PD-L1 entre les conditions traitées ou non traitées. À l'inverse, les protéines PD-1 et PD-L2 semblent surexprimées suite à la rencontre avec des EVs provenant de cellules tumorales (+3% PD-1, +10% PD-L2, voir Annexe 3). Les mesures de MFI démontrent que seule PD-L1 semble impactée et se trouve davantage représentée sur les LTh ayant rencontré les EVs de cellules différenciées (Figure 32D).

En résumé, les LT totaux (CD3⁺) surexpriment PD-1 et PD-L2 suite au contact avec les EVs mais seule la MFI de PD-L1 va augmenter. La question était alors de déterminer quelle sous-population de LT était concernée par ces fluctuations. Il se trouve que les deux populations testées, cytotoxique et helper, présentent toutes deux une surexpression de ces deux protéines suite au contact avec les EVs. Ces résultats sont-ils similaires concernant la population de cellules cytotoxiques innée : les cellules NK (Figure 33)?

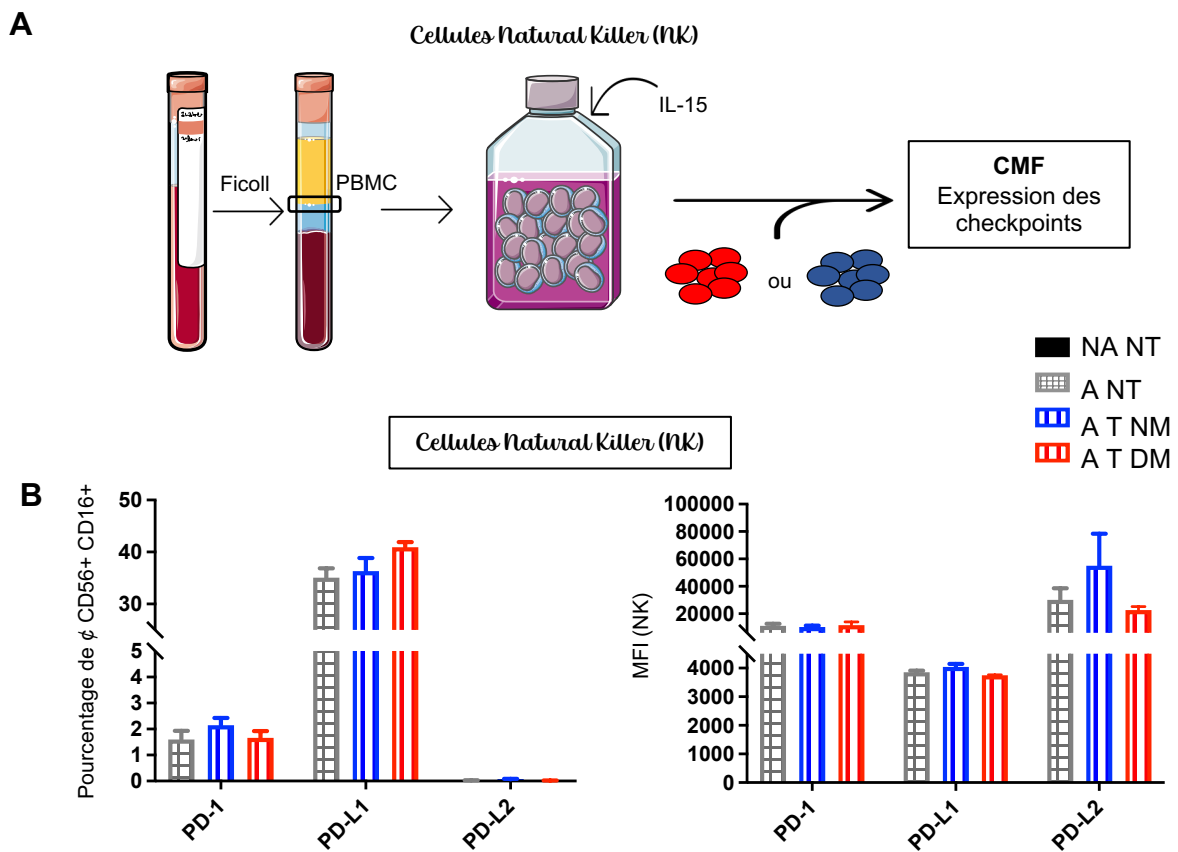


Figure 33 : Expression des checkpoints immuns par les cellules NK

Du sang d'individu sain a été récupéré et les PBMC isolés du reste des composants sanguins. À l'aide d'IL-15, les cellules NK ont été spécifiquement activées durant 48h puis ces cellules ont été mises au contact d'EVs provenant de cellules tumorales durant 48h supplémentaires (A). L'expression par les cellules NK des checkpoints immuns et de leurs MFI a été évaluée par CMF (B).

Les cellules NK testées n'expriment naturellement pas, ou très peu, la protéine PD-L2 et un traitement par des EVs tumoraux ne modifie pas cette expression. Les valeurs de MFI de PD-L2 sont donc données à titre indicatif puisque non analysables. En ce qui concerne PD-1, également peu exprimé naturellement, aucune différence notable en cas de traitement par des EVs provenant de cellules tumorales sur leur proportion ou leur MFI n'a pu être observée. Quant à PD-L1, son expression augmente en cas de contact avec des EVs de CSCs (+5% voir Annexe 3) et sa MFI semble légèrement décroître.

Les cellules SW480 expriment majoritairement la molécule PD-L1 quelle que soit la condition de culture (Figure 29) ; nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il est cohérent de ne pas observer de variations de PD-L1 dans les LT puisque le PD-L1 potentiellement présent sur les EVs ne pourra se lier qu'au PD-1 exprimé par ces cellules. Toutefois, l'expression de PD-L1 par les cellules NK fluctue suite au contact des EVs tumoraux. Concernant PD-L2 exprimé par les LT, l'augmentation de son expression suite au contact des EVs ne peut être expliquée de cette façon puisque les cellules SW480 l'expriment peu. Néanmoins, dans la mesure où nous ne connaissons pas l'expression des checkpoints par les EVs, nous ne pouvons rien affirmer. Il est possible que si PD-1 et PD-L2 sont si peu exprimées par les SW480, différenciées ou CSCs, c'est parce qu'elles se retrouvent sur les EVs que ces cellules

sécrètent afin de jouer un rôle de leurre auprès des cellules immunes. Il est également possible que les EVs transportent les transcrits codant ces protéines et qu'elles les échangent aux cellules immunitaires pour réguler à la hausse leur expression protéique afin de favoriser leur inhibition.

Les éléments à retenir de ces expériences sont :

- La quantité de LTreg semble légèrement diminuée suite au traitement des cellules par des EVs provenant de CSCs.
- Les LTc ne semblent pas impactés en nombre suite au contact avec des EVs tumoraux mais se trouvent plus nombreux à être activés tout en exprimant moins fortement à leur surface le marqueur d'activation CD69. De plus, ce contact entraîne une régulation à la hausse de l'expression de PD-1 et de PD-L2.
- La quantité de LTh est augmentée suite au traitement par les EVs et ces derniers semblent surexprimer PD-1 et PD-L2 suite à l'interaction avec les vésicules.
- Les cellules NK sont moins nombreuses mais plus actives après avoir rencontré les EVs, malgré un niveau individuel d'activation plus bas. De plus, elles vont réguler à la hausse PD-L1 suite à la rencontre avec des EVs provenant de CSCs.

Au vu de ces éléments préliminaires, il semblerait que des vésicules sécrétées par des cellules tumorales soient capables à elles seules de réguler le système immunitaire et d'entraîner une régulation positive de l'expression de checkpoints immuns. La présence plus faible des LTreg en cas de présence d'EVs peut contribuer à limiter l'inhibition des autres cellules immunitaires, ce qui tendrait plutôt vers un profil antitumoral. À l'inverse, l'expression plus accrue des checkpoints immuns peut mener à une plus grande sensibilité à l'inhibition de ces cellules immunitaires, ce qui favoriserait la tolérance immune et constituerait donc une stratégie pro-tumorale. Toutefois il faut garder à l'esprit que cette analyse n'a concerné qu'un individu sain et qu'il faudrait réaliser les mêmes expériences chez des patients atteints de CCR.

Discussion et conclusion

La discrimination des CSCs dans une masse tumorale hétérogène demeure un challenge depuis de nombreuses années. Elle nécessite des techniques variées basées sur l'expression de marqueurs spécifiques ainsi que le recours à des tests fonctionnels. Toutefois, les marqueurs utilisés peuvent aussi être exprimés par des cellules tumorales non-CSCs et sont souvent partagés avec les CS classiques (Hervieu *et al.* 2021). De plus, en raison de leurs caractéristiques plastique et hétérogène, l'utilisation de marqueurs de surface demeure problématique et peut créer un biais par la sélection d'une sous-population de CSCs (Hirata *et al.* 2019). Quant à l'étude des propriétés fonctionnelles, leur mise en œuvre peut nécessiter plusieurs semaines comme pour les tests de clonogénicité par exemple (Hervieu *et al.* 2022). L'utilisation du biocapteur dans le but de caractériser et discriminer les CSCs des cellules différenciées a confirmé sa pertinence dans le modèle du CCR en plus des modèles de tumeurs cérébrales. Les signatures électromagnétiques obtenues en UHF étant distinctes entre les deux phénotypes et constamment plus faibles concernant les CSCs (Manczak *et al.* 2019; Casciati *et al.* 2020; Lambert *et al.* 2021). Durant ces travaux, seule la DEP à UHF a été réalisée car précédemment, nous avons mis en évidence que l'utilisation de la DEP conventionnelle n'était pas pertinente pour ce type d'analyse. En effet, la DEP conventionnelle utilise des basses fréquences ne permettant pas au champ électrique de pénétrer la cellule mais seulement d'interagir avec la membrane plasmique. Dans ces conditions, la signature électromagnétique, nommée fx01, dépend des paramètres diélectriques de la membrane plasmique ainsi que de la morphologie de la cellule. Cette mesure effectuée sur un modèle de glioblastome, n'a pas permis de discriminer les CSCs des cellules différenciées. À l'inverse, la mesure à UHF nommée fx02, permettant de sonder le contenu intracellulaire par pénétration de l'onde électromagnétique, a mis en évidence des signatures distinctes (Lambert *et al.* 2021). Ces résultats suggèrent que l'utilisation des signatures électromagnétiques suppose de travailler à des fréquences de l'ordre du MHz afin de discriminer les populations d'intérêts dans ces modèles. Cette technique permet de caractériser les cellules sans aucun marquage préalable, de façon plus rapide et économique que les techniques de biologie couramment employées (Hervieu *et al.* 2021). Toutefois, son exécution est manuelle et les cellules sont interrogées individuellement. Une campagne de mesure permet l'analyse d'une cinquantaine de cellules en près de deux heures, l'automatisation de la technique augmenterait ce rendement afin d'obtenir une représentation plus fiable de l'échantillon. En outre, le développement d'un cytomètre basé sur ce procédé

permettrait de séparer les CSCs de la masse tumorale hétérogène tout en s'affranchissant des marqueurs controversés, utilisés par les techniques classiques de « cell sorting » (FACS, MACS ...) (Hervieu *et al.* 2021). Dans le CCR, la présence d'un fort taux de CSCs a été corrélé à un risque élevé de récurrences (Manhas *et al.* 2016). L'évaluation rapide et fiable de la proportion de CSCs au sein de la tumeur par le cytomètre DEP-UHF permettrait d'adapter la prise en charge thérapeutique de façon précoce. Par ailleurs, la séparation des cellules sur la base de leur signature électromagnétique favoriserait leur étude sans présélectionner une sous-population de CSCs puis une analyse de type « single-cell » mettrait en exergue leur hétérogénéité. Durant ces travaux, un cytomètre basé sur la DEP-UHF a été développé et testé sur des cellules issues de lignées de cancer colorectal. Une publication produite sur ces résultats a été soumise au journal *IEEE J-ERM* (IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology) en septembre 2022. D'autres techniques « label-free » existent afin de séparer des populations cellulaires hétérogènes. C'est le cas de la SdFFF (Sedimentation Field-Flow Fractionation), développée au sein du laboratoire CAPTuR depuis de nombreuses années. La SdFFF s'appuie également sur des propriétés biophysiques des cellules, différentes de la DEP, puisqu'elle est principalement basée sur leur taille et leur densité. Au fil des années, la SdFFF a démontré sa pertinence dans la séparation de cellules tumorales de divers cancers sans nécessiter de marquage préalable (Mélin *et al.* 2012; Lacroix *et al.* 2019; Saydé *et al.* 2021; Hervieu *et al.* 2022). Toutefois, cette technique présente plusieurs limites. Une quantité précise de cellules est nécessaire et plusieurs passages dans la machine peuvent être requis pour obtenir un nombre de cellules triées suffisant. La plus-value d'un cytomètre à DEP-UHF, par rapport à cette technique de chromatographie, est que la quantité de cellules importe peu permettant leur séparation en une seule campagne. L'analyse DEP-UHF est aussi plus spécifique car elle s'appuie sur des propriétés biophysiques des cellules autres que la taille et la densité. Cependant, l'utilisation de la SdFFF constitue un atout majeur pour le développement du cytomètre DEP-UHF. En effet, l'utilisation de populations plus homogènes, préalablement triées par SdFFF, permettra un réglage plus rapide des conditions expérimentales pour la mise au point du cytomètre.

Le biocapteur a permis la discrimination de cellules de phénotypes distincts, nous avons donc voulu évaluer sa pertinence quant à la détection de changements opérés par un traitement à base d'EVs. En effet, le matériel biologique transféré par des EVs peut être associé à un transfert d'agressivité entre les cellules tumorales et les cellules composant le MET (III.4.2) ; mais aussi entre les cellules tumorales elles-mêmes, comme précédemment

démontré dans le laboratoire dans un modèle de glioblastome (Pinet *et al.* 2016). Ces traitements ont été réalisés entre des cellules tumorales de CCR provenant de lignées cellulaires mais également de cultures primaires de patients. Les lignées cellulaires choisies proviennent d'un même individu et permettent de travailler sur le même fond génétique et immunitaire. Elles dérivent de stades différents, l'une de la tumeur primaire (SW480) et l'autre des ganglions lymphatiques régionaux (SW620). Les EVs sécrétées par la lignée SW620, cultivée en milieu normal ou défini, ont été utilisées pour traiter la lignée SW480. Les résultats des analyses biologiques réalisées démontrent un transfert d'agressivité médié par les EVs quelle que soit leur cellule d'origine (CSC ou cellule différenciée), mais cette origine semble affecter différemment les cellules cibles. Ce constat est similaire concernant l'analyse de la signature électromagnétique des cellules traitées. En effet, la signature des SW480 traitées avec des EVs de cellules différenciées n'a pas évolué tandis que leur taux de prolifération, leur capacité à envahir et leur activité métabolique suite à un traitement chimiothérapeutique ont augmenté. Les SW480 traitées avec des EVs provenant de CSCs présentent une signature électromagnétique significativement plus faible que les cellules non traitées ; une surexpression de marqueurs souche ainsi qu'une capacité d'invasion et une résistance chimiothérapeutique renforcées. Ces éléments démontrent que la modification de la signature électromagnétique des cellules traitées ne peut être corrélée à l'évolution de l'activité métabolique ou à la capacité à envahir. Effectivement, ces éléments ont été modifiés par les deux types d'EVs utilisés sans que la signature électromagnétique n'évolue concernant les cellules traitées par des EVs de cellules différenciées. Malgré tout, ces cellules sont issues de lignées établies il y a plusieurs dizaines d'années et nous avons donc élargi notre étude à des modèles précliniques de cultures primaires de patients, fournies par Julie Pannequin (IGF, Montpellier). Dans un premier temps, nous avons utilisé deux CPP différentes et présentant des stades différents. Sur le même modèle que les lignées cellulaires, la CPP14 (stade précoce) a été traitée avec des EVs de la CPP6 (stade avancé), cultivée en milieu normal ou défini (cellules différenciées ou CSCs). Seules quelques-unes des techniques biologiques testées sur les lignées cellulaires ont été conservées pour cette expérience. Contrairement aux résultats précédents, les deux types d'EVs ont fait évoluer la signature électromagnétique des cellules cibles de façon équivalente, plus élevée que celle des CPP14 non traitées. Au niveau biologique, les CPP14 traitées avec des EVs provenant de cellules différenciées n'ont pas démontré de modification de comportement tandis que celles traitées avec des EVs de CSCs ont surexprimé quelques marqueurs souche. Il semblerait ici que la mesure de la signature électromagnétique ait permis de mettre en évidence un changement d'état que les techniques

de biologie utilisées n'ont pas illustré. Toutefois, le choix de ces dernières s'est basé sur les résultats obtenus pour les lignées. Il est donc possible qu'il ne s'agisse pas des expériences les plus pertinentes à réaliser dans ce cas précis. Ceci ne signifie nullement qu'aucun changement biologique n'a eu lieu dans les cellules suite au contact des EVs, une analyse de type RNAseq permettrait de répondre à cette question. De plus, nous avons choisi d'utiliser des CPP différentes, engendrant quelques difficultés : elles ne présentent pas le même fond génétique et n'évoluent pas dans le même MET. Pour remédier à cela, il faudrait détenir des cellules issues du même patient à des localisations tumorales différentes, comme pour les lignées. Nous avons donc décidé d'utiliser la CPP6 que nous avons traité avec des EVs provenant de cette même CPP mais cultivée en milieu défini. Cette expérience n'a démontré aucun changement biologique suite à l'application sur les cellules d'EVs provenant de CSCs. Par contre, la signature électromagnétique de ces cellules a diminué. Ces résultats semblent conforter la théorie précédente selon laquelle le biocapteur permettrait de mettre en évidence un changement d'état parfois difficile à percevoir par les approches biologiques choisies. Pour vérifier cette hypothèse, d'autres techniques biologiques sont à réaliser mais pour le moment il est impossible de déterminer quel changement d'état est détecté par le biocapteur. La mesure de la signature à UHF permet de sonder le contenu intracellulaire et divers éléments peuvent influencer sur sa valeur tels que sa permittivité et sa conductivité. Ces éléments pouvant être influencés principalement par le rapport nucléo-cytoplasmique mais aussi la présence de certaines protéines, la quantité d'organites etc. Suite au contact et/ou à l'internalisation des EVs par les cellules cibles, il est certain que des remaniements cellulaires ont lieu afin de traiter les éléments qu'ils contiennent et d'en éliminer d'autres. Les ARNm importés peuvent être traduits en protéines, les miRNAs peuvent aller réguler les ARNm endogènes ... Tous ces éléments apportés par les EVs peuvent influencer sur la machinerie cellulaire et donc sur les propriétés diélectriques faisant ainsi varier la signature électromagnétique de la cellule. Contrairement à certains événements biologiques pouvant être séquentiels et donc temporaires tels que la régulation des gènes où sur une courte durée, l'ARNm sera surexprimé avant d'être traduit en protéine puis une fois la régulation terminée, son expression reviendra à sa valeur initiale ; la modification de la signature électromagnétique semble pérenne. Des expériences de mesure de la signature électromagnétique des cellules traitées près d'une semaine après contact avec les EVs (résultats non présentés) ont démontré que sa valeur correspondait à celle obtenue seulement trois jours après traitement. Ceci signifie qu'après traitement des informations contenues dans les EVs, les cellules ont conservé les propriétés diélectriques en découlant. Un élément remarquable de ces résultats réside dans le sens d'évolution des

signatures électromagnétiques après traitement par des EVs. Les SW480 traitées par des EVs de CSCs voient leur signature diminuée, tout comme les CPP6 traitées par des EVs de CSCs. En revanche, les CPP14 traitées par des EVs, de CSCs ou de cellules différenciées, voient leur signature augmenter quel que soit le type d'EVs. Cette disparité peut s'expliquer par la problématique évoquée précédemment de l'utilisation de CPP provenant de deux individus différents. Les caractéristiques génétiques des cellules ainsi que l'environnement dans lequel elles évoluent contribuent au contenu des EVs qu'elles sécrètent et ce contenu peut exercer une influence supplémentaire sur les cellules cibles. Il est possible que le traitement de ces informations additionnelles par les CPP14 entraîne des remaniements cellulaires conséquents faisant varier la signature électromagnétique à la hausse.

Ces expériences ont été réalisées dans l'objectif de prouver qu'un transfert d'agressivité entre cellules tumorales par la sécrétion d'EVs était détectable par un changement de la signature électromagnétique des cellules. Ces transferts mettent en évidence une coopération entre les cellules cancéreuses, les CSCs allant modifier les cellules différenciées afin de favoriser la progression tumorale. Néanmoins, il serait intéressant de réaliser l'expérience inverse par le traitement de CSCs à l'aide d'EVs provenant de cellules différenciées pour déterminer si cet échange limiterait leur agressivité. Dans cette optique, l'utilisation d'EVs provenant de cellules normales différenciées pourrait être une thérapie envisagée pour limiter la croissance tumorale.

Une seconde facette de mon projet a été d'évaluer l'influence des EVs dérivées de cellules cancéreuses sur les cellules immunitaires. Tout d'abord, les expériences effectuées dans le cadre de ce projet étant préliminaires et n'ayant concerné qu'un seul individu sain, il serait nécessaire de réaliser les mêmes expériences sur davantage d'individus sains mais également sur des patients atteints d'un CCR. Les études mettant en exergue le rôle prépondérant des EVs dérivées des cellules cancéreuses sur la progression tumorale par immunomodulation sont nombreuses (Lafitte, Lecointre, et Roche 2019; Mannavola *et al.* 2019; Yamada *et al.* 2016; Popēna *et al.* 2018). Durant ces travaux, nous nous sommes particulièrement intéressées au potentiel effet inhibiteur des EVs sur les cellules cytotoxiques. Ceci pouvant se traduire par une diminution de la proportion de ces cellules mais aussi par une régulation positive des checkpoints immuns. L'un des biais techniques que nous devons assumer dans nos expériences étant que l'étape d'activation cellulaire a été réalisée sur l'ensemble des PBMC récoltés. De possibles interactions intercellulaires ont alors pu avoir

lieu, tout comme durant l'étape de traitement par les EVs, réalisée sur l'ensemble des PBMC post-activation. Il serait intéressant de réaliser ces mêmes expériences sur des cellules préalablement isolées, idéalement par tri négatif, afin de s'affranchir de potentiels effets indésirables. De plus, nous avons souvent observé des variations allant de 2 à 5%, ce qui peut sembler faible pour induire des changements majeurs au sein de l'immunité. Toutefois, 2%, rapporté au nombre colossal de lymphocytes T circulant naturellement dans le sang périphérique, correspond à plus d'une centaine de millions d'entités, rendant cette fluctuation non négligeable. L'effet potentiel des EVs tumoraux sur l'induction de la mort des cellules immunes n'a pas non plus été exploré. Nous avons mesuré la proportion de cellules suite au traitement mais nous n'avons pas évalué l'effet d'un potentiel déclenchement de l'apoptose au niveau de celles-ci ; évènement précédemment démontré concernant les LTc *via* l'activation de récepteurs de mort par les EVs (Muller *et al.* 2016; Bae, Brumbaugh, et Bonavida 2018). Concernant l'activation des cellules, traduit par l'expression du CD69, nous n'avons pas déterminé son expression par les LTh (notamment les LTreg) traités avec des EVs alors qu'il s'agit de cellules régulatrices importantes. De plus, une équipe ayant réalisé une étude similaire, a démontré que des EVs sécrétées par des cellules tumorales (hors CCR) entraînaient l'inhibition de l'expression du CD69 par des LTh provenant d'individus sains (Muller *et al.* 2016). Cette même équipe a également mis en évidence une augmentation de la proportion de LTreg suite au traitement par des EVs tumoraux tandis que nous observons l'inverse. Toutefois, ils se sont intéressés à une faible sous-population de LTreg ($\approx 5\%$) exprimant le CD39 et ont eu recours à des EVs provenant d'un autre type tumoral que le CCR (Carcinome épidermoïde de la tête et du cou) (Muller *et al.* 2016). Nous avons évalué le niveau d'activation des cellules (LTc et NK) mais pas l'efficacité de leur activité cytotoxique suite au traitement avec les EVs alors qu'il a été démontré que cette activité était affaiblie concernant des NK suite à un contact avec des EVs tumoraux (Vautrot *et al.* 2021).

Ensuite, le contenu des vésicules extracellulaires concernant les checkpoints immuns doit être examiné. Cet élément donnerait une indication sur le mécanisme d'interaction entre les EVs et les cellules immunes, est-ce par une reconnaissance ligand – récepteur ou *via* une internalisation ? Toutefois, il a été démontré que les LT n'internalisaient pas les EVs, même après 72h de traitement, contrairement aux lymphocytes B ou aux monocytes (Muller *et al.* 2016). Ceci limite donc les effets des EVs sur les LT à une interaction physique entre protéines de surface mais est-ce aussi le cas des cellules NK ? Malgré cela, est-ce l'interaction entre des checkpoints exprimés à la surface des EVs qui entraîne les modifications observées

ou s'agit-il d'autres molécules ? Pour répondre à cette question, après avoir eu connaissance du contenu des EVs en checkpoints immuns, limiter l'expression des molécules par les cellules émettrices permettrait de déterminer si ces modifications sont maintenues. Pour poursuivre sur la question des EVs, est-ce que les effets obtenus sont dû au fait qu'il s'agisse d'EVs provenant de cellules tumorales ou bien au fait qu'il s'agisse d'EVs sécrétées par une lignée cellulaire ? En effet, le système immunitaire a pour rôle de reconnaître les éléments étrangers et/ou pathogènes. Or dans notre cas, les EVs que nous avons utilisé proviennent d'une lignée cellulaire et seront donc reconnus comme étant du « non soi » par les cellules immunitaires de l'individu sain. Il est alors possible que les effets observés soient la conséquence du caractère étranger des EVs tumoraux, exprimant les molécules du CMH (Mammes *et al.* 2021), et non au potentiel caractère inhibiteur des checkpoints immuns. Il serait donc intéressant de réaliser l'ensemble de ces expériences avec des EVs provenant d'un autre type cellulaire, appartenant toujours au « non soi » mais non tumoral. Concernant l'expression des checkpoints immuns par les cellules immunitaires, il est nécessaire d'évaluer celle des LTreg car il s'agit de la sous-population responsable de la tolérance immune. Il semble donc primordial de déterminer les effets des EVs tumoraux sur l'expression des checkpoints au niveau de ces cellules puisque leur surexpression pourrait favoriser l'inhibition de leurs consœurs effectrices (LTc, NK).

Un des problèmes majeurs rencontrés lors de l'analyse de l'expression des checkpoints immuns et de leur possible activation, est l'existence de multiples reconnaissances ligand / récepteur. En effet, il se trouve que PD-L1 n'est pas seulement le ligand naturel de PD-1 mais qu'il peut également fixer la molécule CD80 (également nommée B7.1). La protéine CD80 va naturellement se lier au récepteur CTLA-4, pendant inhibiteur de la molécule de co-activation CD28 nécessaire à l'activation des LT. Non seulement PD-L1 peut lier le CD80 mais il a également été mis en évidence qu'une interaction de ces entités pouvait se produire en *cis*, c'est-à-dire à la surface de la même cellule (Boussiotis 2016; Sugiura *et al.* 2019). Il paraît alors plausible qu'une cellule soit capable de s'auto-inhiber par l'expression concomitante de PD-L1 et du CD80. La mesure de l'expression du CD80 par les cellules immunitaires suite au contact avec des EVs pourrait renseigner partiellement sur ce phénomène, tout comme la recherche de sa présence à la surface des EVs.

Enfin, nous nous sommes ici intéressées à déceler de potentiels effets divergents des EVs en fonction de la cellule tumorale d'origine, qu'elle présente un phénotype différencié ou un phénotype souche. Il serait également intéressant de réaliser cette étude à partir de cellules

tumorales à des stades bien distincts (I et IV) dans le but de déterminer si les effets des EVs diffèrent en fonction du stade cellulaire d'origine. Des cellules cancéreuses ayant formé des métastases ne présentent pas les mêmes propriétés et ne font pas face aux mêmes obstacles que des cellules à un stade précoce afin de protéger la tumeur.

Pour conclure, mes travaux de thèse ont porté sur l'impact de la sécrétion de vésicules extracellulaires sur des cellules composant le microenvironnement tumoral. Dans un premier temps, l'utilisation du biocapteur basé sur la technique de DEP-UHF a permis de discriminer les CSCs des cellules différenciées dans un modèle de CCR. Son utilisation, ne nécessitant aucun marquage, permet de s'affranchir de marqueurs peu spécifiques et de réduire considérablement la durée d'analyse. Ensuite, l'étude de la coopération entre les cellules tumorales par le transfert d'EVs a démontré que ce biocapteur détectait des changements d'état induits par les vésicules. Ces modifications se sont traduites par une variation de la signature électromagnétique des cellules traitées, parfois même lorsque les techniques de biologie utilisées n'indiquaient aucune variation. Ces éléments démontrent la pertinence de cette technique pour un potentiel suivi des patients pouvant permettre la détection précoce des CSCs dans le but d'adapter la prise en charge thérapeutique et de limiter les récives. De plus, la mise au point d'un cytomètre basé sur la DEP à UHF permettrait de déterminer la proportion de CSCs au sein de la masse tumorale et ainsi de percevoir le degré d'agressivité de la tumeur. Cette technologie favoriserait également l'analyse des caractéristiques des CSCs suite à leur isolement, en s'affranchissant des marqueurs utilisés actuellement et en prenant en compte l'hétérogénéité de cette population. Une meilleure compréhension des propriétés de ces cellules permettrait également de personnaliser les thérapies.

Dans un second temps, l'étude de l'impact des sécrétions vésiculaires de cellules tumorales sur le profil des cellules immunitaires a été exploré. Ces résultats sont préliminaires et nécessitent d'être approfondis mais il semblerait que les EVs sécrétées par des cellules tumorales favorisent l'expansion des LTh ainsi que l'inhibition des cellules NK. De plus, les EVs semblent entraîner la régulation positive de PD-1 et PD-L1 par les NK ainsi que de PD-1 et PD-L2 par les LT (LTh et LTc), traduisant une susceptibilité accrue à l'activation de ces molécules pouvant mener à leur tolérance.

Références bibliographiques

- Abels, Erik R., et Xandra O. Breakefield. 2016. « Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 36 (3): 301-12. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>.
- Ahmadi, Mahdi, Reza Jafari, Monireh Mahmoodi, et Jafar Rezaie. 2021. « The Tumorigenic and Therapeutic Functions of Exosomes in Colorectal Cancer: Opportunity and Challenges ». *Cell Biochemistry and Function* 39 (4): 468-77. <https://doi.org/10.1002/cbf.3622>.
- Angell, Helen K., Daniela Bruni, J. Carl Barrett, Ronald Herbst, et Jérôme Galon. 2020. « The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 26 (2): 332-39. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1851>.
- Arends, Mark J. 2013. « Pathways of Colorectal Carcinogenesis ». *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM* 21 (2): 97-102. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31827ea79e>.
- Bae, Susan, Jeffrey Brumbaugh, et Benjamin Bonavida. 2018. « Exosomes Derived from Cancerous and Non-Cancerous Cells Regulate the Anti-Tumor Response in the Tumor Microenvironment ». *Genes & Cancer* 9 (3-4): 87-100. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.172>.
- Barker, Nick. 2014. « Adult Intestinal Stem Cells: Critical Drivers of Epithelial Homeostasis and Regeneration ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (1): 19-33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>.
- Barresi, Valeria, Luca Reggiani Bonetti, Antonio Ieni, Rosario Alberto Caruso, et Giovanni Tuccari. 2015. « Histological Grading in Colorectal Cancer: New Insights and Perspectives ». *Histology and Histopathology* 30 (9): 1059-67. <https://doi.org/10.14670/HH-11-633>.
- Benson, Al B., Alan P. Venook, Mahmoud M. Al-Hawary, Lynette Cederquist, Yi-Jen Chen, Kristen K. Ciombor, Stacey Cohen, et al. 2018. « NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018 ». *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 16 (4): 359-69. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0021>.
- Bonnet, D., et J. E. Dick. 1997. « Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell ». *Nature Medicine* 3 (7): 730-37. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>.
- Bormann, Felix, Manuel Rodríguez-Paredes, Felix Lasitschka, Dominic Edelmann, Tanja Musch, Axel Benner, Yehudit Bergman, et al. 2018. « Cell-of-Origin DNA Methylation Signatures Are Maintained during Colorectal Carcinogenesis ». *Cell Reports* 23 (11): 3407-18. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.045>.

Bounaix Morand du Puch, Christophe, Michelle Nouaille, Stéphanie Giraud, Anaïs Labrunie, Sandrine Luce, Pierre-Marie Preux, François Labrousse, et al. 2016. « Chemotherapy Outcome Predictive Effectiveness by the Oncogramme: Pilot Trial on Stage-IV Colorectal Cancer ». *Journal of Translational Medicine* 14 (janvier): 10. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0765-4>.

Boussiotis, Vassiliki A. 2016. « Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway ». *The New England Journal of Medicine* 375 (18): 1767-78. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514296>.

Breakstone, Rimini. 2021. « Colon Cancer and Immunotherapy-Can We Go beyond Microsatellite Instability? » *Translational Gastroenterology and Hepatology* 6: 12. <https://doi.org/10.21037/tgh.2020.03.08>.

Brierley, James D., Mary K. Gospodarowicz, et Christian Wittekind. 2017. *TNM Classification of Malignant Tumours*. John Wiley & Sons.

Cabrera, Marina Carla, Robert E. Hollingsworth, et Elaine M. Hurt. 2015. « Cancer Stem Cell Plasticity and Tumor Hierarchy ». *World Journal of Stem Cells* 7 (1): 27-36. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i1.27>.

Casciati, Arianna, Mirella Tanori, Rémi Manczak, Sofiane Saada, Barbara Tanno, Paola Giardullo, Elena Porcù, et al. 2020. « Human Medulloblastoma Cell Lines: Investigating on Cancer Stem Cell-Like Phenotype ». *Cancers* 12 (1): E226. <https://doi.org/10.3390/cancers12010226>.

Cheng, H., et C. P. Leblond. 1974. « Origin, Differentiation and Renewal of the Four Main Epithelial Cell Types in the Mouse Small Intestine. V. Unitarian Theory of the Origin of the Four Epithelial Cell Types ». *The American Journal of Anatomy* 141 (4): 537-61. <https://doi.org/10.1002/aja.1001410407>.

Cheng, Yiwen, Zongxin Ling, et Lanjuan Li. 2020. « The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer ». *Frontiers in Immunology* 11: 615056. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615056>.

Ciardiello, Fortunato, Davide Ciardiello, Giulia Martini, Stefania Napolitano, Josep Tabernero, et Andres Cervantes. 2022. « Clinical Management of Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Precision Medicine ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 72 (4): 372-401. <https://doi.org/10.3322/caac.21728>.

Coker, Olabisi Oluwabukola, Geicho Nakatsu, Rudin Zhenwei Dai, William Ka Kei Wu, Sunny Hei Wong, Siew Chien Ng, Francis Ka Leung Chan, Joseph Jao Yiu Sung, et Jun Yu. 2019. « Enteric Fungal Microbiota Dysbiosis and Ecological Alterations in Colorectal Cancer ». *Gut* 68 (4): 654-62. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317178>.

Coumans, Frank A. W., Alain R. Brisson, Edit I. Buzas, Françoise Dignat-George, Esther E. E. Drees, Samir El-Andaloussi, Costanza Emanuelli, et al. 2017. « Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles ». *Circulation Research* 120 (10): 1632-48. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417>.

De Palma, Fatima Domenica Elisa, Valeria D'Argenio, Jonathan Pol, Guido Kroemer, Maria Chiara Maiuri, et Francesco Salvatore. 2019. « The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer ». *Cancers* 11 (7): E1017. <https://doi.org/10.3390/cancers11071017>.

Dekker, Evelien, Pieter J. Tanis, Jasper L. A. Vleugels, Pashtoon M. Kasi, et Michael B. Wallace. 2019. « Colorectal Cancer ». *Lancet (London, England)* 394 (10207): 1467-80. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0).

Dienstmann, Rodrigo, Louis Vermeulen, Justin Guinney, Scott Kopetz, Sabine Tejpar, et Josep Taberero. 2017. « Consensus Molecular Subtypes and the Evolution of Precision Medicine in Colorectal Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 17 (2): 79-92. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.126>.

Fang, Tian, Tingting Liang, Yizhuo Wang, Haitao Wu, Shuhan Liu, Linying Xie, Jiaying Liang, Chang Wang, et Yehui Tan. 2021. « Prognostic Role and Clinicopathological Features of SMAD4 Gene Mutation in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *BMC Gastroenterology* 21 (1): 297. <https://doi.org/10.1186/s12876-021-01864-9>.

Fearon, E. R., et B. Vogelstein. 1990. « A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis ». *Cell* 61 (5): 759-67. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i).

Frank, Markus H., Brian J. Wilson, Jason S. Gold, et Natasha Y. Frank. 2021. « Clinical Implications of Colorectal Cancer Stem Cells in the Age of Single-Cell Omics and Targeted Therapies ». *Gastroenterology* 160 (6): 1947-60. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.12.080>.

Gehart, Helmuth, et Hans Clevers. 2019. « Tales from the Crypt: New Insights into Intestinal Stem Cells ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16 (1): 19-34. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>.

Gonzalez-Villarreal, Carlos A., Adriana G. Quiroz-Reyes, Jose F. Islas, et Elsa N. Garza-Treviño. 2020. « Colorectal Cancer Stem Cells in the Progression to Liver Metastasis ». *Frontiers in Oncology* 10: 1511. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01511>.

Greenwood-Van Meerveld, Beverley, Anthony C. Johnson, et David Grundy. 2017. « Gastrointestinal Physiology and Function ». *Handbook of Experimental Pharmacology* 239: 1-16. https://doi.org/10.1007/164_2016_118.

Guinney, Justin, Rodrigo Dienstmann, Xin Wang, Aurélien de Reyniès, Andreas Schlicker, Charlotte Sonesson, Laetitia Marisa, et al. 2015. « The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer ». *Nature Medicine* 21 (11): 1350-56. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.

Gurunathan, Sangiliyandi, Min-Hee Kang, et Jin-Hoi Kim. 2021. « A Comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes ». *International Journal of Nanomedicine* 16: 1281-1312. <https://doi.org/10.2147/IJN.S291956>.

Hanahan, Douglas. 2022. « Hallmarks of Cancer: New Dimensions ». *Cancer Discovery* 12 (1): 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

- Harada, Shuko, et Diana Morlote. 2020. « Molecular Pathology of Colorectal Cancer ». *Advances in Anatomic Pathology* 27 (1): 20-26. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000247>.
- Hervieu, Céline, Niki Christou, Serge Battu, et Muriel Mathonnet. 2021. « The Role of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: From the Basics to Novel Clinical Trials ». *Cancers* 13 (5): 1092. <https://doi.org/10.3390/cancers13051092>.
- Hervieu, Céline, Mireille Verdier, Elodie Barthout, Gaëlle Bégaud, Niki Christou, Magali Sage, Julie Pannequin, Serge Battu, et Muriel Mathonnet. 2022. « A Label-Free Cell Sorting Approach to Highlight the Impact of Intratumoral Cellular Heterogeneity and Cancer Stem Cells on Response to Therapies ». *Cells* 11 (15): 2264. <https://doi.org/10.3390/cells11152264>.
- Hirata, Akihiro, Yuichiro Hatano, Masayuki Niwa, Akira Hara, et Hiroyuki Tomita. 2019. « Heterogeneity of Colon Cancer Stem Cells ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1139: 115-26. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_7.
- Huels, D. J., et O. J. Sansom. 2015. « Stem vs Non-Stem Cell Origin of Colorectal Cancer ». *British Journal of Cancer* 113 (1): 1-5. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.214>.
- Jahanafrooz, Zohreh, Jaffar Mosafer, Morteza Akbari, Mahmoud Hashemzaei, Ahad Mokhtarzadeh, et Behzad Baradaran. 2020. « Colon Cancer Therapy by Focusing on Colon Cancer Stem Cells and Their Tumor Microenvironment ». *Journal of Cellular Physiology* 235 (5): 4153-66. <https://doi.org/10.1002/jcp.29337>.
- Jass, J. R. 2007. « Classification of Colorectal Cancer Based on Correlation of Clinical, Morphological and Molecular Features ». *Histopathology* 50 (1): 113-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x>.
- Jobin, Christian. 2013. « Colorectal Cancer: Looking for Answers in the Microbiota ». *Cancer Discovery* 3 (4): 384-87. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0042>.
- Kanth, Priyanka, et John M. Inadomi. 2021. « Screening and Prevention of Colorectal Cancer ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 374 (septembre): n1855. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1855>.
- Kong, Dejuan, Yiwei Li, Zhiwei Wang, et Fazlul H. Sarkar. 2011. « Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? ». *Cancers* 3 (1): 716-29. <https://doi.org/10.3390/cancers30100716>.
- Kong, Shanshan, Yanhui H. Zhang, et Weiqiang Zhang. 2018. « Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids ». *BioMed Research International* 2018 (mai): 2819154. <https://doi.org/10.1155/2018/2819154>.
- Lacroix, Aurélie, Elise Deluche, Ling Yan Zhang, Claire Dalmay, Carole Mélin, Jonathan Leroy, Meissa Babay, et al. 2019. « A New Label-Free Approach to Glioblastoma Cancer Stem Cell Sorting and Detection ». *Analytical Chemistry* 91 (14): 8948-57. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00913>.

Lafitte, Marie, Céline Lecointre, et Serge Roche. 2019. « Roles of Exosomes in Metastatic Colorectal Cancer ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 317 (5): C869-80. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00218.2019>.

Lambert, Elisa, Rémi Manczak, Elodie Barthout, Sofiane Saada, Elena Porcù, Francesca Maule, Barbara Bessette, et al. 2021. « Microfluidic Lab-on-a-Chip Based on UHF-Dielectrophoresis for Stemness Phenotype Characterization and Discrimination among Glioblastoma Cells ». *Biosensors* 11 (10): 388. <https://doi.org/10.3390/bios11100388>.

Lathia, Justin D., et Huiping Liu. 2017. « Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists ». *Targeted Oncology* 12 (4): 387-99. <https://doi.org/10.1007/s11523-017-0508-3>.

Ma, Yu-Shui, Wen Li, Yu Liu, Yi Shi, Qin-Lu Lin, et Da Fu. 2020. « Targeting Colorectal Cancer Stem Cells as an Effective Treatment for Colorectal Cancer ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 19 (décembre): 1533033819892261. <https://doi.org/10.1177/1533033819892261>.

Mammes, Aurelien, Jennifer Pasquier, Olivier Mammes, Marc Conti, Richard Douard, et Sylvain Loric. 2021. « Extracellular Vesicles: General Features and Usefulness in Diagnosis and Therapeutic Management of Colorectal Cancer ». *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 13 (11): 1561-98. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v13.i11.1561>.

Manczak, Rémi, Sofiane Saada, Thomas Provent, Claire Dalmay, Barbara Bessette, Gaëlle Bégau, Serge Battu, et al. 2019. « UHF-Dielectrophoresis Crossover Frequency as a New Marker for Discrimination of Glioblastoma Undifferentiated Cells ». *IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology* 3 (3): 191-98. <https://doi.org/10.1109/jerm.2019.2895539>.

Manhas, J., A. Bhattacharya, S. K. Agrawal, B. Gupta, P. Das, S. V. S. Deo, S. Pal, et S. Sen. 2016. « Characterization of Cancer Stem Cells from Different Grades of Human Colorectal Cancer ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (10): 14069-81. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5232-6>.

Mannavola, Francesco, Tina Salerno, Anna Passarelli, Marco Tucci, Valeria Internò, et Francesco Silvestris. 2019. « Revisiting the Role of Exosomes in Colorectal Cancer: Where Are We Now? ». *Frontiers in Oncology* 9: 521. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00521>.

Mashouri, Ladan, Hassan Yousefi, Amir Reza Aref, Ali Mohammad Ahadi, Fatemeh Molaei, et Suresh K. Alahari. 2019. « Exosomes: Composition, Biogenesis, and Mechanisms in Cancer Metastasis and Drug Resistance ». *Molecular Cancer* 18 (1): 75. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0991-5>.

Mathivanan, Suresh, Hong Ji, et Richard J. Simpson. 2010. « Exosomes: Extracellular Organelles Important in Intercellular Communication ». *Journal of Proteomics* 73 (10): 1907-20. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>.

- Mélin, Carole, Aurélie Perraud, Hussein Akil, Marie-Odile Jauberteau, Philippe Cardot, Muriel Mathonnet, et Serge Battu. 2012. « Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation ». *Analytical Chemistry* 84 (3): 1549-56. <https://doi.org/10.1021/ac202797z>.
- Mori, Giorgia, et Maria Rosalia Pasca. 2021. « Gut Microbial Signatures in Sporadic and Hereditary Colorectal Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (3): 1312. <https://doi.org/10.3390/ijms22031312>.
- Muller, Laurent, Masato Mitsuhashi, Patricia Simms, William E. Gooding, et Theresa L. Whiteside. 2016. « Tumor-Derived Exosomes Regulate Expression of Immune Function-Related Genes in Human T Cell Subsets ». *Scientific Reports* 6 (février): 20254. <https://doi.org/10.1038/srep20254>.
- Munro, Matthew J., Susrutha K. Wickremesekera, Lifeng Peng, Swee T. Tan, et Tinte Itinteang. 2018. « Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: A Review ». *Journal of Clinical Pathology* 71 (2): 110-16. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204739>.
- Nakatsu, Geicho, Xiangchun Li, Haokui Zhou, Jianqiu Sheng, Sunny Hei Wong, William Ka Kai Wu, Siew Chien Ng, et al. 2015. « Gut Mucosal Microbiome across Stages of Colorectal Carcinogenesis ». *Nature Communications* 6 (1): 8727. <https://doi.org/10.1038/ncomms9727>.
- Namee, Niamh Mc, et Lorraine O'Driscoll. 2018. « Extracellular Vesicles and Anti-Cancer Drug Resistance ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* 1870 (2): 123-36. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.07.003>.
- Nassar, Dany, et Cédric Blanpain. 2016. « Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications ». *Annual Review of Pathology* 11 (mai): 47-76. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044438>.
- Nguyen, Long H., Ajay Goel, et Daniel C. Chung. 2020. « Pathways of Colorectal Carcinogenesis ». *Gastroenterology* 158 (2): 291-302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>.
- Oliveira, André F., Luís Bretes, et Irene Furtado. 2019. « Review of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Metastatic DMMR/MSI-H Colorectal Cancer ». *Frontiers in Oncology* 9: 396. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00396>.
- Parizadeh, Seyed Mostafa, Reza Jafarzadeh-Esfehani, Seyed Mahdi Hassanian, Seyed Mohammad Reza Parizadeh, Samaneh Vojdani, Maryam Ghandehari, Anahita Ghazaghi, et al. 2019. « Targeting Cancer Stem Cells as Therapeutic Approach in the Treatment of Colorectal Cancer ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 110 (mai): 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.02.010>.
- Patsalias, Athanasios, et Zuzana Kozovska. 2021. « Personalized Medicine: Stem Cells in Colorectal Cancer Treatment ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 141 (septembre): 111821. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111821>.

Pinet, Sandra, Barbara Bessette, Nicolas Vedrenne, Aurélie Lacroix, Laurence Richard, Marie-Odile Jauberteau, Serge Battu, et Fabrice Lalloué. 2016. « TrkB-Containing Exosomes Promote the Transfer of Glioblastoma Aggressiveness to YKL-40-Inactivated Glioblastoma Cells ». *Oncotarget* 7 (31): 50349-64. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10387>.

Popēna, Ineta, Artūrs Ābols, Līga Saulīte, Kārlis Pleiko, Elīna Zandberga, Kaspars Jēkabsons, Edgars Endzeliņš, Alicia Llorente, Aija Linē, et Una Riekstiņa. 2018. « Effect of Colorectal Cancer-Derived Extracellular Vesicles on the Immunophenotype and Cytokine Secretion Profile of Monocytes and Macrophages ». *Cell Communication and Signaling: CCS* 16 (1): 17. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0229-y>.

Potten, C. S., W. J. Hume, P. Reid, et J. Cairns. 1978. « The Segregation of DNA in Epithelial Stem Cells ». *Cell* 15 (3): 899-906. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90274-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90274-x).

Prasetyanti, Pramudita R., et Jan Paul Medema. 2017. « Intra-Tumor Heterogeneity from a Cancer Stem Cell Perspective ». *Molecular Cancer* 16 (1): 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0600-4>.

Salvatore, Lisa, Maria Alessandra Calegari, Fotios Loupakis, Matteo Fassan, Brunella Di Stefano, Maria Bensi, Emilio Bria, et Giampaolo Tortora. 2019. « PTEN in Colorectal Cancer: Shedding Light on Its Role as Predictor and Target ». *Cancers* 11 (11): E1765. <https://doi.org/10.3390/cancers11111765>.

Santos, António J.M., Yuan-Hung Lo, Amanda T. Mah, et Calvin J. Kuo. 2018. « The Intestinal Stem Cell Niche: Homeostasis and Adaptations ». *Trends in cell biology* 28 (12): 1062-78. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.08.001>.

Sanz-Garcia, E., G. Argiles, E. Elez, et J. Tabernero. 2017. « BRAF Mutant Colorectal Cancer: Prognosis, Treatment, and New Perspectives ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (11): 2648-57. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx401>.

Saydé, Tarek, Rémi Manczak, Sofiane Saada, Gaelle Bégau, Barbara Bessette, Gaëtane Lespes, Philippe Le Coustumer, et al. 2021. « Characterization of Glioblastoma Cancer Stem Cells Sorted by Sedimentation Field-Flow Fractionation Using an Ultrahigh-Frequency Range Dielectrophoresis Biosensor ». *Analytical Chemistry* 93 (37): 12664-71. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02466>.

Schmitt, Mark, et Florian R. Greten. 2021. « The Inflammatory Pathogenesis of Colorectal Cancer ». *Nature Reviews. Immunology* 21 (10): 653-67. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00534-x>.

Shehzad, Adeeb, Salman Ul Islam, Raheem Shahzad, Salman Khan, et Young Sup Lee. 2021. « Extracellular Vesicles in Cancer Diagnostics and Therapeutics ». *Pharmacology & Therapeutics* 223 (juillet): 107806. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107806>.

Sousa e Melo, Felipe de, Antonina V. Kurtova, Jonathan M. Harnoss, Noelyn Kljavin, Joerg D. Hoeck, Jeffrey Hung, Jeffrey Eastham Anderson, et al. 2017. « A Distinct Role for Lgr5+ Stem Cells in Primary and Metastatic Colon Cancer ». *Nature* 543 (7647): 676-80. <https://doi.org/10.1038/nature21713>.

Sugiura, Daisuke, Takumi Maruhashi, Il-Mi Okazaki, Kenji Shimizu, Takeo K. Maeda, Tatsuya Takemoto, et Taku Okazaki. 2019. « Restriction of PD-1 Function by Cis-PD-L1/CD80 Interactions Is Required for Optimal T Cell Responses ». *Science (New York, N.Y.)* 364 (6440): 558-66. <https://doi.org/10.1126/science.aav7062>.

Sumrin, Aleena, Shumaila Moazzam, Aleena Ahmad Khan, Irsa Ramzan, Zunaira Batool, Sana Kaleem, Moazzam Ali, Hamid Bashir, et Muhammad Bilal. 2018. « Exosomes as Biomarker of Cancer ». *Brazilian Archives of Biology and Technology* 61 (octobre). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160730>.

Testa, Ugo, Elvira Pelosi, et Germana Castelli. 2018. « Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells ». *Medical Sciences (Basel, Switzerland)* 6 (2): E31. <https://doi.org/10.3390/medsci6020031>.

Ueno, Hideki, Yoshiki Kajiwara, Hideyuki Shimazaki, Eiji Shinto, Yojiro Hashiguchi, Kuniaki Nakanishi, Kazunari Maekawa, et al. 2012. « New Criteria for Histologic Grading of Colorectal Cancer ». *The American Journal of Surgical Pathology* 36 (2): 193-201. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318235edee>.

Ueno, Hideki, Hidetaka Mochizuki, Yojiro Hashiguchi, Megumi Ishiguro, Yoshiki Kajiwara, Taichi Sato, Hideyuki Shimazaki, Kazuo Hase, et Ian C. Talbot. 2008. « Histological Grading of Colorectal Cancer: A Simple and Objective Method ». *Annals of Surgery* 247 (5): 811-18. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318167580f>.

Urabe, Fumihiko, Nobuyoshi Kosaka, Kagenori Ito, Takahiro Kimura, Shin Egawa, et Takahiro Ochiya. 2020. « Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 318 (1): C29-39. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00280.2019>.

Vautrot, Valentin, Hafidha Bentayeb, Sébastien Causse, Carmen Garrido, et Jessica Gobbo. 2021. « Tumor-Derived Exosomes: Hidden Players in PD-1/PD-L1 Resistance ». *Cancers* 13 (18): 4537. <https://doi.org/10.3390/cancers13184537>.

Wahab, S. M. Riajul, Farhadul Islam, Vinod Gopalan, et Alfred King-Yin Lam. 2017. « The Identifications and Clinical Implications of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer ». *Clinical Colorectal Cancer* 16 (2): 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.01.011>.

Yamada, Nami, Yuki Kuranaga, Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, et Yukihiko Akao. 2016. « Colorectal Cancer Cell-Derived Extracellular Vesicles Induce Phenotypic Alteration of T Cells into Tumor-Growth Supporting Cells with Transforming Growth Factor- β 1-Mediated Suppression ». *Oncotarget* 7 (19): 27033-43. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7041>.

Zalewski, Alicja, Adam E. Snook, et Scott A. Waldman. 2021. « Stem Cells as Therapeutic Targets in Colorectal Cancer ». *Personalized Medicine* 18 (2): 171-83. <https://doi.org/10.2217/pme-2020-0099>.

Zeuner, Ann, Matilde Todaro, Giorgio Stassi, et Ruggero De Maria. 2014. « Colorectal Cancer Stem Cells: From the Crypt to the Clinic ». *Cell Stem Cell* 15 (6): 692-705. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.012>.

Zhang, Lin, et Dihua Yu. 2019. « Exosomes in Cancer Development, Metastasis, and Immunity ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* 1871 (2): 455-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.04.004>.

Zhou, Jianbiao, Xiao-Lan Li, Zhi-Rong Chen, et Wee-Joo Chng. 2017. « Tumor-Derived Exosomes in Colorectal Cancer Progression and Their Clinical Applications ». *Oncotarget* 8 (59): 100781-90. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20117>.

Zhou, Yujuan, Longzheng Xia, Heran Wang, Linda Oyang, Min Su, Qiang Liu, Jingguan Lin, et al. 2018. « Cancer Stem Cells in Progression of Colorectal Cancer ». *Oncotarget* 9 (70): 33403-15. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23607>.

Zhu, Gongmin, Lijiao Pei, Hongwei Xia, Qiulin Tang, et Feng Bi. 2021. « Role of Oncogenic KRAS in the Prognosis, Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer ». *Molecular Cancer* 20 (1): 143. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01441-4>.

Zhu, Guoli, Jiulong Hu, et Rongwen Xi. 2021. « The Cellular Niche for Intestinal Stem Cells: A Team Effort ». *Cell Regeneration (London, England)* 10 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s13619-020-00061-5>.

Annexes

Annexe 1 : Article Lambert *et al.*, 2021



Article

Microfluidic Lab-on-a-Chip Based on UHF-Dielectrophoresis for Stemness Phenotype Characterization and Discrimination among Glioblastoma Cells

Elisa Lambert ^{1,†} , Rémi Manczak ¹, Elodie Barthout ^{2,†}, Sofiane Saada ², Elena Porcù ^{3,4} , Francesca Maule ⁵, Barbara Bessette ² , Giampietro Viola ^{3,4} , Luca Persano ^{3,4} , Claire Dalmay ¹, Fabrice Lalloué ² and Arnaud Pothier ^{1,*}

¹ XLIM-UMR 7252, University of Limoges/CNRS, 87060 Limoges, France; elisa.lambert@xlim.fr (E.L.); remi.manczak@xlim.fr (R.M.); claire.dalmay@xlim.fr (C.D.)

² CAPTuR-EA 3842, University of Limoges, 87025 Limoges, France; elodie.barthout@unilim.fr (E.B.); sofiane.saada@unilim.fr (S.S.); barbara.bessette@unilim.fr (B.B.); fabrice.lalloué@unilim.fr (F.L.)

³ Department of Women's and Children's Health (DSB), University of Padova, 35128 Padova, Italy; elena.porcù@unipd.it (E.P.); giampietro.viola.1@unipd.it (G.V.); luca.persano@unipd.it (L.P.)

⁴ Institute of Pediatric Research (IRP), 35127 Padova, Italy

⁵ Arnie Charbonneau Cancer Institute, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Calgary, Calgary, AB T2N 1N4, Canada; francesca.maule@ucalgary.ca

* Correspondence: arnaud.pothier@unilim.fr

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Lambert, E.; Manczak, R.; Barthout, E.; Saada, S.; Porcù, E.; Maule, F.; Bessette, B.; Viola, G.; Persano, L.; Dalmay, C.; et al. Microfluidic Lab-on-a-Chip Based on UHF-Dielectrophoresis for Stemness Phenotype Characterization and Discrimination among Glioblastoma Cells. *Biosensors* **2021**, *11*, 388. <https://doi.org/10.3390/bios11100388>

Received: 15 September 2021

Accepted: 12 October 2021

Published: 13 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Glioblastoma (GBM) is one of the most aggressive solid tumors, particularly due to the presence of cancer stem cells (CSCs). Nowadays, the characterization of this cell type with an efficient, fast and low-cost method remains an issue. Hence, we have developed a microfluidic lab-on-a-chip based on dielectrophoresis (DEP) single cell electro-manipulation to measure the two crossover frequencies: f_{x01} in the low-frequency range (below 500 kHz) and f_{x02} in the ultra-high-frequency range (UHF, above 50 MHz). First, in vitro conditions were investigated. An U87-MG cell line was cultured in different conditions in order to induce an undifferentiated phenotype. Then, ex vivo GBM cells from patients' primary cell culture were passed through the developed microfluidic system and characterized in order to reflect clinical conditions. This article demonstrates that the usual exploitation of low-frequency range DEP does not allow the discrimination of the undifferentiated GBM cells from the differentiated one. However, the presented study highlights the use of UHF-DEP as a relevant discriminant parameter. The proposed microfluidic lab-on-a-chip is able to follow the kinetics of U87-MG phenotype transformation in a CSC enrichment medium and the cancer stem cells phenotype acquirement.

Keywords: high-frequency dielectrophoresis; glioblastoma cells; single cell manipulation; microfluidic point-of-care device; cancer stem cells

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and highly malignant brain tumor in adulthood classified as a high-grade glioma (grade IV), considered as the most aggressive tumors of the central nervous system. Worldwide, 240,000 brain tumors are diagnosed each year, the majority of which are GBM [1]. GBM is associated with a poor prognosis with a mean survival of 12 months. Indeed, standard treatment such as surgery and combined radio-chemotherapy [2] fails to improve patients' care [3]. Despite recent advances in targeting therapies and immunotherapies, the current treatments do not allow the improvement of the mean survival. This very poor prognosis is mainly due to frequent relapses, despite the regression or disappearance of the tumor upon the golden standard treatment, i.e., the Stupp protocol [2]. Consequently, this pathology is very difficult to handle.

The high recurrence of GBM can be explained by the high heterogeneity of cellular, genetic and morphological patterns of the cell populations present in the tumor [4], which alters the efficiency of conventional therapies. This cell heterogeneity mainly results from a small cell subpopulation, called cancer stem cells (CSCs) [4], which are now considered as one of the major factors responsible for tumor progression and relapse [5]. In fact, CSCs display an immature and undifferentiated phenotype associated with specific self-renewal features. They also are likely to regenerate the entire tumor. Moreover, due to their quiescent properties, CSCs are resistant to radio and chemotherapy targeting proliferating cells [1]. Thus, CSCs detection in solid tumor could afford a prognosis value to evaluate tumor aggressiveness and prevent recurrence risk. However, CSCs are a rare cell subpopulation difficult to characterize with specific and usual tumor biomarkers within the tumor. CSC detection currently represents a challenge to improve the management of certain solid cancers, in particular GBM. Thus, new approaches for effectively discriminating CSCs from differentiated tumor cells are regularly investigated. However, one of the main encountered difficulties in characterizing CSCs is the lack of specific markers for these cells.

In this objective, biologists commonly analyze a panel of biomarkers by using conventional approaches for characterizing CSCs such as immunofluorescence, flow cytometry and protein array analysis. These different methodologies require systematic immunolabeling to identify CSCs, thereby require multiple steps which increases both expenses and inconvenience. Indeed, these methodologies are time-consuming and additional costs are incurred for the purchase of specific antibodies against CSC biomarkers. In addition, immunolabeling can influence and modify cell behavior and differentiation mechanisms. These changes might affect cell cultures and limit further analyses [6]. In order to overcome these issues and avoid immunolabeling, researchers started to develop alternative label-free methods for cell characterization. These innovative technologies aim to characterize CSCs based on their specific physical properties. Thus, most of the recent techniques rely on an external force coupled with microfluidics. This allows the reduction of the cost and analysis time with the possibility of parallelization and the reduction of sample volume as only few μL are needed. It also prevents cells from damage by limiting mechanical stress. Among the label-free method, dielectrophoresis (DEP) presents an important interest as it allows the investigation of biological cell behavior according to its intrinsic dielectric properties. For this study, we use DEP electro-manipulation at low frequency (below 500 kHz) and at ultra-high-frequency (UHF) range (above 50 MHz), highlighting the relevance of using UHF-DEP phenomenon to discriminate undifferentiated cells (CSC) from differentiated tumor cells. Implementation of the proposed microfluidic lab-on-a-chip is performed on BiCMOS technology and allows the screening of the intracellular properties of GBM cells.

1.1. Basic DEP Theory

Dielectrophoresis is a physical phenomenon, which leads to the motion of a polarizable particle such as biological cells, in a non-uniform electric field due to the interaction between the induced dipole of the particle and the field gradient. The polarization phenomenon redistributes of the charges at the interface between the particle and the suspension medium. The dielectrophoretic force exerted on the polarized particle in a non-uniform electric field is expressed as follows [7]:

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi r^3 \epsilon_m \text{Re}[f_{\text{CM}}(\omega)] \nabla E^2 \quad (1)$$

where r is the radius of the particle, ϵ_m the permittivity of the suspension medium, $\text{Re}[f_{\text{CM}}(\omega)]$ the real part of the Clausius–Mossotti (CM) factor, E the applied electric field.

The Clausius–Mossotti factor describes the polarization state of a particle in a suspension medium. It depends on the dielectric properties (permittivity and conductivity) of the medium and the particle [7]:

$$f_{\text{CM}}(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2)$$

where ϵ_p^* and ϵ_m^* are the complex permittivity of the particle and the medium, respectively. The complex permittivity can be defined as:

$$\epsilon^* = \epsilon - j \frac{\sigma}{\omega} \quad (3)$$

where ϵ is the absolute permittivity ($\epsilon = \epsilon_r^* \epsilon_0$, with ϵ_r is the relative permittivity and ϵ_0 is the vacuum permittivity, of which the value is $8.854 \text{ F}\cdot\text{m}^{-1}$), σ the conductivity and ω the angular frequency of the electric field. The sign of the real part of the CM factor determines the orientation of the DEP force. In Figure 1a, when $\text{Re}[f_{CM}(\omega)]$ is positive, the DEP force attracts the particle to the strong field areas. This phenomenon is called positive DEP (pDEP). In Figure 1b, when $\text{Re}[f_{CM}(\omega)]$ is negative, the DEP force is then repulsive and the particle is repelled towards the weak electric field areas. This is called negative DEP (nDEP).

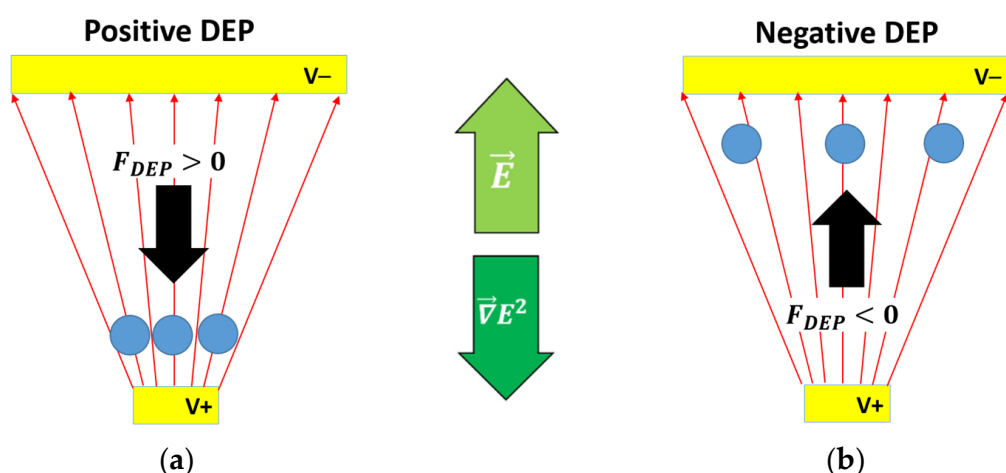


Figure 1. Particles' interaction in a non-uniform applied field: (a) the DEP force is positive, i.e., collinear to the electric field gradient ∇E^2 , and the particles are attracted to areas of high field intensity (positive DEP); (b) the DEP force is negative, i.e., opposite to the electric field gradient ∇E^2 , and the particles are repelled toward areas of low field intensity (negative DEP).

From a physic point of view, a biological cell can be modeled as a spherical dielectric particle that is submitted to the DEP force. A cell is a complex biological object, but it can be properly modeled into a simpler single-shell model with a reduced number of dielectric parameters associated to each component of the cell.

1.2. From a Biological Cell to a Single-Shell Model

In order to predict cells' behavior with an applied electric field, it is helpful to have a simplified model of a biological cell. The Figure 2 presents a schematic of a cell and its commonly used associated single-shell model associated where the cell membrane and cytoplasm are represented by a shell and a core with their own complex permittivity [8–10].

Indeed, the single-shell model considers the cytoplasm and its content as a homogeneous dielectric sphere enveloped by the plasma membrane. This model limits the number of dielectric parameters to take into account only the complex permittivity of the intracellular content, the cell membrane and the suspension medium. Actually, the Clausius–Mossotti factor depends on these parameters as well as the frequency of the applied field. This single-shell model will be considered in this paper.

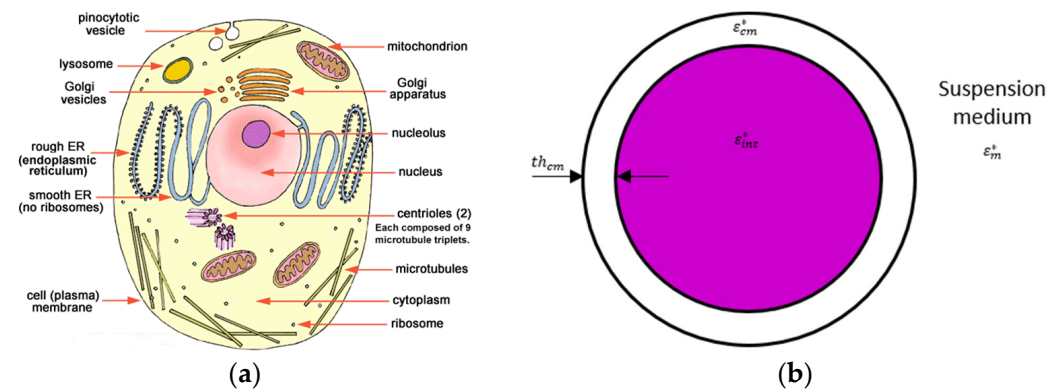


Figure 2. (a) Representation of a biological cell in a suspension medium; (b) its single-shell model with ϵ_{int}^* the complex permittivity of the cellular content, ϵ_{cm}^* the complex permittivity of the cell membrane and th_{cm} the thickness of the cell membrane and ϵ_m^* the complex permittivity of the suspension medium.

1.3. Effect of the Cellular Dielectric Properties on the Clausius–Mossotti Factor

Figure 3 illustrates the frequency-dependent cell behavior through the real part of the CM factor (Figure 3a). The dielectric parameters and cell geometric parameters are reported in Table 1. The real part plot in Figure 3a is computed thanks to the myDEP software [11]. nDEP behavior can be observed at very low frequency (lower than 400 kHz) and at high frequency (at least higher than 150 MHz), and pDEP behavior can be seen at medium range frequency (between 500 kHz and 100 MHz). The plot of the CM factor hence presents alternations between a repulsive state (nDEP) and an attractive state (pDEP). Two crossover frequencies f_{x01} and f_{x02} appear where the real part of the CM factor becomes null. f_{x01} occurs at low frequency, whereas f_{x02} occurs at higher frequency.

Moreover, from Figure 3a, 100 kHz and 1, 20 and 500 MHz frequencies were selected in order to study the dielectric response of the cells. Indeed, these frequencies correspond to the two different DEP behaviors but at low frequency (frequencies n°1 and n°2) and at high-frequency regime (frequencies n°3 and n°4). COMSOL Multiphysics® computations were performed with the AC/DC electric current module in Figure 3b. The parameters from Table 1 were used for the simulation in such a way that the results correspond to the curve of the real part of the CM factor. As said before, the cell is represented by the single-shell model with the core: its intracellular content, and the shell: its plasma membrane. The cell is here considered to be suspended in a low-conductivity medium. The electric potential is 1 Vpp. The shown colors represent the electric field intensity in V/m from dark blue (the field intensity is 0 V/m) to dark red (the field intensity is maximum). One can notice that for the nDEP behavior (at 100 kHz and 500 MHz), the electric field lines (black streamlines) bypass the cell, whereas for the pDEP behavior (at 1 and 20 MHz), the electric field lines seem attracted inside the cell. This is mainly due to the reorientation of the charges at the interface between the cell membrane and the medium [7]. One can also notice that at low frequency, no field can reach the cell content. The electric field is at maximum inside the plasma membrane, which hence acts as an insulator. As a result, at low frequency, the electromagnetic field will be more sensitive to the physical and dielectric properties of the cell membrane. The more the frequency of the applied signal increases, the more the electric field can penetrate inside the cell and starts to interact with and so probe the cellular content. Consequently, at high frequency, the electromagnetic wave can be deeply sensitive to the intracellular content.

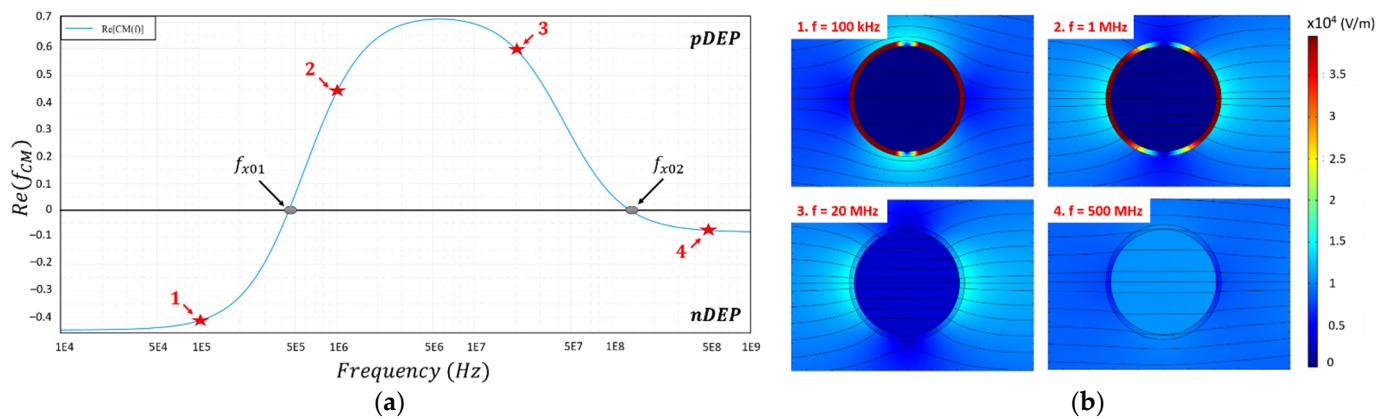


Figure 3. Numerical simulation of a cell dielectric behavior in function of the frequency with the parameters from Table 1. The design used for the biological cell is the single-shell model. (a) Numerical simulation of the real part of the Clausius-Mossotti factor. The red stars correspond to the chosen frequencies for the COMSOL simulation; (b) COMSOL simulation of the single-shell model for different frequencies (100 kHz; 1 MHz; 20 MHz; 500 MHz) which correspond to the curve of the CM factor. The color scale corresponds to the electric field intensity (V/m) and the black lines correspond to the electric streamlines.

Table 1. Values of the different dielectric and cellular parameters used in the COMSOL Multiphysics simulation.

Parameter	Value
Particle radius	11.5 μm
Membrane thickness	700 nm^1
Intracellular relative permittivity	50
Intracellular conductivity	0.5 S/m
Membrane relative permittivity	100 ²
Membrane conductivity	1.43×10^4 S/m ²
Medium relative permittivity	78
Medium conductivity	0.02 S/m

¹ Membrane thickness was increased by 100 in order to avoid mesh issues during the computation. ² Data were modified proportionally due the modification of the membrane thickness in order to respect the cell dielectric behavior.

Moreover, it is possible to change the value of the dielectric parameters in order to study the evolution of the real part of the CM factor and the parameter dependency of the two crossover frequencies as has been carried out in [12–14]. A first approximation of the crossover frequency f_{x01} can be expressed as [7]:

$$f_{x01} = \sigma_m \frac{\text{th}_{\text{cm}}}{\sqrt{2\pi r \epsilon_{\text{cm}}}} \quad (4)$$

The crossover frequency f_{x01} depends mostly on the dielectric parameters of the plasma membrane, but also the particle radius. Hence, f_{x01} is more sensitive to the cell shape, its morphology and to the plasma membrane properties. It has been widely used to separate cells or polystyrene particles of different size [15,16] and to separate living from non-viable cells [17]. The second crossover frequency f_{x02} can be approximated with the assumption that the conductivity of the suspending medium (20 mS/m, see Section 2) is significantly below the intracellular value expression [18]:

$$f_{x02} = \frac{\sigma_{\text{int}}}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{2\epsilon_{\text{m}}^2 - \epsilon_{\text{int}}\epsilon_{\text{m}} - \epsilon_{\text{int}}^2}} \quad (5)$$

The crossover frequency f_{x02} depends on the dielectric parameters of the intracellular content [19]. Hence, cells can be individually electro-manipulated by the DEP force

motion according to their own dielectric properties of their cytoplasm. As an example, UHF-DEP has already been successfully used in order to discriminate differentiated from undifferentiated medulloblastoma cells [20,21].

This paper aims to show the relevance of the identification of the crossover frequency f_{x02} as the DEP signature and then using it as an appropriate discriminant biomarker to detect CSCs within tumor cell population. Therefore, the two crossover frequencies f_{x01} and f_{x02} have been measured for each investigated GBM cell and compared.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Line Culture

Human GBM cell line U87-MG was purchased from American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown in different culture conditions (see below) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂–95% air. Cancer stem cells enrichment was obtained submitting cells to stringent culture conditions with the Define Medium (DM). Two culture conditions were used for the cells' DEP characterization:

- Normal Normoxia Medium (NM): induces normal differentiation in DMEM supplemented by 10% FBS, 2 mM glutamine and 1% penicillin/streptomycin.
- Define Normoxia Medium (DM): the starvation of 10% Fetal Bovine Serum (FBS) in this medium induces stringent conditions. DM is supplemented in two specific growth factors: EGF (Epidermal Growth Factors) and bFGF2 (basic Fibroblast Growth Factors) required for clonal expansion and the formation of glioma spheres which are composed of several thousand aggregated cells. DM composition consists in DMEM/F12 supplemented by 0.6% glucose, 1% sodium bicarbonate, 1% MEM non-essential amino acids, 5 mM HEPES, 9.6 µg/mL putrescine, 10 µg/mL ITSS, 0.063 µg/mL progesterone, 60 µg/mL *N*-acetyl-L-cysteine, 2 µg/mL heparin, 0.1 mg/mL penicillin/streptomycin, 50X B-27 supplement without vitamin A, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFG.

Hence, it is expected that the Define Medium will select undifferentiated cells and also promote the emergence of CSCs, whereas the Normal Medium will induce a differentiation of cells and so will result in a very low ratio of cancer stem cells. For the differentiated cells, they were cultured for 6 days in NM before the DEP characterization. For the undifferentiated cells, they were cultured for 5 days in DM or maintained during 21 days in DM in order to study the kinetics of CSC appearance and the emergence of stem cell characteristics.

2.2. Primary GBM Cell Isolations, Culturing and Separation by Flow Cytometry

For some validation experiments, four different primary cell cultures have been isolated and established in vitro from GBM patients to characterize any potential difference in term of DEP signature between bulk cells and their relative CSCs counterparts. Written informed consent for the donation of adult tumor brain tissues was obtained from patients before tissue collection under the auspices of the protocol for the acquisition of human brain tissues obtained from the Ethical Committee of the Padova University Hospital (2462P). In particular, GBM cells were isolated from tumors during surgery as previously described [22]. Briefly, resected GBM samples were dissociated, and single cell suspensions were grown in Define Medium under hypoxic conditions (DH). Indeed, GBM cells were maintained in an atmosphere of 2% oxygen, 5% carbon dioxide and balanced nitrogen in a H35 hypoxic cabinet (Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, UK) to achieve a proper expansion of the CSC subpopulation in hypoxic conditions mimicking the GBM microenvironment [23].

After proper expansion in vitro, primary GBM cells were incubated with a PE mouse anti-CD133 (AC133) antibody (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to manufacturer's indications and then separated into a CD133+ and a CD133− subpopulation by means of Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) in a MoFlo XDP cell sorter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A CD133 versus side scatter dot plot revealed the populations of interest characterized by the expression (or not) of the CD133 marker. Cell

fractions were selected by setting appropriate sorting gates as previously described [24]. Upon sorting, isolated GBM cell subpopulations (CD133+ and CD133−) were washed in Phosphate Buffered Saline (PBS), frozen in medium containing 10% DMSO and then cryopreserved in liquid nitrogen for subsequent thawing and DEP characterization.

2.3. DEP Suspension Medium

Few minutes from the DEP characterization, U87-MG cells were suspended in an osmotic medium adapted for DEP electro-manipulation made from deionized water (ion free) supplemented by sucrose. The conductivity of the DEP medium is 26 mS/m and the pH is 7.4. The crossover frequency measurements were performed at room temperature.

2.4. Comparative Transcriptomic Analysis (mRNA Levels) of the Stemness Phenotype

In order to confirm the enrichment of undifferentiated cells in Define Medium (DM), a comparative transcriptomic analysis of the stemness phenotype was performed.

The extraction of the total RNA from U87-MG cell line was carried out using the RNeasy kit (Qiagen) on 1 million cells according to the manufacturer's recommendations. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) was performed on 50 ng of cDNA using Taqman probes on *GAPDH* and *HPRT* as reference genes. The CSC markers used are *CD133*, *Nanog*, *Sox2* and *Oct4*. The analysis is performed using QuantStudio3 (Thermo Fisher) and relative expressions are estimated by $\Delta\Delta C_t$ method using the average of the two reference genes as endogenous control.

2.5. Crossover Frequency Experiment

2.5.1. DEP Sensor Design and Experimental Setup

In order to identify the cells' DEP signature, we use a specific BiCMOS RF-sensor implemented on a microfluidic chip, as presented in Figure 4. The developed UHF-DEP lab-on-chip allows the electro-manipulation of one single cell. Its structure is made of four electrodes to generate a non-uniform electric field. They are set at 90° across the microfluidic channel. In order not to disturb the fluid flow and not to obstruct the channel with the passage of cells, the two electrodes parallel to the channel (in dark gray in Figure 4b) are very thin and 0.45 μm high. The other pair of electrodes perpendicular to the channel are thicker: 9 μm high, in order to ensure a sufficiently strong field over the height of the channel. The implemented gaps between the electrodes are 40 μm wide to generate dielectrophoretic force with a low applied voltage to trap efficiently biological cells. The two pairs of electrodes are biased with a high-frequency continuous wave (CW) signal. The fabrication process of the chip is detailed in [25]. The microfluidic channel is molded in a polydimethylsiloxane (PDMS) cap to drive the cell suspension to the sensor array. The channel is 150 μm wide and 50 μm high.

The experimental setup for the crossover frequency measurement is shown in Figure 5. Once the cells were suspended in the DEP medium, the Eppendorf was linked to the UHF-DEP lab-on-chip thanks to capillary tubes. The cell suspension is injected in the chip by external flow controllers. They apply input and output pressures in order to regulate the speed and the motion of the cells in the microfluidic channel.

The UHF signal is produced thanks to a radio-frequency signal generator (whose frequency range is adjustable from 10 MHz to 1.1 GHz) which is then amplified. The signal generated can reach a magnitude of 10 Vpp while keeping a high purity continuous wave (CW) signal. During the crossover frequency measurement, the signal voltage is set between 2 and 4 Vpp. The applied signal is then directed to a power divider in order to bias the pair of thick electrodes simultaneously with the same signal, while the thin electrodes are grounded. The DEP signal is propagated until the quadrupole sensor thanks to 50 Ω microstrip transmission lines which are connected to RF probes. The switch driver allows switching between the high-frequency applied signal to the low-frequency applied signal. To measure the first crossover frequency f_{x01} , a low-frequency signal can be generated by a second generator whose frequency range can be set from 1 μHz to 80 MHz. Then, the low

frequency applied signal is set between 2 and 4 Vpp and propagated through the power divider to the RF probes.

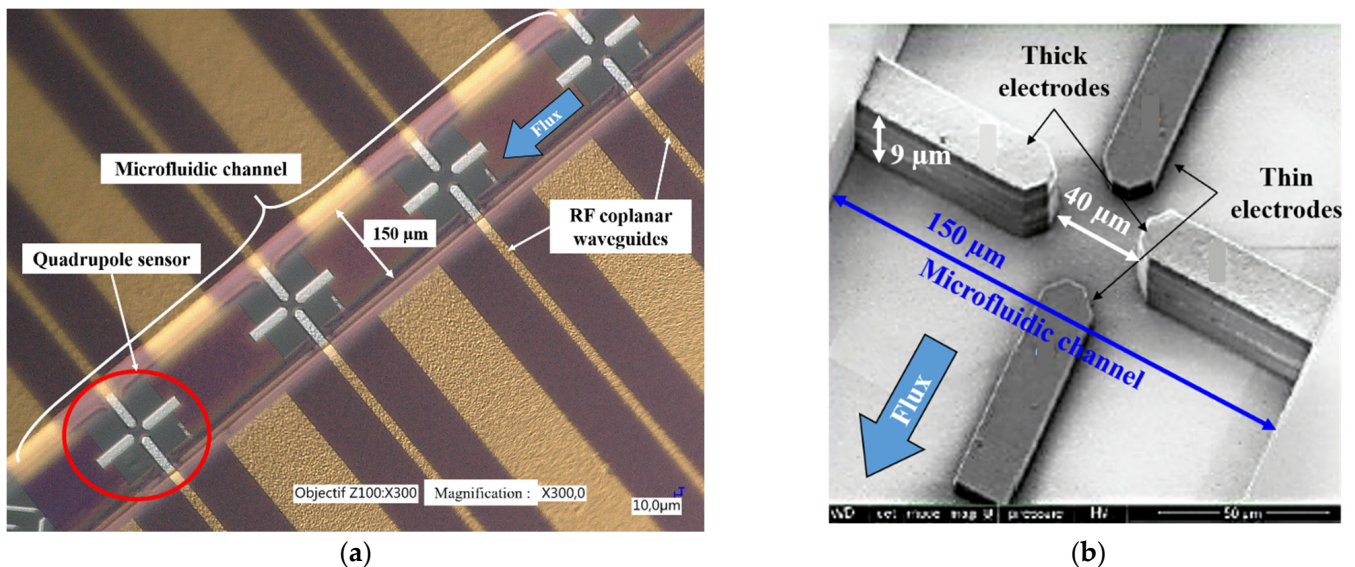


Figure 4. (a) Quadrupole microelectrodes sensor implemented with a microfluidic channel in BiCMOS; (b) Scanning Electron Microscopy (SEM) picture of a quadrupole sensor.

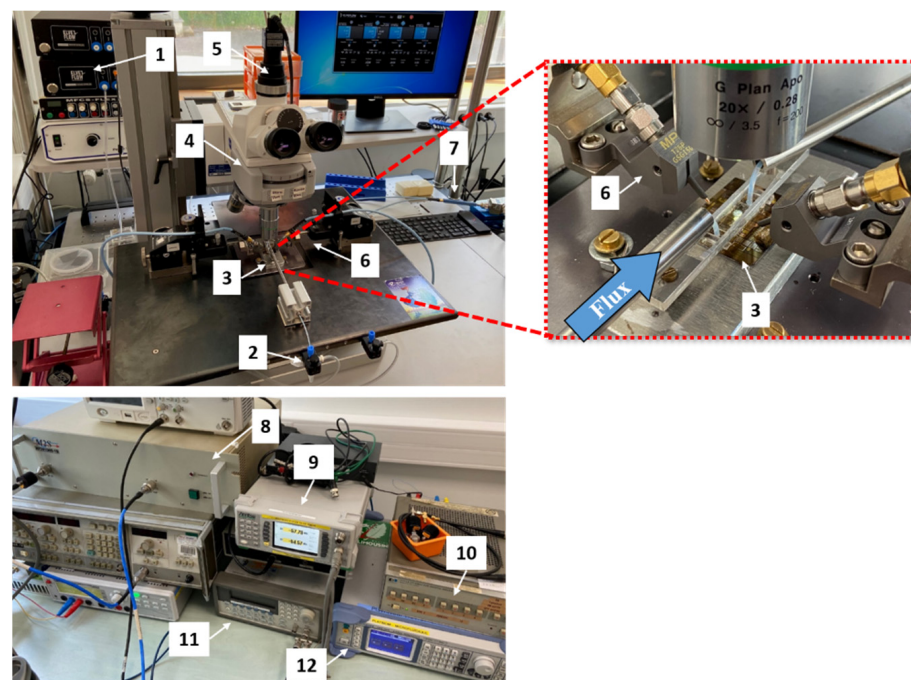


Figure 5. Experimental bench where the crossover frequencies measurements are performed. The labeled parts refer to: (1) external flow controllers Elveflow OB1; (2) cell suspension; (3) UHF-DEP microfluidic chip, a zoomed picture is shown in the red dotted box; (4) Scope.A1 Zeiss Microscope; (5) camera Axiocam 105 color Zeiss; (6) RF probes MPI TITAN T26P-GSG-150; (7) power divider; (8) power amplifier Bonn Elektrik BLWA 100-5M; (9) power meter Anritsu ML2496A; (10) attenuator/switch driver 11713A HP; (11) low-frequency generator Agilent 33250A; (12) RF signal generator SMB 100A from Rhode & Schwarz.

2.5.2. f_{x01} and f_{x02} Crossover Frequencies Measurements

The aim of this article is to show that we can take benefit from the second crossover frequency f_{x02} to discriminate differentiated cells from undifferentiated cells in GBM cell line and patient GBM cells from primary culture, whereas f_{x01} cannot emphasize this discrimination. To do so, we used our lab-on-chip to measure the crossover frequencies and to characterize cells' DEP signature according to their different culture conditions (Normal Medium NM and Define Medium DM). First, the cells are brought to the characterization area, i.e., the quadrupole sensor, thanks to the external flow controllers. Once a single cell is present in the center of the quadrupole such as in the first picture of Figure 6b, the flow is temporarily cut off and stabilized in order to proceed to the crossover frequency measurement and the electromagnetic signal is switched on. The flow is stopped during the DEP characterization to avoid the competition between forces, so that the cell is only submitted to the dielectrophoretic force and the natural gravity.

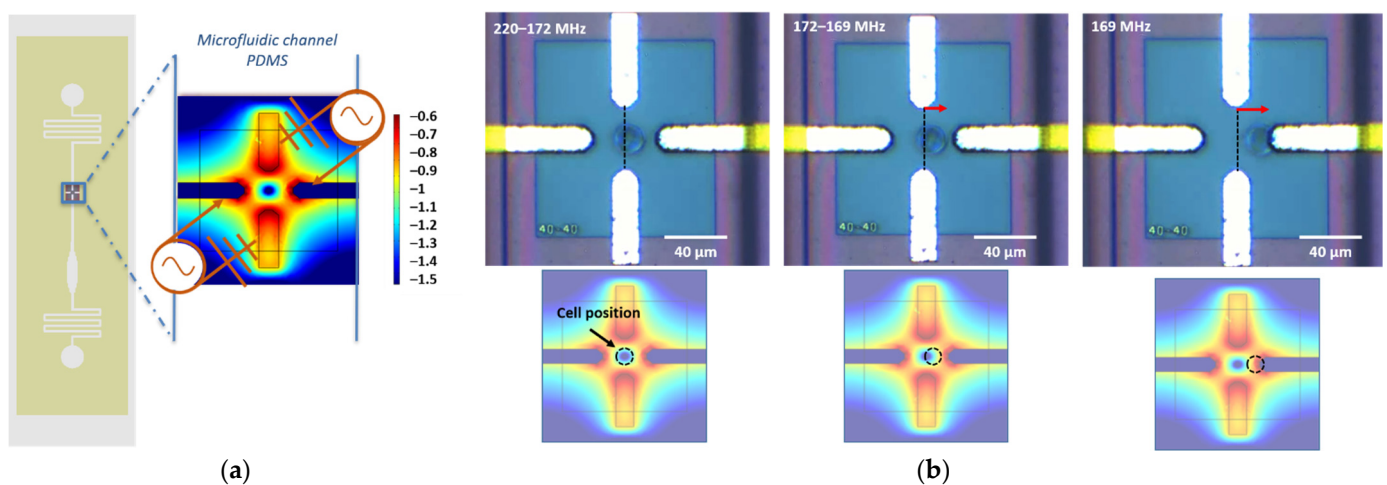


Figure 6. Principle of the crossover frequency measurement: (a) schematic of the microfluidic chip with a zoom in on one quadrupole sensor. Computation of the biased sensor in a non-uniform electric field (COMSOL Multiphysics®). The scale color corresponds to the normalized electromagnetic field intensity; (b) dielectrophoretic response of a single U87-MG NM cell under an UHF applied signal for frequencies between 220 and 169 MHz. The second crossover frequency f_{x02} is measured at 169 MHz.

The Figure 6a shows the quadrupole biased whatever the investigated frequency from the low- to high-frequency range. One can notice that the areas of strong electric field intensity (in orange/red) are located at the different edges of the electrodes. As said before, these zones are related to the pDEP cell behavior, whereas the area of weak field intensity (in dark blue) is located at the center of the electrodes, which is assimilated to the nDEP cell behavior. The DEP sensor is biased firstly with the UHF generated signal at 500 MHz. At this frequency range (Figure 3a), we expect the cell to present nDEP behavior, and it is far from its crossover frequency. The dielectrophoretic force is thus repulsive and the cell is trapped within the central electrical cage created by the quadrupole, as shown in the first picture of Figure 6b. Then, we decrease the frequency of the applied signal. The DEP force starts to become attractive and we can observe the first movement of the cell (second picture in Figure 6b). Finally, the cell is pulled toward the edge of one of the lateral electrodes, which is the pDEP area (last picture in Figure 6b). Hence, we can tune the frequency of the signal from a repulsive state in the center of the sensor to an attractive state. The crossover frequency f_{x02} can be determined from the motion of the cell from the nDEP behavior to the pDEP behavior, which can be observed optically under a microscope. In order to precisely identify f_{x02} , we first decrease the frequency of the applied signal by steps of 10 MHz in order to approach the crossover frequency. Then, we slowly scan the frequency by steps of 1 MHz to observe the cell motion. This operation is repeated once again in order to accurately determine f_{x02} . Then, we increase the applied frequency to

place the cell in the center of the quadrupole. We turn off the UHF signal generator and use the switch driver in order to inject the low-frequency signal in the lab-on-a-chip and to determine the first crossover frequency f_{x01} of the same cell. The same procedure for the characterization of f_{x02} is used for the measurement of f_{x01} . We turn on the generator and we apply a sinusoidal signal at 10 kHz in order to place the cell in its nDEP behavior. Next, we increase the frequency by steps of 10 kHz until we observe the cell motion. Then, we scan slowly the frequency by steps of 1 kHz to have an accurate value of the crossover frequency. This characterization process is duplicated to confirm the measured value. Finally, the electric signal is turned off and the flow pressure at the chip inlet is increased to release the characterized cell and renew the cell suspension in the microfluidic channel. A new cell is next trapped and fully characterized following the same method.

Hence, the resolution of the two measured crossover frequencies f_{x01} and f_{x02} is, respectively, 1 kHz and 1 MHz. One should notice that due to the natural biological heterogeneity occurring among a cell population, the crossover frequencies might spread out on a more or less large frequency range. Nevertheless, the repeatability and reproducibility of the crossover frequency measurements allow us to consolidate the collected data. Afterwards, the comparison of different crossover frequencies recorded from distinct cells or conditions is validated with statistical analyses. Hence, we consider that the identification of the DEP signature (collection of crossover frequencies from distinct tumor cells) is representative of the whole cell population.

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using PAST software. Comparisons between groups were analyzed by ANOVA test. $p < 0.005$ was considered significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

3. Results

3.1. Enrichment of CSC in the Define Medium

In order to enrich the tumor cell populations in undifferentiated cells related to CSC, U87-MG cells were cultured in Define Medium for 5 days. Morphological changes are observed macroscopically in these stringent culture conditions. As expected, the morphology of U87-MG NM vs. U87-MG DM is completely different (Figure 7a). In Normal Medium, cells are spread out in the petri dish, whereas in Define Medium, cells develop the ability to form glioma spheres due to the presence of specific growth factors (EGF and bFGF-2). It is known that neural stem cells cultured in vitro have the capability to generate clonal structures called “neurospheres” [26]. Glioma spheres are composed of a wealth of aggregated cells. However, just before the DEP characterization, cells are resuspended in the DEP medium and glioma spheres are mechanically broken with the action of a micropipette. When the cell suspension is injected in the lab-on-a-chip, the cells cultured in different conditions present a round shape, and no significant difference in morphology can be observed under an optical microscope (Figure 7b).

To confirm the enrichment of cancer stem cells from total cell population, we achieved a transcriptomic analysis in order to assess the changes of mRNA expression levels related to CSC biomarkers (*CD133*, *Nanog*, *Sox2* and *Oct4*) when U87-MG cells were cultured either in the Normal Medium or in define medium. mRNA relative quantification of U87-MG cultured in Define Medium were normalized, respectively, to the gene expression of U87-MG culture in the Normal Medium (dotted line) (Figure 8). As expected, CSC transcripts were overexpressed in define medium cultured cells, confirming the enrichment of CSCs in cell subpopulation.

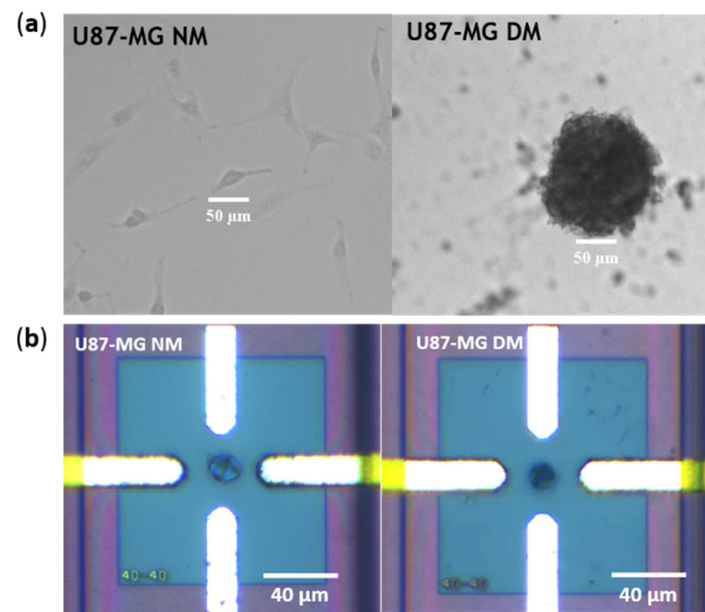


Figure 7. (a) Microscope view of the U87-MG cell line cultured in two different conditions: Normal Medium (NM) and after 2 days in define medium (DM); (b) microscope view of characterized U87-MG cell line trapped in our quadrupole sensor.

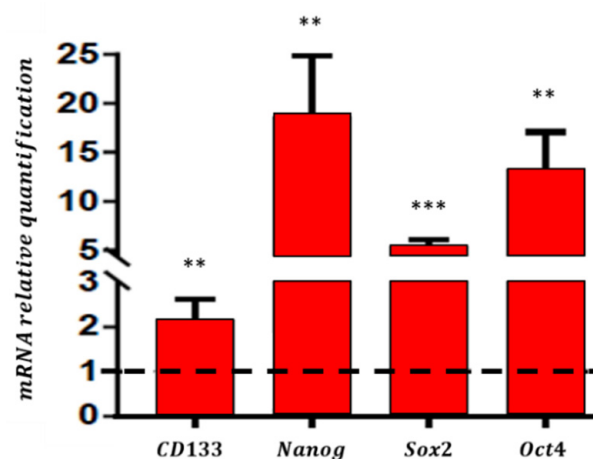


Figure 8. Comparative analysis of gene expression of four undifferentiated markers: *CD133*, *Nanog*, *Sox2t* and *Oct4* among U87-MG cell line, cultured in Normal Medium (dotted line), or in define medium, measured by Real Time PCR. *** represents p -value < 0.001, ** represents p -value < 0.01.

3.2. Dielectrophoretic Signatures f_{x01} and f_{x02} of U87-MG Cell Line

The U87-MG cell line has been characterized using the microfluidic lab-on-a-chip using the method previously described. The first crossover frequency f_{x01} and the second crossover frequency f_{x02} of the same trapped cells have been successively measured.

The measurement results for both culture conditions summarized in the violin plot thereby illustrate the distribution over frequency of the data (Figure 9). Violin plots are very similar to box plots, except that they additionally show the probability density curve of the different data. The small white dot marker labels the median value of the dataset (small white dot). Moreover, as for the box plot, the first and fourth quartiles of the dataset are represented by the thin black line, and 50% of the whole cell population is concentrated in the thick black line. The extreme peaks correspond to the minimum and maximum values. In Figure 9, one should notice that the scales for the two crossover frequencies are the same except that the unit are kHz and MHz for f_{x01} and f_{x02} , respectively.

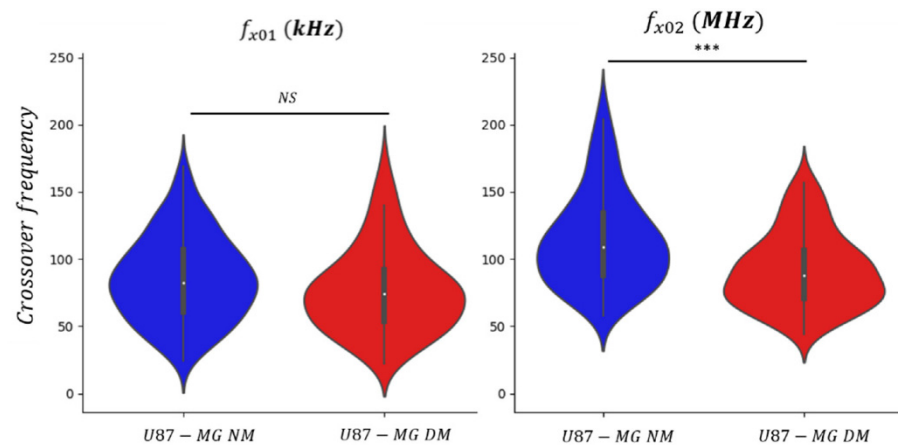


Figure 9. Graphic violin plot representation of U87-MG cells crossover frequencies f_{x01} (left graph) and f_{x02} (right graph), cultured in two different conditions: Normal Medium (NM) and define medium (DM). *** represents p -value < 0.0001 .

Descriptive statistics including number of cells, median value and standard deviation of crossover frequency for distinct culture conditions are reported in Table 2. One can notice, for both crossover frequencies datasets on Figure 9, the wide-ranging dispersion of measured values, which is also reflected in the value of the standard deviation. This observation is due to the normal heterogeneity of the cells among the GBM cell population. At low frequency, f_{x01} is influenced by the small difference of the cell size and morphology within the cell culture, while at high frequency, f_{x02} might be dependent of intracellular changes or alterations. For instance, during the cell cycle, the nucleocytoplasmic ratio might differ from a cell to another as they are not synchronized during the culture [27]. However, the violin plot highlights the fact that cell's crossover frequencies are gathered around their respective median value.

Table 2. Values regarding the crossover frequency measurements of the U87-MG cell line.

Cell Culture Conditions	Crossover Frequency	Number of Cells Measured	Median Value	SD
Normal Medium (NN)	f_{x01}	139	82 kHz	31.5 kHz
Define medium (DN)		134	74 kHz	32.1 kHz
Normal Medium (NN)	f_{x02}	139	109 MHz	35.2 MHz
Define medium (DN)		134	88 MHz	27.9 MHz

A representative number of cells have been individually characterized to statistically consolidate the collected dataset and make the established signatures significant. One can notice that the distribution of the first crossover frequency f_{x01} is mostly the same for the two culture conditions, NM vs. DM. The median value of f_{x01} for the undifferentiated enriched population (DM) shows no significant difference with the normal conditions: 74 and 82 kHz, respectively. Indeed, as shown previously in Figure 8, both U87-MG NM and U87-MG DM present the same round shape morphology. In contrast, the distribution of the second crossover frequency f_{x02} exhibits a significant difference despite an overlap in frequency. This can be explained by the fact that GBM cell population cultured in normal conditions include a majority of differentiated cells but also few undifferentiated cells. However, for the DM conditions, there are more undifferentiated cells, since presenting stringent survival conditions, DM is more selective. Thus, we can observe a decrease in the crossover frequency f_{x02} with the presence of the DM cell pool. The median values for U87-MG NM and U87-MG DM are, respectively, 109 and 88 MHz. The decrease in f_{x02} shows a significant difference between the two cells' phenotypes, as the p -value is lower than 10^{-3} .

This demonstrates that undifferentiated cells compared to differentiated cells own different intracellular dielectric properties. Despite displaying two crossover frequencies, only the one in the UHF range, f_{x02} , is sufficiently meaningful to be exploited for identifying cells presenting an undifferentiated state or a stemness-like phenotype. These results show how promising UHF-DEP cell profile analysis might be for the discrimination of cell subpopulation within the tumor. Next, we will focus on the second crossover frequency f_{x02} and strengthen the relevance of using UHF-DEP as a discriminant parameter through a kinetic study of the evolution of the stemness phenotype.

3.3. Kinetic Evolution of the Stemness Phenotype

As the enrichment of this cell population is accomplished by seeding normal U87-MG cells in Define Medium, either cells already exerting an undifferentiated profile can survive, or other cells must acquire phenomenon is a process that requires several division cycles and we specific features related to stem cells to survive in Define Medium. With the acquirement of cell undifferentiated status, cell aggressiveness is increased and is related to tumor aggressiveness. The undifferentiation proposed to follow its kinetics by UHF-DEP to demonstrate the potential of the UHF-DEP microsystem developed.

To do so, the U87-MG cell line was cultured within three different conditions: (i) 6 days in Normal Medium (NM); (ii) 5 days in Define Medium (DM); (iii) maintained during 21 days in Define Medium (DM+). The results of the measured crossover frequency f_{x02} are presented in the violin plot chart in Figure 10. In addition to the data already collected previously for U87-MG NM and U87-MG DM cells, we remeasured about hundred more crossover frequencies f_{x02} in order to consolidate the previously obtained DEP signatures and to improve the statistical strength of our analysis.

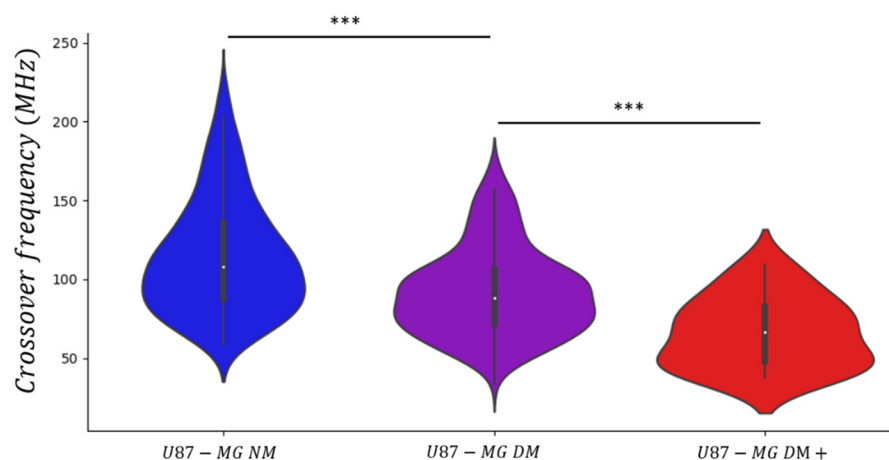


Figure 10. Graphic violin plot representation of U87-MG cells crossover frequency f_{x02} , cultured in three different conditions: (i) 5 days in Normal Medium (NM); (ii) 5 days in define medium (DM); (iii) 21 days in define medium (DM+). *** represents p -value < 0.001.

Statistics results related to the collected data are reported in Table 3, including the median value and the standard deviation of f_{x02} . As said before, the distribution of the second crossover frequency values is dispersed. This observation is highlighted by the high values of the standard deviation. However, the standard deviation seems to decrease the more the cells are maintained in Define Medium. Indeed, as the GBM cell line presents a high biological heterogeneity, the Define Medium tends to select only cells which are able to survive under such stringent culture conditions, i.e., cells with an undifferentiated phenotype. Despite the data dispersion, the violin plot shows that the cell's crossover frequency values are mostly gathered around their respective median value.

Table 3. Values regarding the crossover frequency measurements of the U87-MG cell line.

Culture Condition	Median Value	SD
Normal Medium (NM)	108 MHz	36.2 MHz
Define Medium (DM)	88 MHz	27.9 MHz
Define Medium (DM+)	67 MHz	22.1 MHz

In Normal Medium, the median value of the second crossover frequency is 108 MHz. After 5 days in Define Medium, the median DEP signature decreases to 88 MHz and after 16 additional days in Define Medium, it is 67 MHz. The two successive decreases in f_{x02} observed between the three cell populations present significant differences, as the p -value is lower than 10^{-3} . In correlation with the previous experimentation, a lower dielectric signature seems to potentially characterize cells presenting a stemness-like phenotype.

One can also notice that although more cells were characterized in the NM and DM conditions for this measurement campaign, the median value of the crossover frequency is not affected and remains the same compared to the first campaign (related in Table 2). It shows the robustness and the reproducibility of our method to measure the DEP signatures of cells.

These two experiments demonstrate the ability of the developed UHF-DEP lab-on-chip to successfully extract information about the potential stemness status of U87-MG cells by the measurement of the second crossover frequency f_{x02} .

3.4. Dielectrophoretic Signatures f_{x01} and f_{x02} of GBM Primary Cultures

We previously measured (in Section 3.2) the low- and high-frequency DEP signatures of the U87-MG cell line, cultured in two different conditions in order to induce an undifferentiation corresponding to the CSC subpopulation. From the obtained crossover frequency, f_{x01} did not show any difference between Normal Medium and Define Medium. However, we demonstrated that f_{x02} presents a significant difference and can be a relevant discriminant parameter to identify the CSC subpopulation. These results of the DEP signatures were obtained from the in vitro cell line.

To go further, we proposed in the last section of this paper to repeat this experiment on ex vivo GBM primary cultures to demonstrate the potential clinical applications of our approach.

The two crossover frequencies f_{x01} and f_{x02} , respectively were characterized in GBM primary culture cells derived from four patients. These cells were collected after surgery on patients suffering from glioblastoma. Once extracted from the tumor samples, cells were put in culture according to the procedure indicated in Materials and Methods. As for the U87-MG cell line, a few minutes before DEP characterization, the ex vivo GBM cells were resuspended in the DEP medium. Then, for each investigated cell, their two crossover frequencies f_{x01} and f_{x02} were measured with the previously described protocol.

Before DEP characterizations, the GBM cell population was first separated into two subpopulations: CD133– and CD133+. CD133 is a transmembrane protein expressed in human hematopoietic stem cells and progenitor cells [28]. As said before, CD133 is a biomarker associated with stem-like cells, and thus with tumor regeneration. It is possible to mark cells with monoclonal antibodies anti-AC133 coupled with a fluorochrome to detect the presence of the peptide CD133 on the cell surface [29]. Nevertheless, CD133 can be also expressed in differentiated cancer cells, so the whole cell population will present a fluorescent intensity gradient [30]. Hence, we impose a threshold of the fluorescent intensity during the passage of cells in the flow cytometer to define two subpopulations. The CD133+ population is the cell population that overexpresses the marker and thus is enriched in CSCs, while the CD133– population is the population of differentiated cells [28]. Therefore, we separate and isolate the CSC cell population from the differentiated one thanks to a fluorescent marker, before DEP characterizations of these populations. The results of the measured crossover frequencies f_{x01} and f_{x02} for both populations are presented in the violin plot (Figure 11).

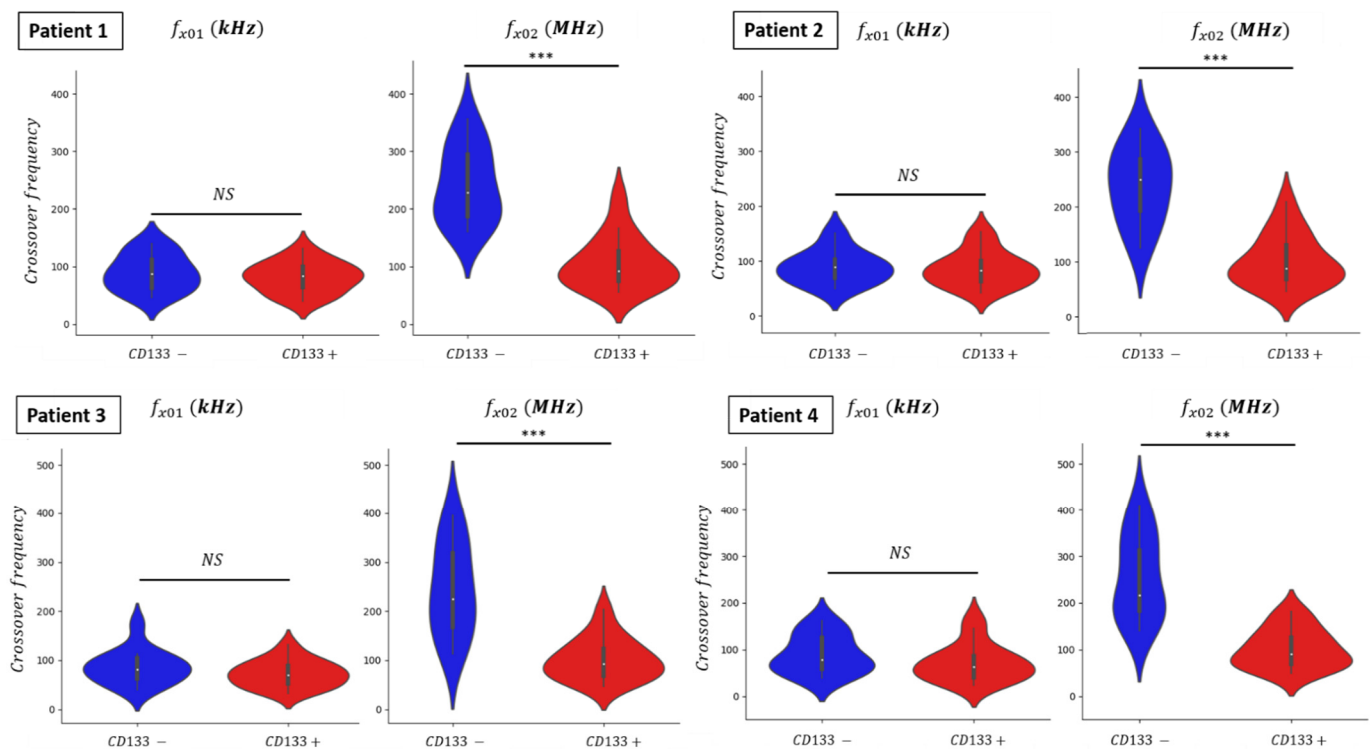


Figure 11. Graphic violin plot representation of crossover frequencies f_{x01} and f_{x02} of GBM primary cells collected from four different patients. *** represents p -value < 0.001 .

One should notice that the scale for the two crossover frequencies is the same except that the units are kHz and MHz for f_{x01} and f_{x02} , respectively. The data distribution of crossover frequencies f_{x01} and f_{x02} from the characterized glioblastoma cell shows similar violin plot shapes although cells were derived from four different patients (Figure 11). Indeed, we can expect from ex vivo GBM cells to be even more genetically heterogeneous from one patient to another than the immortalized U87-MG cell line. Median values of the crossover frequencies measured for each isolated population are reported in the Table 4. The obtained results highlight that our DEP cell analyzer lab-on-chip is a relevant and reliable tool to study and analyze either in vitro or ex vivo dissociated samples.

The distribution of the first crossover frequency f_{x01} is mostly the same for the two isolated populations, CD133– vs. CD133+. The median value of f_{x01} for the undifferentiated population (CD133+) shows no significant changes with the differentiated one. At low frequency, the largest signature dissimilarity between the two conditions corresponds to patient 4, where f_{x01} displays a change of 15 kHz between CD133– and CD133+ conditions (from 78 to 63 kHz). However, this difference is not statistically significant to discriminate the subpopulation of CSCs overrepresented in the CD133+ cells. The distribution of the second crossover frequency f_{x02} exhibits a difference despite an overlap among the measured values. This can be explained by the method of enrichment through flow cytometry. Indeed, the CD133 biomarker is not a binary label as the whole cell population might present different fluorescent intensities. With this fluorescent gradient, we choose a threshold to separate GBM cells into two subpopulations and to be selective toward CSC population. Thus, we can observe a decrease in the crossover frequency f_{x02} with the presence of the CD133+ cell pool. The median values of the second crossover frequency display the smallest change for patient 4, which is 125 MHz (from 216 to 91 MHz). The decrease in f_{x02} shows a significant difference between the two cell populations, as the p -value is lower than 10^{-3} . Moreover, one can notice in Figure 11 that at high frequency, the CD133+ cell population displays a stoutness around the median value compared to the CD133– cell, for whom the values are gathered around their median.

Table 4. Values of the crossover frequency measurements of the GBM primary culture extracted from tumor samples of four different patients.

	Cell Population	Crossover Frequency	Median Value
Patient 1	CD133–	f_{x01}	88 kHz
	CD133+		83 kHz
	CD133–	f_{x02}	229 MHz
	CD133+		92 MHz
Patient 2	CD133–	f_{x01}	89 kHz
	CD133+		83 kHz
	CD133–	f_{x02}	248 MHz
	CD133+		86 MHz
Patient 3	CD133–	f_{x01}	81 kHz
	CD133+		70 kHz
	CD133–	f_{x02}	225 MHz
	CD133+		92 MHz
Patient 4	CD133–	f_{x01}	78 kHz
	CD133+		63 kHz
	CD133–	f_{x02}	216 MHz
	CD133+		91 MHz

Such results validate that we can exploit the intracellular dielectric properties differences between differentiated and undifferentiated cells by measuring the second crossover frequency f_{x02} . The cells extracted from patients' GBM tumor samples show similar behavior as observed with an in vitro GBM cell line. The f_{x02} median value of ex vivo cells are not the same as in vitro results, but we can extrapolate that an ex vivo cell with a low f_{x02} could be a stem-like cell.

4. Conclusions

In this article, we used an innovative microfluidic device based on high-frequency dielectrophoresis for single-cell characterization in order to discriminate and identify the cancer stem cell subpopulation. First, we evaluated the discrimination capabilities of our microfluidic device in vitro on a glioblastoma cell line. U87-MG cells were cultured in two distinct conditions: one inducing differentiation and the second selecting immature and undifferentiated cells. Our results suggest that the expression of biological CSC markers and the measurement of the UHF crossover frequency f_{x02} are closely linked. At this frequency range, our lab-on-chip is able to interact with the intracellular content, which is more representative of the undifferentiated features of cells, making UHF-DEP greatly relevant to investigate the stemness status of cancer cells. As a first step towards clinical experiments, some GBM cells were extracted and cultured from patients' tumors. These GBM primary cells have been sorted into two subpopulations according to their expression level of CSC biomarker CD133. Whatever the considered patient, observed DEP signatures display the same profile. As previously identified, f_{x02} shows a more significant and more important difference between the two cell phenotypes than f_{x01} and so is confirmed to be a relevant CSC discriminant parameter. As primary culture cells are more representative of tumor than cell lines, we believe that it might be possible to transpose this capability of UHF-DEP cell characterization for recognizing "stemness" features from tumor cells derived to a broad range of GBM patients.

UHF-DEP is a very promising tool with great potential to discriminate cells according to their internal biological properties. Hence, from the identification of UHF-DEP signa-

tures, we can see the perspective to develop a cell sorting device for isolating cancer stem cells [31]. In the future, the early detection of CSC subpopulation in a glioma tumor with a UHF-DEP approach could have a prognosis value on therapeutic response and might allow adaptation of a therapeutic strategy following diagnosis.

Author Contributions: Conceptualization, E.L. and E.B.; methodology, R.M. and S.S.; software, E.L. and E.B.; formal analysis, E.L. and E.B.; investigation, E.L., E.B., R.M., S.S., F.M. and E.P.; data curation, A.P.; writing—original draft preparation, E.L.; writing—review and editing, E.L., C.D., F.L., A.P. and L.P.; supervision, A.P., C.D., B.B., F.L., L.P. and G.V.; project administration, A.P. and F.L.; funding acquisition, A.P., F.L., L.P. and G.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under grant number 737164, and by the Nouvelle Aquitaine Council with the Oncosome-track project and by funds from the Pediatric Research Institute Foundation (IRP 18/06). F.M. was supported by a fellowship from the Italian Association for Cancer Research (AIRC) (ID 19575). E.P. was supported by a fellowship from the Umberto Veronesi Foundation (#1142).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the committee of the Sperimentazione Clinic of Padova Provincia (n°2462P, 29 November 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study as described in the Materials and Methods paragraph.

Acknowledgments: We are grateful to Chiara Frasson (Pediatric Research Institute, Padova, Italy) for technical assistance in flow cytometry procedures.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cheray, M.; Bégaud, G.; Deluche, E.; Nivet, A.; Battu, S.; Lalloué, F.; Verdier, M.; Bessette, B. Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma. *Exon. Publ.* **2017**, *59*–71. [[CrossRef](#)]
2. Stupp, R.; Mason, W.P.; Bent, M.V.D.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.; Belanger, K.; Brandes, A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Goldsmith, H.S. Potential Improvement of Survival Statistics for Glioblastoma Multiforme (WHO IV). *Surg. Neurol. Int.* **2019**, *10*, 123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tabatabai, G.; Weller, M. Glioblastoma Stem Cells. *Cell Tissue Res.* **2011**, *343*, 459–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chen, J.; Li, Y.; Yu, T.-S.; McKay, R.M.; Burns, D.K.; Kernie, S.G.; Parada, L.F. A Restricted Cell Population Propagates Glioblastoma Growth after Chemotherapy. *Nature* **2012**, *488*, 522–526. [[CrossRef](#)]
6. Gossett, D.R.; Weaver, W.M.; Mach, A.J.; Hur, S.C.; Tse, H.T.K.; Lee, W.; Amini, H.; Di Carlo, D. Label-Free Cell Separation and Sorting in Microfluidic Systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3249–3267. [[CrossRef](#)]
7. Pethig, R.R. *Dielectrophoresis: Theory, Methodology and Biological Applications*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2017; ISBN 978-1-118-67145-0.
8. Cottet, J.; Fabregue, O.; Berger, C.; Buret, F.; Renaud, P.; Frénéa-Robin, M. MyDEP: A New Computational Tool for Dielectric Modeling of Particles and Cells. *Biophys. J.* **2018**, *116*, 12–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Afshar, S.; Fazelkhah, A.; Braasch, K.; Salimi, E.; Butler, M.; Thomson, D.J.; Bridges, G.E. Full Beta-Dispersion Region Dielectric Spectra and Dielectric Models of Viable and Non-Viable CHO Cells. *IEEE J. Electromagn. RF Microw. Med. Biol.* **2020**, *5*, 70–77. [[CrossRef](#)]
10. Fazelkhah, A.; Afshar, S.; Braasch, K.; Butler, M.; Salimi, E.; Bridges, G.; Thomson, D. Cytoplasmic conductivity as a marker for bioprocess monitoring: Study of Chinese hamster ovary cells under nutrient deprivation and reintroduction. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116*, 2896–2905. [[CrossRef](#)]
11. Cottet, J.; Fabregue, O.; Berger, C.; Buret, F.; Renaud, P.; Frénéa-Robin, M. MyDEP: A New Computational Tool for Dielectric Modeling of Particles and Cells. *Zenodo* **2019**. [[CrossRef](#)]
12. Pethig, R.; Menachery, A.; Pells, S.; De Sousa, P. Dielectrophoresis: A Review of Applications for Stem Cell Research. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *2010*, 182581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sato, N.; Yao, J.; Sugawara, M.; Takei, M. Numerical Study of Particle-Fluid Flow Under AC Electrokinetics in Elec-trode-Multilayered Microfluidic Device. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2018**, *66*, 453–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Du, X.; Ma, X.; Li, H.; Li, L.; Cheng, X.; Hwang, J.C.M. Validation of Clausius–Mossotti Function in Wideband Single-Cell Dielec-trophoresis. *IEEE J. Electromagn. RF Microw. Med. Biol.* **2019**, *3*, 127–133. [[CrossRef](#)]

15. Alazzam, A.; Stiharu, I.; Bhat, R.; Meguerditchian, A.-N. Interdigitated Comb-like Electrodes for Continuous Separation of Malignant Cells from Blood Using Dielectrophoresis. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 1327–1336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Choi, S.; Park, J.-K. Microfluidic system for dielectrophoretic separation based on a trapezoidal electrode array. *Lab Chip* **2005**, *5*, 1161–1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Vahey, M.D.; Voldman, J. An Equilibrium Method for Continuous-Flow Cell Sorting Using Dielectrophoresis. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3135–3143. [[CrossRef](#)]
18. Chung, C.; Pethig, R.; Smith, S.; Waterfall, M. Intracellular Potassium under Osmotic Stress Determines the Dielectrophoresis Cross-over Frequency of Murine Myeloma Cells in the MHz Range. *Electrophoresis* **2018**, *39*, 989–997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chung, C.; Waterfall, M.; Pells, S.; Menachery, A.; Smith, S.; Pethig, R. Dielectrophoretic Characterisation of Mammalian Cells above 100 MHz. *J. Electr. Bioimpedance* **2011**, *2*, 64–71. [[CrossRef](#)]
20. Manczak, R.; Saada, S.; Tanori, M.; Casciati, A.; Dalmay, C.; Bessette, B.; Begaud, G.; Battu, S.; Blondy, P.; Jauberteau, M.O.; et al. High-Frequency Dielectrophoresis Characterization of Differentiated vs Undifferentiated Medulloblastoma Cells. In Proceedings of the 2018 EMF-Med 1st World Conference on Biomedical Applications of Electromagnetic Fields (EMF-Med); 2018; pp. 1–2. [[CrossRef](#)]
21. Casciati, A.; Tanori, M.; Manczak, R.; Saada, S.; Tanno, B.; Giardullo, P.; Porcù, E.; Rampazzo, E.; Persano, L.; Viola, G.; et al. Human Medulloblastoma Cell Lines: Investigating on Cancer Stem Cell-Like Phenotype. *Cancers* **2020**, *12*, 226. [[CrossRef](#)]
22. Pistollato, F.; Persano, L.; Della Puppa, A.; Rampazzo, E.; Basso, G. Isolation and Expansion of Regionally Defined Human Glioblastoma Cells In Vitro. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* **2011**, *17*, 3.4.1–3.4.10. [[CrossRef](#)]
23. Pistollato, F.; Abbadi, S.; Rampazzo, E.; Persano, L.; Della Puppa, A.; Frasson, C.; Sarto, E.; Scienza, R.; D’Avella, D.; Basso, G. Intratumoral Hypoxic Gradient Drives Stem Cells Distribution and MGMT Expression in Glioblastoma. *Stem Cells* **2010**, *28*, 851–862. [[CrossRef](#)]
24. Frasson, C.; Rampazzo, E.; Accordi, B.; Beggio, G.; Pistollato, F.; Basso, G.; Persano, L. Inhibition of PI3K Signalling Selectively Affects Medulloblastoma Cancer Stem Cells. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 973912. [[CrossRef](#)]
25. Hjeij, F.; Dalmay, C.; Bessaudou, A.; Blondy, P.; Pothier, A.; Bessette, B.; Bégaud, G.; Jauberteau, M.O.; Lalloué, F.; Kaynak, C.B.; et al. UHF Dielectrophoretic Handling of Individual Biological Cells Using BiCMOS Microfluidic RF-Sensors. In Proceedings of the 2016 46th European Microwave Conference (EuMC), London, UK, 4–6 October 2016; pp. 265–268. [[CrossRef](#)]
26. Suslov, O.N.; Kukekov, V.G.; Ignatova, T.N.; Steindler, D.A. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14506–14511. [[CrossRef](#)]
27. Pethig, R.; Bressler, V.; Carswell-Crumpton, C.; Chen, Y.; Foster-Haje, L.; García-Ojeda, M.E.; Lee, R.S.; Lock, G.M.; Talary, M.S.; Tate, K.M. Dielectrophoretic Studies of the Activation of Human T Lymphocytes Using a Newly Developed Cell Pro-filing System. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2057–2063. [[CrossRef](#)]
28. Li, Z. CD133: A Stem Cell Biomarker and Beyond. *Exp. Hematol. Oncol.* **2013**, *2*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ren, F. CD133: A cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 2603–2611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kemper, K.; Sprick, M.; De Bree, M.; Scopelliti, A.; Vermeulen, L.; Hoek, M.; Zeilstra, J.; Pals, S.T.; Mehmet, H.; Stassi, G.; et al. The AC133 Epitope, but not the CD133 Protein, Is Lost upon Cancer Stem Cell Differentiation. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 719–729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Provent, T.; Mauvy, A.; Manczak, R.; Saada, S.; Dalmay, C.; Bessette, B.; Lalloué, F.; Pothier, A. A High Frequency Dielectrophoresis Cytometer for Continuous Flow Biological Cells Refinement. In Proceedings of the 2020 50th European Microwave Conference (EuMC), Utrecht, The Netherlands, 12–14 January 2021; pp. 921–924. [[CrossRef](#)]

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des résultats des Figures 30 et 31, les valeurs obtenues représentant la moyenne des triplicats

Figure 30 : Proportions cellulaires (%)				
	LTc	LTh	LTreg	NK
A NT	74,8	82,2	30,9	18,2
A T NM	73,9	96,0	30,4	13,7
A T DM	77,5	97,5	28,5	14,7
Figure 31 : Niveau d'activation cellulaire				
	LTc		NK	
	%	MFI	%	MFI
A NT	17,9	4599	13,9	5569
A T NM	21,7	4366	18,9	5205
A T DM	22,9	3818	21,7	4205

A NT : Activées Non Traitées

A T NM : Activées et Traitées avec des EVs provenant de cellules cultivées en NM (= ϕ différenciées)

A T DM : Activées et Traitées avec des EVs provenant de cellules cultivées en DM (CSCs)

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les Figures 32 et 33, les valeurs obtenues représentant la moyenne des triplicats

Figure 32 : Expression des checkpoints par les lymphocytes T							
		LT		LTc		LTh	
		%	MFI	%	MFI	%	MFI
A NT	PD-1	7,3	8722	12,6	6915	11,9	2931
	PD-L1	99,6	68 952	/		7,8	5275
	PD-L2	9,9	6779	2,8	7485	42,2	13 601
A T NM	PD-1	16,7	8933	22,8	6883	15,2	2898
	PD-L1	99,8	86 388	/		8,9	5904
	PD-L2	23,9	6987	4,8	7424	53,2	14 310
A T DM	PD-1	16,99	8866	17,9	6736	15,4	2933
	PD-L1	99,9	137 349	/		7,1	5563
	PD-L2	23,2	5931	2,9	7289	51,1	14 169

Figure 33 : Expression des checkpoints par les cellules NK

		%	MFI
A NT	PD-1	1,6	11 220
	PD-L1	35,1	3859
	PD-L2	0,02	30 082
A T NM	PD-1	2,2	10 235
	PD-L1	36,3	4044
	PD-L2	0,07	54 948
A T DM	PD-1	1,7	11 699
	PD-L1	40,9	3753
	PD-L2	0,02	22 740

A NT : Activées Non Traitées

A T NM : Activées et Traitées avec des EVs provenant de cellules cultivées en NM (= \emptyset différenciées)

A T DM : Activées et Traitées avec des EVs provenant de cellules cultivées en DM (CSCs)

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) constitue la deuxième cause de décès par cancer en France, faisant de cette maladie un véritable problème de santé publique. Malgré une prise en charge thérapeutique variée ayant permis d'améliorer considérablement la survie des patients, des rechutes surviennent fréquemment et font suite à une maladie résiduelle minimale. Cette dernière est la conséquence d'une résistance thérapeutique portée par une sous-population de cellules tumorales nommées les cellules souches cancéreuses (CSCs). Ces CSCs demeurent un véritable défi de caractérisation du fait de leur phénotype très plastique. Pour remédier à cela, un laboratoire sur puce basé sur la technique de diélectrophorèse à ultra-haute fréquence (DEP-UHF) a été élaboré. Ce biocapteur mesure individuellement la signature électromagnétique (EM) des cellules reflétant leur contenu intracellulaire. Des lignées cellulaires ainsi que des cultures primaires de CCR, cultivées en milieux normal ou défini pour enrichir respectivement la population cellulaire en cellules différenciées ou en CSCs ont été utilisées. Les résultats ont démontré que la signature EM des CSCs est constamment plus basse que celle des cellules différenciées. De plus, la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs) par les cellules cancéreuses influe considérablement sur la progression tumorale. Le traitement de cellules peu agressives par des EVs provenant de CSCs a mis en évidence un transfert d'agressivité détectable par le biocapteur, parfois même lorsque les outils conventionnels n'indiquaient aucune variation. Ces travaux démontrent la pertinence de ce laboratoire sur puce par rapport aux techniques classiques de biologie car il permet d'analyser rapidement les cellules sans les marquer au préalable. De plus, une forte proportion de CSCs étant corrélée à un risque élevé de rechutes dans le CCR, la mise au point d'une méthode de tri basée sur la DEP-UHF faciliterait leur détection précoce afin d'adapter la prise en charge thérapeutique.

Mots-clés : Cancer colorectal, cellules souches cancéreuses, vésicules extracellulaires, diélectrophorèse, laboratoire sur puce, signature électromagnétique.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the second most deadly cancer in France, making this disease a real public health issue. Despite many therapeutic regimens that have considerably improved patients' survival, relapses frequently occur because of a minimal residual disease. This is the consequence of a therapeutic resistance carried by a particular subpopulation of tumor cells called cancer stem cells (CSCs). These CSCs remain a challenge to characterize because of their plastic phenotype. To undergo this, a lab-on-a-chip based on the ultra-high frequency dielectrophoresis (UHF-DEP) technique has been developed. This biosensor individually measures the electromagnetic (EM) signature of cells reflecting their intracellular content. Cell lines as well as primary cultures of CRC, cultured in normal or define media to enrich the cell population with differentiated cells or CSCs respectively, were used. The results showed that the EM signature of CSCs is consistently lower than that of differentiated cells. Furthermore, the secretion of extracellular vesicles (EVs) by cancer cells significantly influences tumor progression. Treatment of low aggressive cells with EVs from CSCs revealed a transfer of aggressiveness detectable by the biosensor, sometimes even when conventional tools indicated no variation. This work demonstrates the relevance of this lab-on-a-chip compared to standard biology techniques because it allows a rapid analysis of cells without any labeling. Moreover, a high proportion of CSCs is correlated with a high risk of relapse in CRC, the development of a sorting method based on UHF-DEP would facilitate their early detection in order to adapt the therapeutic management.

Keywords : Colorectal cancer, cancer stem cells, extracellular vesicles, dielectrophoresis, lab-on-a-chip, electromagnetic signature.

