

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTE**

PREPAREE A L'INSERM U1231

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Doctorat de Biochimie, Biologie Moléculaire

Par

Lucie DEMONTOUX

**Rôle de l'hypotonie dans la réponse à la chimiothérapie intra-péritonéale :
étude des effets sur la mort des cellules cancéreuses et la mort immunogène
induite.**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le vendredi 9 novembre 2018

Composition du Jury :

Pr. Bruno CHAUFFERT

Dr. Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL

Dr. Jean-Luc PERFETTINI

Dr. Yann GODET

Dr. Cédric REBE

Praticien hospitalier - CHU - AMIENS

DR - INSERM U1085 - RENNES

DR - INSERM U1030 - VILLEJUIF

MCF - INSERM U1098 - BESANCON

Ingénieur biologiste - CGFL - DIJON

Président du jury

Rapporteuse

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement les docteurs Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel et Jean-Luc Perfettini pour le temps consacré à examiner ce manuscrit en qualité de rapporteur. Je remercie également le professeur Bruno Chauffert pour avoir suivi mon travail pendant mes trois années de thèse lors de mes comités de suivi de thèse (merci pour vos remarques encourageantes) et pour avoir accepté de juger ce travail une dernière fois en tant qu'examineur et pour finir je remercie le docteur Yann Godet second membre examinateur de ce jury. J'espère que ce travail sera conforme à vos attentes.

Je souhaite ensuite remercier le professeur François Ghiringhelli pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet.

Mes plus sincères remerciements au docteur Cédric Rébé, mon directeur de thèse, sans qui ce travail n'aurait pas été ce qu'il est. Merci pour tout, que ce soit pour le côté scientifique mais également pour le côté humain. Merci pour ton aide dans la gestion et l'avancée du projet, ta rigueur scientifique, ta pédagogie, tes relectures et tes conseils sur mes différents posters, rapports et surtout pour ce manuscrit. Merci pour les innombrables conversations privées que l'on a pu avoir et désolé encore de t'avoir fait subir mes « ascenseurs émotionnels » comme tu as pu me dire une fois. Merci d'avoir été un des rares « chef humain » et de m'avoir permis d'être autonome, c'est cela qui m'a donné le courage de continuer et surtout de terminer ma thèse. Même si je sais que ça n'a pas été toujours facile. Un grand merci.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe (anciens et actuels). Notamment l'ancienne équipe de Cédric : le docteur Valentin Derangère pour m'avoir appris les techniques de laboratoire, m'avoir encadrée, pour son immense savoir et sa capacité à répondre à toutes mes questions lors de ma formation en stages de M1 et M2 et pour m'avoir guidée au début de ce projet. Un grand merci à Angélique Chevriaux, ma voisine de bureau, ma conseillère, tu ne peux pas savoir à quel point ton départ a laissé un vide. Je regrette de ne plus avoir tes conseils pour les manips et ton aide en cas de coups durs. Merci à Flavie pour ton aide, j'étais vraiment bien entourée pour mes débuts dans la recherche, j'ai été chanceuse de t'avoir. Merci à Pierre, le plus silencieux de l'équipe.

Fanny, ma nouvelle voisine de bureau, heureusement que tu m'as rejoint ! Nos conversations de filles sur tout et rien rendent les journées bien moins longues. Merci pour ton coaching avec la manip des lymphocytes T ! Et également pour tout le reste, tu m'as vue dans tous mes états pour cette fin de thèse... Les garçons, Romain et Antoine, on s'est suivit dans cette galère de thèse, je ne sais pas pour vous, mais moi ça m'a aidé de ne pas être la seule au même stade, et nos bières aussi m'ont bien aidée ! Théo, je n'ai pas arrêté de le dire mais on t'a intégré beaucoup trop vite mdr ! Non sans rire, on est bien content que tu nous aies rejoint. On rigole bien tous ensemble, même quand ça va mal et qu'on veut crier quéquette ! C'est peut-être parce qu'on est complètement siphonnés ?! Ou bien, c'est la thèse qui nous a rendu comme ça... Mel, je suis bien contente que tu sois revenue, un petit mélange de savoir et d'humour rien que ça ! Merci Christ pour ton aide avec les méandres de l'administratif (où j'ai tellement de mal) et tes encouragements lorsque j'étais vraiment fatiguée.

Je n'oublie pas, bien sûr, les anciens qui sont partis : Lucile, mon binôme des neiges !! On a passé nos années de master à se serrer les coudes, à se motiver et à rigoler, on était vraiment un binôme de choc ! La suite sans toi a été beaucoup moins simple, heureusement qu'on avait les restos entre copines (pas assez nombreux...) pour rattraper le temps qu'on ne passait plus ensemble. Ossama, on a vraiment passé de supers moments depuis ton arrivé en M2, je ne te remercierai jamais assez pour ta bonne humeur et ton côté tellement positif sur les choses. Tu contre balançais bien mon côté pessimiste en ce début de thèse. Et merci aussi pour les séances de volley/danse/chant ! Je suis heureuse de te compter parmi mes amis. Nos soirée Staff et ciné avec les copains sont vraiment géniales, un vrai bol d'air ! Hélène, celle qui a su trouver les mots pour me booster pendant le M2 et pour la MRT, merci de m'avoir donné confiance en moi. Etienne, je ne sais pas si tu te souviens, mais tu m'as dit une phrase en sortant d'une de mes présentations en réunion FG (en fin de première année), cette phrase m'a portée pendant un bout de temps lorsque je n'allais pas bien, pour ça et tout ce que tu savais et faisais pour nous tous au labo, merci. Alexia, merci pour t'être ouverte au cours de ma thèse, tu es vraiment d'une gentillesse incroyable. Marion, merci pour tes conseils et encouragements avant chaque étape difficile ou non. Emeric, merci pour le temps que tu as pu m'accorder afin de m'aider à régler les problèmes avec le *vivo*, tu as vraiment été d'une grande aide. Tes phrases grivoises bien placées me manquent aussi, mdr. Lisa et Aodrenn merci pour toutes les fois où vous m'avez sauvée avec les cellules, et bien sûr pour l'aide apportée pour les tests sur les souris.

Je veux également remercier mon bureau d'accueil ! Les filles du deuxième (même si maintenant, il y a aussi les garçons avec vous) : Andréa, Isis, Ludivine, Tiff Tiff, Elise, Aurélie et Carole, pour l'aide pour les ELISA, les mesures de souris, le congrès, les repas du midi, les pauses thé, les conversations sur nos vies, les bières/frites O'Bareuzai, les autres bières mdr, les concerts, les rigolades et tout ce que j'oublie de citer... En gros, merci pour votre soutien dans les moments où ça allaient et ceux où ça n'allaient pas du tout, vous êtes géniales !!

Mes remerciements chaleureux également à l'ensemble des équipes du troisième étage, avec qui j'ai pu échanger sur les expériences mais également sur notre humeur du moment. François pour nos pas de danses dans le couloir, Burhan pour les vannes au détour des couloirs, Lucile pour nos anciennes pauses thé, Cémile pour nos conversations et tous les gâteaux ! Et Baptiste pour tous les arrêts dans le couloir où l'on a pu discuter de nos expériences et de la vie de thésard, pour nos coups de main en manips, nos coups de gueule, pour les soirées Staff et gaming/film chez toi, les cinés, les restos, bref pour être un vrai copain ! Cette thèse m'aura apporté de chouettes rencontres.

Cette thèse m'aura également permis d'avoir la chance d'encadrer des étudiants, une de mes parties préférées de la thèse. Parce que de vous avoir eu avec moi pendant un petit bout de chemin pendant ce projet m'aura vraiment aidé et vous l'avez tous soutenue, merci à : Harmonie, Aurélie, Alexandre, Chloé et Thomas.

Je vous souhaite à tous de réussir ce que vous entreprendrez dans la vie.

Je profite également de ces pages pour remercier mes amies de toujours, Diana et Amandine. On peut dire que depuis le collègue vous n'avez jamais douté de moi. Merci pour votre soutien, pour m'avoir écouté parler si longtemps quand je n'en pouvais plus. Merci pour ces journées shopping sur Dijon où je pouvais vraiment décrocher du labo. Je sais que je n'ai pas été très présente ces trois dernières années, mais je sais que vous comprenez et que vous me pardonnez ! Je vais changer ça n'en douter pas. Je sais que nous serons là les unes pour les autres pour les grandes étapes de nos vies, et ça, ça n'a pas de prix. Merci également à Kathy et Elise, même si nous n'avons pas pu nous voir régulièrement.

Un immense merci à ma famille sans qui je n'aurai pas mené à bout ce projet. Maman, papa, Aline et Anne, merci pour tout, pour votre amour. Pour m'avoir conseillée, écoutée, motivée, poussée... Pour avoir cherché avec moi les solutions lorsque mon projet n'avancait pas comme je voulais, même si vous n'êtes pas tous scientifiques, merci d'avoir essayé avec votre

regard extérieur de m'aiguiller sur d'autres approches. Merci pour votre patience avec moi. Merci pour tous les câlins, j'en ai tellement eu besoin. Je sais que vous avez toujours cru en moi, beaucoup plus que moi-même ! Vous êtes mes piliers, je vous aime tous tellement. J'espère que vous serez fière de moi. Je tiens à remercier mes grands-parents qui ont toujours cru en moi. Un grand merci à ma marraine, Eric, Jéjé, Ade et Laurie, pour tous les moments passés en famille, les noëls, les anniversaires, les vacances et tous les autres moments. Merci pour vos encouragements et votre soutien tout le long.

Je tiens à remercier la famille de Simon pour leur accueil et pour la place qu'ils ont su me faire. Merci Alain, Marie-Estelle, Pauline, Thomas et Louise, je me suis sentie bienvenue et aimée. Merci pour tous les moments de rigolades, votre soutien et tous vos encouragements.

Ces dernières lignes de remerciement sont pour la plus belle rencontre de ma thèse, pour Simon. Le seul mot « merci » ne suffit pas pour tout ce que tu as pu m'apporter. Pour ton amour, ton soutien inconditionnel, tes paroles réconfortantes, tes coups de pieds aux fesses... Je n'aurai jamais pensé avoir la chance de trouver un partenaire de vie comme toi. Pour tous les moments magiques qu'on a vécus, tout ce que tu as pu me faire découvrir et tout ce qui nous reste à vivre tous les deux, Merci. Je t'aime mon amour.

Je crois que sans le soutien de chacun de vous je n'aurai pas tenu, je n'aurai pas pu dire avec fierté que je suis docteur !

MERCI.

Résumé

La Chimiothérapie IntraPéritonéale (CIP) est utilisée couramment pour traiter le cancer colorectal métastatique. Cependant il n'existe pas de protocole standardisé.

Le but de ce projet a été de modéliser cette chimiothérapie *in vitro* et de comprendre le rôle de l'hypotonie dans ce modèle et son impact sur la mort des cellules cancéreuses.

Nous avons déterminé les conditions optimales de traitement sur les cellules cancéreuses coliques humaines HCT116 à savoir une exposition des cellules pendant 30 minutes à 400µM d'oxaliplatine en conditions hypotoniques (G2.5%) à 37°C. Ces résultats ont été validés sur différentes lignées cancéreuses coliques humaines et murine. Nous avons également montré que ces conditions de traitements étaient également capables d'augmenter la cytotoxicité d'autres dérivés du platine comme le cisplatine et le carboplatine.

La mort cellulaire induite par ce traitement en hypotonie est de type apoptotique, et peut s'expliquer par une augmentation de l'incorporation intracellulaire d'oxaliplatine, en partie due à l'activation et à la trimérisation du transporteur du cuivre CTR1.

Le traitement par l'oxaliplatine et le cisplatine (mais pas par le carboplatine) en hypotonie entraîne également les stigmates de la mort immunogène, à savoir l'exposition de la calréticuline à la membrane, la libération d'ATP et le relargage d'HMGB1, suggérant que l'hypotonie permettrait d'entraîner la mort immunogène et une réponse du système immunitaire lors de cette modélisation de CIP.

Enfin, *in vivo* nous avons pu mettre en évidence que le traitement de métastases intrapéritonéales de souris Balb/c par une injection intrapéritonéale d'oxaliplatine en hypotonie permettait un ralentissement de l'apparition de nodules tumoraux et une augmentation de la survie des souris.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence dans ce travail que l'hypotonie est un des paramètres fondamentaux de la CIP et suggère que son utilisation pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la CIP et de prolonger la survie des patients.

Abstract

IntraPeritoneal Chemotherapy (IPEC) is commonly used to treat colorectal cancer metastases. However there is no standardized protocol.

The aim of this work was to model this chemotherapy *in vitro* and to understand the role of hypotonic conditions in this model and its impact on cell death.

We determined that the optimal treatment parameters on HCT116 human colon cancer cells, were an exposure of the cells for 30 minutes to 400 μ M of oxaliplatin under hypotonic conditions (G2.5%) at 37 °C. These results have been validated on various human and murine colic cancer cell lines. We have also shown that these treatment conditions are able to increase the cytotoxicity of other platinum derivatives such as cisplatin and carboplatin.

The cell death induced by this treatment in hypotonia is apoptosis, and can be explained by an increase in the intracellular incorporation of oxaliplatin, partly due to the activation and trimerization of the CTR1 copper transporter.

Treatment with oxaliplatin and cisplatin (but not carboplatin) in hypotonia also leads to the stigmata of immunogenic death, e.i. exposure of calreticulin at the membrane, release of ATP and HMGB1 in the supernatant, suggesting that hypotonia would entail immunogenic death and an immune system response during this IPEC modeling.

Finally, we have been able to demonstrate *in vivo* that the treatment of intraperitoneal metastases of Balb/c mice by an intraperitoneal injection of oxaliplatin in hypotonia slowed down tumor nodules appearance and increased survival of the mice.

Thus, in this work we highlighted that hypotonia is one of the fundamental parameters of IPEC which suggests that its use could make it possible to increase the efficacy of IPEC and maybe to prolong the survival of patients.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	- 7 -
TABLE DES FIGURES	- 9 -
TABLE DES TABLEAUX	- 10 -
LISTE DES ABREVIATIONS	- 11 -
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	- 14 -
I. Le cancer colorectal	- 15 -
1. Epidémiologie – incidence et mortalité	- 15 -
2. Etiologie - Facteurs de risques environnementaux et génétiques	- 16 -
3. Tumorigenèse du cancer colorectal	- 17 -
a. Mutagenèse du cancer colorectal	- 17 -
b. Caractéristiques des cellules cancéreuses	- 22 -
c. Anatomicopathologie	- 23 -
d. Classifications: TNM (<i>Tumor Node Metastasis</i>)	- 24 -
4. Traitements du cancer colorectal	- 26 -
a. La chirurgie	- 27 -
b. La radiothérapie	- 29 -
c. La chimiothérapie	- 29 -
d. L'immunothérapie	- 31 -
II. Les métastases péritonéales d'origine colique	- 32 -
1. Carcinose péritonéale	- 32 -
2. CHIP : Chimiothérapie Hyperthermique IntraPéritonéale	- 34 -
a. Généralités	- 34 -
b. Molécules de chimiothérapie utilisées pour la chimiothérapie intrapéritonéale	- 34 -
c. Méthodes ou agents potentialisateurs utilisés pour la chimiothérapie intrapéritonéale	- 35 -
d. Bilan du protocole de CHIP	- 36 -
III. Chimiothérapies et morts cellulaires	- 38 -
1. Molécules de chimiothérapie	- 38 -
a. Le cisplatine	- 40 -
b. Le carboplatine	- 42 -
c. L'oxaliplatine	- 42 -
2. Morts cellulaires conventionnelles	- 44 -
a. L'apoptose	- 44 -
b. Mort cellulaire par autophagie	- 49 -
c. La nécrose	- 55 -

3.	Mort cellulaires atypiques.....	- 58 -
a.	Entose	- 58 -
b.	Ferroptose	- 58 -
c.	Pyroptose	- 59 -
d.	Parthanatose.....	- 59 -
e.	Mort cellulaire NETotic.....	- 59 -
f.	Mort cellulaire lysosome dépendante	- 60 -
IV.	Chimiothérapie et modulation de la réponse immunitaire : Mort cellulaire immunogène	- 61 -
1.	Immunogénicité de la mort cellulaire induite par chimiothérapie.....	- 61 -
2.	Stress du réticulum endoplasmique et exposition membranaire de la calréticuline	- 62 -
3.	Relargage d'ATP	- 63 -
4.	Libération d'HMGB1.....	- 64 -
5.	Sécrétion d'autres signaux de danger	- 65 -
	Objectif de la thèse	- 68 -
	PARTIE EXPERIMENTALE	- 69 -
I.	Introduction :	- 70 -
II.	Matériels et méthodes	- 71 -
1.	Lignées cellulaires	- 71 -
2.	Réactifs et traitements.....	- 71 -
3.	Tests de viabilité	- 72 -
4.	Dosage intracellulaire du platine par spectrométrie d'absorption atomique	- 73 -
5.	Western Blotting	- 73 -
6.	Immunofluorescence.....	- 74 -
7.	Détermination de la mort cellulaire	- 75 -
8.	Marquage Calréticuline.....	- 75 -
9.	Dosage ATP dans le surnageant	- 76 -
10.	Dosage HMGB1 dans le surnageant	- 76 -
11.	Infiltrats tumoraux	- 76 -
12.	Modèle de carcinose péritonéale.....	- 77 -
13.	Tests statistiques	- 77 -
III.	Résultats	- 78 -
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	- 93 -
	CONCLUSION GENERALE	- 107 -
	BIBLIOGRAPHIE	- 109 -
	ANNEXES	- 120 -

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition du cancer colorectal selon le contexte génétique.	- 16 -
Figure 2 : Modèle de tumorigenèse colique en fonctions des changements génétiques et histologiques impliqués dans la progression tumorale.	- 21 -
Figure 3 : Les 10 caractéristiques fondamentales des cellules tumorales.	- 22 -
Figure 4 : Peritoneal Cancer Index.	- 33 -
Figure 5 : Aspects morphologiques du processus d'apoptose d'une cellule.	- 45 -
Figure 6 : Représentation simplifiée de l'apoptose extrinsèque.	- 47 -
Figure 7 : Représentation simplifiée de l'apoptose intrinsèque.	- 49 -
Figure 8 : Aspects morphologiques du processus d'autophagie d'une cellule.	- 50 -
Figure 9 : Schéma de la régulation de la macroautophagie (autophagie).	- 52 -
Figure 10 : Les rôles doubles et contradictoires de l'autophagie dans le cancer.	- 54 -
Figure 11 : Aspects morphologiques du processus de nécrose d'une cellule.	- 56 -
Figure 12 : La nécrose régulée.	- 57 -
Figure 13: Mécanisme de mort cellulaire immunogène induite par la chimiothérapie. ...	- 67 -
Figure 14 : L'hypotonie augmente la mort cellulaire médiée par les dérivés du platine 1. -	78 -
Figure 15 : L'hypotonie augmente la mort cellulaire médiée par les dérivés du platine 2. -	79 -
Figure 16 : L'hypotonie augmente la mort cellulaire médiée par les dérivés du platine 3. -	79 -
Figure 17: L'hypotonie augmente la mort cellulaire médiée par les dérivés du platine 4. -	80 -
Figure 18 : L'hypotonie augmente la mort cellulaire médiée par les dérivés du platine 5. -	81 -
Figure 19 : L'hypotonie améliore l'incorporation cellulaire de l'oxaliplatine par l'intermédiaire de CTR1 1.	- 83 -
Figure 20 : L'hypotonie améliore l'incorporation cellulaire de l'oxaliplatine par l'intermédiaire de CTR1 2.	- 84 -
Figure 21 : L'hypotonie augmente la mort par apoptose médiée par l'oxaliplatine.	- 85 -
Figure 22 : L'hypotonie induit l'exposition de la calréticuline lors d'un traitement par l'oxaliplatine.	- 86 -
Figure 23 : L'hypotonie induit le relargage d'ATP lors d'un traitement par l'oxaliplatine et le cisplatine.	- 87 -
Figure 24 : L'hypotonie induit le relargage d'HMGB1.	- 88 -
Figure 25 : Le traitement par l'oxaliplatine en hypotonie entraine le recrutement et l'activation des lymphocytes T CD8 au sein de la tumeur.	- 89 -
Figure 26 : Le traitement par l'oxaliplatine en hypotonie entraine un ralentissement du développement tumoral dans un modèle murin de carcinose péritonéale <i>in vivo</i>.	- 90 -
Figure 27 : L'hypotonie augmente la mort cellulaire médiée par les chimiothérapies entraînant des dommages à l'ADN.	- 91 -

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de stade du cancer colorectal	- 26 -
Tableau 2 : Types de colectomies du cancer	- 27 -
Tableau 3 : Nature du traitement du cancer colorectal selon l'avancé de la maladie	- 29 -
Tableau 4 : Exemple de protocoles de chimiothérapie les plus communs pour le traitement du cancer colorectal.....	- 30 -
Tableau 5 : Classification des chimiothérapies	- 38 -
Tableau 6 : Les dérivés du platine	- 40 -

LISTE DES ABREVIATIONS

5-FU : 5-fluorouracile	CIN : <i>Chromosomal INstability</i>
Ac : anticorps	CIP : Chimiothérapie IntraPéritonéale
AIF : <i>Apoptosis-Inducing Factor</i>	CisPt : CisPlatine
AJCC : <i>American Joint Committee on Cancer</i>	CMH1 : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
AMC : autophagie médiée par les protéines chaperonnes	CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
ANXA1 : ANneXine A1	CRT : calréticuline
APAF-1 : <i>Apoptotic Peptidase Activating Factor 1</i>	CTLA-4 : <i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4</i>
APC : <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>	cTNM : classification clinique de prétraitement TNM
ATG : <i>AuTophagy-related Genes</i>	CTR1 : transporteur de cuivre 1
Bak : <i>BCL2-antagonist/killer</i>	CTX : Cyclophosphamide
Bax : <i>BCL2-associated X</i>	Cu : Cuivre
BAX : Protéine X associée au BCL2	CXCL10 : <i>CXC-Chemokine Ligand 10</i>
Bcl-2 : <i>B-cell lymphoma 2</i>	CYPD : <i>CYcloPhilin D</i>
BCR-ABL1 : <i>Breakpoint Cluster Region-ABL proto-oncogene 1</i>	DACH : DiAminoCycloHexane
BID : <i>BH3-Interacting Domain</i>	DAMPs : <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
BLM : BLéoMycine	DC : <i>Dendritic Cell</i>
CAD : <i>Caspase Activated-DNase</i>	DD : <i>Death Domain</i>
CarboPt : CarboPlatine	DIABLO : <i>Direct IAP-Binding protein with LOw pI</i>
Caspases : cysteinyl-aspartate-cleaving protease	DISC : <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
cFLIP : <i>cellular FLICE (FADD-Like IL-1β-Converting Enzyme)-Like Inhibitory Protein</i>	DNMT3B : ADN méthyltransférase-3B
cGAMP : GMP-AMP cyclique	DXR : DoXoRubicine
cGAS : GMP-AMP cyclique synthase	eIF2 α : <i>Eukaryotic Initiation Factor 2α</i>
CHIP : Chimiothérapie Hyperthermique Intra-Péritonéale	ENDOg: ENDOnucléase G
CIMP : <i>CpG Island Methylator Phenotype</i>	FADD : <i>Fas Associated protein with a Death Domain</i>
	FAP : <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>

FAS : *FAs cell Surface death receptor*

FASL : FAS ligand

FDA: *Federal Drug Administration*

FELASA : *FEderation for Laboratory Animal Science Associations*

FOLFIRI : 5-FU/acide folinique + Irinotecan

FOLFOX : 5-FU/acide folinique + Oxaliplatine

FSB : *Flow cytometry Solution Buffer*

G2.5% : Glucose 2.5%

GPX4 : Gluthation-PeroXydase 4

HDAC2 : Histone DeACetylase 2

HMGB1 : *High-Mobility Group Box 1*

HNPCC : *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*

HSP70 : *Heat Shock Protein 70*

HSP90 : *Heat Shock Protein 90*

HTRA2 : *High Temperature Requirement protein A2*

Hypo : hypotonie

IAPs : *Inhibitor of Apoptosis*

ICD : *Immunogenic Cell Death*

INCa : Institut National du Cancer

IRF3 : *Interferon Regulatory Factor 3*

Iso : isotonie

kDa : kilodaltons

LAMP1 : *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*

LC3 II : *Light Chain 3II*

LPS : LipoPolySaccharide

LV5FU2 : 5-FU/acide folinique

Mel : Melphalan

Mito c : Mitomycine c

MLKL : *Mixed Lineage Kinase domain Like pseudo kinase*

MMR : système de réparation des mésappariements

MMRd : tumeurs déficientes en MMR

MMRp : tumeurs au système MMR compétant

MMS : microsatellite stable

MPT-driven necrosis : *Mitochondrial Permeability Transition-driven necrosis*

MSI : *MicroSatellite Instability*

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

MTX : MéthoTreXate

NCCD : *Nomenclature Committee on Cell Death*

NER : système de réparation des nucléotides

NET : pièges extracellulaires neutrophiles

NF-κB : *Nuclear Factor-kappa B*

NK : *Natural Killer*

OCT1 et OCT2 : transporteurs de cations organiques

OxPt : Oxaliplatine

p62 : *promyelocytic leukemia – retinoic acid receptor alpha PML-RARA*

PANX1 : PANneXine-1

PARP : *Poly (ADP-Ribose) Polymérase*

PARP1 : *Poly (ADP-ribose) polymérase 1*

PBS : tampon salin phosphate

PBST : tampon salin phosphate tween

PCI : *Peritoneal Cancer Index*

PCT : PaCliTaxel

PD-1 : *Programmed cell Death protein-1*

PDIA3 : *Protein Disulfide Isomerase Family A member 3*

PDL-1 : *Programmed cell Death Ligand-1*

PERK : *Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*

PFA : ParaFormAldehyde

PMN : neutrophiles PolyMorphoNucléaires

PRR : récepteurs de reconnaissance de pathogènes

PSA : PeniStreptomycine-Amphotéricine B

pTNM : classification histopathologique post-chirurgicale

PTPC : *Permeability Transition Pore Complex*

RAGE : *Receptor for Advanced Glycation End products*

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

RE : Réticulum Endoplasmique

RIP1 : *Receptor-Interacting serine/threonine-Protein kinase 1*

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RPMI 1640 : *Roswell Park Memorial Institute 1640*

RTX : RaITireXed

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SMAC : *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*

SN38 : composé actif de l'irinotecan

SNAP25 : *SyNaptosomal-Associated Protein 25*

STING : *Stimulator of INterferon Genes*

SVF : Sérum de Veau Foetal

TAB : *TAK binding proteins*

TAK : *TGF β -Activated Kinase*

tBID : forme tronquée de BID

TBK1 : *Serine/Threonine-protein Kinase 1*

TBST : tampon salin trisphosphate tween

TGFBR2 : TGF- β récepteur de type II

TGF- β : facteur de croissance transformant β

TLR : récepteurs de type Toll

TMB : TetraMethylBenzidine

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TNFR1 : *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*

TNM : *Tumor Node Metastasis*

TP53^{mut} : *mutant tumor protein p53*

TRADD : *TNF Receptor type 1-Associated Death Domain protein*

TRAF : *TNF Receptor-Associated Factor*

TRAIL : *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*

TRAILR1 : *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1*

TRAILR2 : *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 2*

UICC: *Union for International Cancer control*

VAMP1 : *Vesicle Associated Membrane Protein1*

VBL : VinBLastine

VRAC : *Volume-Regulated Anion Channels*

XELOX : Capécitabine + Oxaliplatine

ZBP1 : ADN-Z protéine 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le cancer colorectal

1. Epidémiologie – incidence et mortalité

Le cancer colorectal est une préoccupation majeure en France avec en 2015 environ 43 000 nouveaux cas estimés et se situe en troisième place en termes d'incidence chez les hommes, il représente 11.2% des nouveaux cas des cancers masculins (derrière le cancer de la prostate et celui du poumon) et en seconde place chez les femmes, il représente 11.3% des cancers féminins (derrière le cancer du sein). Ce cancer atteint en proportion similaire les hommes et les femmes avec 25 535 nouveaux cas chez les hommes et 19 533 chez les femmes. Les personnes ayant plus de 65 ans représentent 71.3% des nouveaux cas chez les hommes et 73.9% chez les femmes, avec un âge médian du diagnostic de 71 ans chez l'homme et de 75 ans chez la femme en 2012. Cependant cette incidence a diminué de 0.3% par an entre 2005 et 2012 chez les deux sexes (INCa, Institut National du Cancer 2016).

Le cancer colorectal est très « meurtrier » avec environ 18 000 décès en 2015 (12% de l'ensemble des décès par cancer), se situant ainsi à la seconde place en terme de mortalité chez l'homme avec 11.1% des décès par cancer (derrière le cancer du poumon) et en troisième chez la femme avec 13% des décès par cancer (derrière les cancers du sein et du poumon). La répartition de la mortalité en fonction de l'âge est similaire à celle de l'incidence, l'âge médian du décès est de 77 ans chez l'homme et 81 ans chez la femme. Environ 82% des décès surviennent chez l'homme de 65 ans et plus, cette proportion est proche de 86% chez la femme. La mortalité diminue de 1.5% par an en moyenne entre 2005 et 2012 chez l'homme, et de 1.1% chez la femme. Cette diminution régulière depuis 1980 s'explique par un meilleur accès au dépistage et à la résection de lésions précancéreuses. Les personnes ayant un cancer métastatique voient leur survie diminuée de 13.1% à 5 ans (INCa, Institut National du Cancer 2016). Malgré les améliorations récentes dans les stratégies de dépistage et le développement de traitements plus efficaces pour le cancer colorectal, le pronostic du cancer colorectal avancé est encore faible.

2. Etiologie - Facteurs de risques environnementaux et génétiques

Les facteurs de risques jouant un rôle dans l'instabilité génétique et donc dans l'apparition du cancer colorectal sont principalement d'ordre environnementaux et dans certains cas d'ordre génétiques.

En effet, une majorité des cancers colorectaux se développent sans prédispositions et sont dits sporadiques (80%) et sont donc liés à l'environnement, tandis qu'une petite partie survient dans un contexte familiale (15%) ou sont dits héréditaires (5%) et sont dus à un terrain génétique favorable ou à une maladie inflammatoire des intestins (Fiche mémo cancer colorectal haute autorité de santé HAS, mai 2017). Les syndromes hérités du cancer colorectal les plus communs sont la polypose adénomateuse familiale (FAP, *Familial Adenomatous Polyposis*) et le syndrome de Lynch ou cancer colorectal héréditaire non-polyphasique (HNPCC, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*). Environ 5% de tous les cancers colorectaux sont attribués à ces deux syndromes héréditaires, mais pas moins de 10% à 15% des patients présenteront une mutation à haut risque non liée à la FAP ou au HNPCC (figure 1). (Recio-Boiles and Cagir 2018)

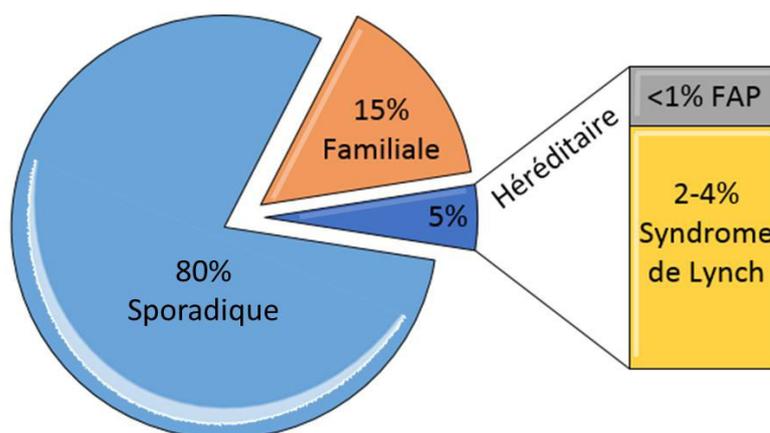


Figure 1 : Répartition du cancer colorectal selon le contexte génétique. Le graphique montre les pourcentages des sous-types sporadiques, familiaux et héréditaires (Polypose Adénomateuse Familiale (FAP), et le syndrome de Lynch) du cancer colorectal.

De récentes études épidémiologiques montrent l'impact du régime alimentaire et du mode de vie sur le développement du cancer colorectal humain. Avec notamment les facteurs de risques principaux de cancers colorectaux que sont l'alcool, l'obésité et le surpoids, le tabagisme et la consommation de viande rouge ou transformée. Au contraire certains facteurs ont des effets protecteurs et s'avèrent bénéfiques vis-à-vis du cancer colorectal, tels que la pratique d'une activité physique, la consommation de fruits et légumes, d'ail, de poisson et de

fibres alimentaires, ainsi que la prise de suppléments vitaminiques (vitamine D, magnésium, acide folique, calcium) (de la Chapelle 2004, Johnson, Wei et al. 2013, Song, Garrett et al. 2015, Marley and Nan 2016).

Concernant l'engouement récent en France pour le jeûne et ses éventuelles effets sur la réduction du risque de développer un cancer, il s'avère que les résultats des expérimentations animales sont souvent hétérogènes et qu'il n'y a que très peu de données épidémiologiques et cliniques ce qui ne permet pas actuellement de conclure à un effet bénéfique du jeûne ou des régimes restrictifs pour la prévention des cancers (INCa 2017).

Ainsi nous retrouvons, selon notre environnement et notre mode de vie, des cancérogènes de 2 types, les agents initiateurs (génétoxiques) et les agents promoteurs (non génétoxiques). Les agents génétoxiques initiateurs agissent par mutation génique, lors de la première étape du processus de cancérisation. Ces agents induisent des effets dès lors qu'ils entrent en contact avec des cellules, quel que soit le niveau d'exposition (effets sans seuil). Les agents non génétoxiques promoteurs n'agissent pas directement sur les gènes mais participent à la seconde étape de la cancérisation (la promotion) en favorisant la prolifération, plus ou moins contrôlée, des cellules initiées. Ces agents induisent des effets à partir d'un certain seuil.

Une meilleure compréhension des mécanismes d'interactions gène-environnement qui contribuent au risque du cancer colorectal est nécessaire pour pouvoir développer de nouveaux traitements curatifs et préventifs.

3. Tumorigenèse du cancer colorectal

a. Mutagenèse du cancer colorectal

Le cancer colorectal est une maladie très hétérogène qui est causée par l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux. Le cancer colorectal se développe par une accumulation progressive de modifications génétiques et épigénétiques, conduisant à la transformation de la muqueuse colique normale en cancer invasif (Binefa, Rodriguez-Moranta et al. 2014).

Il existe tout de même un paradoxe dans le développement d'un cancer, comment est-il possible de déstabiliser et de muter l'ADN qui se révèle être un des éléments les plus stables des cellules et possédant de nombreux mécanismes de défense contre l'instabilité ?

Considérant la rareté des mutations dans les cellules normales et le grand nombre de mutations observées dans les cancers humains, il a été proposé que le taux de mutations spontanées dans les cellules normales ne soit pas suffisant pour expliquer le nombre de mutations dans les cancers humains. Lawrence A. Loeb postula que les cellules tumorales présentent un phénotype mutant, ou « *mutator phenotype* », résultant de mutations dans des gènes qui jouent un rôle dans le maintien de la stabilité génomique. Ce phénotype se manifeste par une augmentation des taux de mutations et de l'évolution génétique des cellules cancéreuses, ce qui favorise la progression tumorale (Loeb 2001).

Ainsi il a été mis en évidence dans le cancer colorectal trois voies majeures d'instabilité du génome :

- L'instabilité chromosomique (CIN, *Chromosomal INstability*)
- L'instabilité microsatellitaire (MSI, *Microsatellite Instability*)
- Le phénotype hyperméthylateur (CIMP, *CpG Island Methylator Phenotype*).

Ces formes d'instabilités sont retrouvées dans des proportions distinctes au sein du cancer colorectal. L'instabilité chromosomique (CIN) est le phénotype d'instabilité le plus commun et se produit dans 80-85% des cancers colorectaux. L'instabilité des microsatellites (MSI) survient dans environ 15% de tous les cancers colorectaux sporadiques. Le phénotype hyperméthylateur des îlots CpG (CIMP) est souvent associé à une instabilité microsatellitaire sporadique et se produit dans 10% de tous les cancers colorectaux. Potentiellement d'autres formes d'instabilités seraient actuellement encore non identifiées. En effet, certaines tumeurs ne présentent aucun signe de MIN, CIMP ou CIN, soit il existe un sous-ensemble de tumeurs sans instabilité ou bien ces tumeurs présentent une nouvelle forme d'instabilité qui n'a pas encore été identifiée (Geigl, Obenauf et al. 2008).

La voie CIN décrit le taux de gain ou de perte de chromosomes entiers ou de fractions de chromosomes (variabilité de cellule à cellule). Cette définition englobe le taux d'aneuploïdies chromosomiques entières et segmentaires (Geigl, Obenauf et al. 2008). Elle est caractérisée par des pertes alléliques et des amplifications et translocations chromosomiques, comme la délétion 1p et 8p ou la perte d'hétérozygotie de 17p et 18q. La voie CIN est un gain de mutations qui déséquilibrent l'expression d'oncogènes et l'équilibre des gènes suppresseurs de tumeurs, comme on le voit avec les mutations APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), une caractéristique de la polypose adénomateuse familiale (FAP : *Familial Adenomatous*

Polyposis) (Markowitz and Bertagnolli 2009, Ahadova, Gallon et al. 2018). Les tumeurs CIN sont caractérisées par des mutations dans divers gènes suppresseurs de tumeurs tels que APC (jusqu'à 85%), TP53 (40-50%), SMAD2 / 4 (10-20%) et DCC (5%), et des proto-oncogènes tels que KRAS (30-50%), CTNNB1 (5-15%), et PIK3CA (20%) (figure 2) (Kudryavtseva, Lipatova et al. 2016).

La voie MSI est caractérisée par la substitution de bases ou par des insertions ou délétions dans les courtes séquences répétées de nucléotides (microsatellites), engendrant un décalage du cadre de lecture. Ce type de déstabilisations génétiques est souvent causé par des défauts dans les gènes de réparation de l'ADN (*DNA Mismatch Repair*) tels que MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2, qui sont les principales protéines impliquées dans ce système de réparation (Geigl, Obenaus et al. 2008). Les mutations germinales dans les gènes responsables de l'étape de reconnaissance des "mismatch" conduisent à une accumulation d'erreurs dans l'ADN, qui se répèteront, causant des niveaux élevés d'instabilités microsatellites responsables d'une prédisposition génétique au cancer colorectal connue sous le nom de syndrome de Lynch ou cancer colorectal héréditaire non polyposique (HNPCC) (Vilar and Gruber 2010). La perte de la fonction de mésappariement-réparation chez les patients atteints de HNPCC est due non seulement aux gènes de réparation de mésappariements de lignées germinales mutantes, mais aussi à l'inactivation somatique de l'allèle parental de type sauvage (Markowitz and Bertagnolli 2009). Selon les données du Cancer Genome Atlas, 60% des tumeurs MSI sont caractérisées par une inactivation épigénétique du gène MLH1, une fréquence élevée de la mutation BRAF et une faible fréquence de mutations dans les gènes APC et KRAS (Kudryavtseva, Lipatova et al. 2016). Des gènes suppresseurs de tumeurs sont également inactivés, tels que ceux codant pour le facteur de croissance transformant β (TGF- β) et de son récepteur de type II (TGFBR2), de la protéine X associée au BCL2 (BAX) et de l'histone deacetylase 2 (HDAC2) (Markowitz and Bertagnolli 2009, Yamamoto and Imai 2015). En effet, ces gènes possèdent des régions fonctionnelles qui contiennent des séquences répétées de mononucléotides ou de dinucléotides qui sont les sites préférentiels d'instabilité génétique (Markowitz and Bertagnolli 2009). Les autres 40% de tumeurs MSI, pour lesquelles la méthylation de MLH1 n'est pas révélée sont caractérisées par une augmentation de la fréquence des mutations dans les gènes APC et KRAS et une réduction de la fréquence d'activation de la mutation BRAF (Kudryavtseva, Lipatova et al. 2016). La prévalence de l'instabilité MSI dans le cancer colorectal varie de 8% à 20%, elle est plus fréquente chez les

patients de stade II (~ 20%) que chez ceux de stade III (~ 12%), et est encore moins fréquente chez les patients de stade IV (~ 4%) (figure 2) (Vilar and Gruber 2010).

La voie CIMP a été découverte dans le cancer colorectal et est caractérisée par la méthylation simultanée d'un grand nombre d'îlots CpG, qui aboutit à l'inactivation de plusieurs gènes clés suppresseurs de tumeurs. La description des critères CIMP n'est pas unifiée parmi les études. Cependant la plupart des tumeurs CIMP sont caractérisées par une instabilité des microsatellites et par une stabilité chromosomique, avec des mutations principalement des gènes de MLH1, BRAF, p16, MINT1, MINT2 et MINT31 (Geigl, Obenauf et al. 2008, Kudryavtseva, Lipatova et al. 2016). La cause précise de la méthylation aberrante de l'ADN dense dans les tumeurs CIMP reste peu claire, un des facteurs éventuellement impliqué est l'augmentation de l'expression de l'ADN méthyltransférase-3B (DNMT3B) (Kudryavtseva, Lipatova et al. 2016).

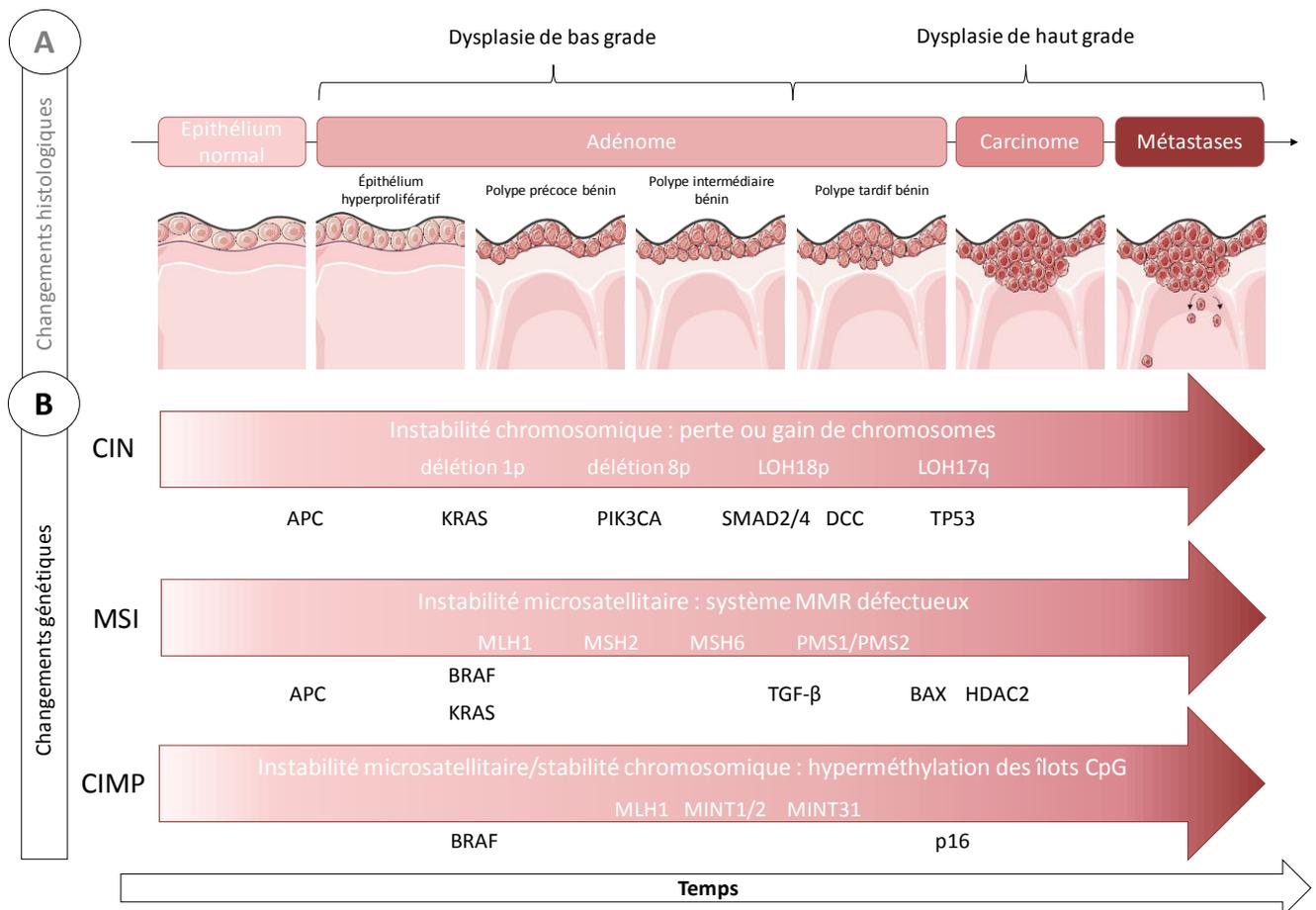


Figure 2 : Modèle de tumorigenèse colique en fonctions des changements génétiques et histologiques impliqués dans la progression tumorale.

Au cours du développement du cancer colorectal, des changements génétiques et histologiques s'opèrent. Trois types d'instabilités génomiques existent, la première induisant la modification du nombre de chromosomes, c'est l'instabilité chromosomique (CIN). La seconde induit l'apparition de mutations au niveau des microsatellites, c'est l'instabilité microsatellite (MSI), et la dernière est caractérisée par la méthylation d'un grand nombre d'îlots CpG, c'est le phénotype hyperméthylateur (CIMP). Toutes conduisent à l'altération de gènes suppresseurs de tumeurs ou à l'activation d'oncogènes. Les changements histologiques sont caractérisés par une augmentation du nombre de cellules (adapté d'après (Vilar and Gruber 2010, Markowitz and Bertagnolli 2009, Yamamoto and Imai 2015)).

Ces voies d'instabilité génomique peuvent coexister dans un seul cancer colorectal et aboutir à des néoplasmes avec un génotype et un phénotype distincts. Ces voies majeures de la tumorigenèse peuvent être présentes dans les cancers sporadiques et héréditaires.

b. Caractéristiques des cellules cancéreuses

Les instabilités génétiques permettent la croissance de cellules néoplasiques. Le phénotype de ces cellules a été décrit par Weinberg en 2011 et ces cellules sont caractérisées par : leur résistance à la mort cellulaire, l'apparition d'un potentiel répliatif illimité, leur autosuffisance en facteurs de croissances, leur insensibilité aux facteurs antiprolifératifs, leur reprogrammation métabolique, le développement d'un environnement immunosuppresseur, la promotion de l'angiogénèse et de l'inflammation et finalement l'activation de l'invasion et de la formation de métastases (Hanahan and Weinberg 2011).

Ce modèle de la cellule tumorale a été amené à évoluer et certaines des dernières caractéristiques ajoutées au concept initial de 2000 (Hanahan and Weinberg 2000) (à savoir la capacité à éviter le système immunitaire et la mise en place d'une inflammation chronique qui favorisent le développement de la tumeur) portent sur les interactions entre la tumeur et l'hôte et non plus sur la cellule tumorale seule (figure 3). Ceci démontre bien la place de plus en plus prépondérante de l'environnement tumoral dans l'apparition et le développement du cancer. Et donc de l'importance de connaître les différents acteurs du système immunitaire et de leurs activités pour pouvoir développer des traitements.

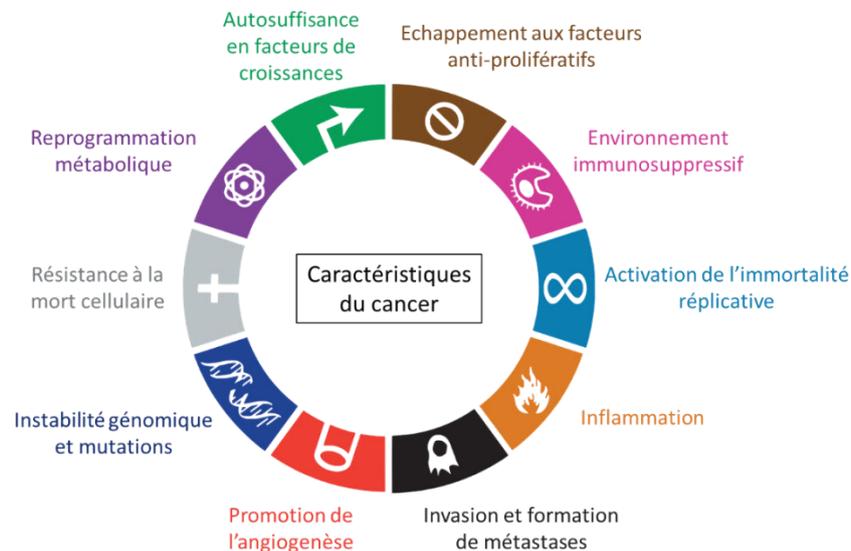


Figure 3 : Les 10 caractéristiques fondamentales des cellules tumorales.

Les cellules transformées se distinguent des cellules saines par l'acquisition d'anomalies fonctionnelles communes qui leur confèrent un avantage de croissance. L'instabilité génomique et l'occurrence de mutations initient véritablement la transformation oncogénique. La prolifération des cellules tumorales est soutenue principalement par les adaptations métaboliques développées par ces cellules, l'échappement à la réponse immunitaire et l'inflammation chronique. Ces caractéristiques extrinsèques participant à la progression de la pathologie ont permis de mettre en exergue l'importance des interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement lors du développement tumoral (adapté de(Hanahan and Weinberg 2011)).

c. Anato-mo-pathologie

La plupart des tumeurs du côlon se développent par un processus en plusieurs étapes impliquant une série de changements histologiques, morphologiques et génétiques qui s'accumulent au fil du temps.

Le cancer colorectal se développe généralement à partir de polypes. Ces polypes sont des excroissances localisées ou des agrégats de cellules anormales dans la muqueuse intestinale qui croient dans la lumière intestinale. Les cellules au sein de ces polypes se divisent et peuvent accumuler des changements génétiques suffisant par lesquels les polypes acquièrent la capacité d'envahir la paroi intestinale et peuvent éventuellement devenir plus altérés et se propager aux ganglions lymphatiques locaux et finalement aux sites métastatiques éloignés. Seul un petit pourcentage de polypes acquiert des caractéristiques malignes, et même pour ceux qui le font, la progression complète en cancer prend généralement plusieurs années, voire une décennie. Il existe deux types de polypes à potentiel malin, les adénomes et les polypes dentelés sessiles, dont chacun est associé à des risques différents de développer un cancer colorectal. Les adénomes sont caractérisés par une dysplasie (faible degré d'atypie cellulaire et structurale). La majorité des cancers colorectaux se développent à partir d'adénomes car ils ont un plus grand potentiel pour héberger les cellules cancéreuses (Simon 2016).

Au fur et à mesure que les cellules du polype prolifèrent, la taille du polype augmente et des mutations génétiques et des changements épigénétiques peuvent commencer à s'accumuler. La détérioration de l'ADN cellulaire augmente au fil du temps, ce qui peut entraîner une dysplasie de haut grade, ce qui dénote un risque très élevé d'évolution vers un carcinome invasif (Simon 2016). Ces polypes peuvent développer la capacité d'envahir les tissus voisins et se développer dans et au-delà de la paroi du côlon et du rectum. Cette tumeur localisée et maligne peut devenir néovascularisée, facilitant ainsi l'accès aux systèmes lymphatique et circulatoire et favorisant ainsi la propagation des cellules cancéreuses, appelées métastases, vers des organes distants (Solassol, Boule et al. 2005).

La détection précoce et la résection des polypes précancéreux sont essentielles pour interrompre la séquence adénome-carcinome et empêcher le développement et la propagation du cancer.

d. Classifications: TNM (*Tumor Node Metastasis*)

Au moment du diagnostic, la détermination du stade du cancer est réalisée et permet la mise en place d'une stratégie thérapeutique adaptée au patient. Plusieurs classifications ont été proposées et utilisées par le passé, tels que la classification de Dukes datant de 1932-1935 et la classification d'Astler-Coller. Toutes reposent sur la profondeur de pénétration dans la paroi et la présence ou non de métastases dans les ganglions lymphatiques.

A l'heure actuelle, la classification recommandée par l'*Union for International Cancer control* (UICC) et préconisée par la société nationale française de gastroentérologie est la classification TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*) proposée par le professeur français Pierre DENOIX (directeur de l'Institut Gustave Roussy de Villejuif) lors de congrès UICC peu après la seconde guerre mondiale. Sa huitième et dernière édition date de 2017 et est utilisée par les cliniciens et les anatomopathologistes afin de standardiser et limiter les risques de confusions créées par les deux autres classifications. En effet, sa haute définition permet une meilleure discrimination des différents stades de la tumeur tout en restant concis. La classification TNM pour le cancer du côlon est la suivante :

T : définit le site de la tumeur primaire et sa profondeur tissulaire, avec :

TX : La tumeur primaire ne peut pas être évaluée

T0 : Aucune évidence de tumeur primaire

Tis : Carcinome in situ en intra-épithéliale ou intra-muqueuse

T1 : La tumeur envahit la sous-muqueuse

T2 : La tumeur envahit la musculature

T3 : La tumeur envahissant la subsérosa ou les tissus péritonéaux ou péirectaux non péritonéalisés

T4 : La tumeur perce le péritoine (T4a) et/ou envahit directement d'autres organes ou structures (T4b)

N : définit le nombre de ganglions envahis par des métastases, avec :

NX : Les ganglions lymphatiques régionaux ne peuvent pas être évalués

N0 : Pas de métastase ganglionnaire régionale

N1a : un ganglion envahi

N1b : 2 à 3 ganglions envahis

N1c : dépôts tumoraux « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans le tissu péricolique ou péri-rectal non péritonisé, sans tissu ganglionnaire identifié

N2a : 4 à 6 ganglions envahis

N2b : à partir de 7 ganglions envahis

L'examen d'au moins 12 ganglions régionaux est recommandé par l'UICC et l'AJCC pour établir le statut N de la classification TNM. Quel que soit le stade, le pronostic est d'autant meilleur que le nombre de ganglions prélevés et analysés est grand.

M : définit la présence de métastases connues quel qu'en soit leur siège, avec :

M0 : Pas de métastase à distance

M1 : Métastase(s) à distance

M1a : Métastases confinées à un organe (foie, poumon, ovaire, ganglion lymphatique non régional) sans métastases péritonéales

M1b : Métastases dans plus d'un organe

M1c : Métastases dans le péritoine avec ou sans autre atteinte d'organe

Cette classification peut être :

Clinique : la classification clinique de prétraitement appelée TNM (ou cTNM) est essentielle pour sélectionner et évaluer la thérapie. Ceci est basé sur des preuves acquises avant le traitement qui proviennent d'examens physiques, d'imagerie, d'endoscopie, de biopsie, d'exploration chirurgicale et d'autres examens pertinents.

Anatomopathologique : la classification histopathologique post-chirurgicale, appelée pTNM, est utilisée pour guider la thérapie adjuvante et fournit des données supplémentaires pour estimer le pronostic et les résultats finaux. Ceci est basé sur des preuves acquises avant le traitement, complétées ou modifiées par des preuves supplémentaires acquises lors de la chirurgie et de l'examen pathologique.

De ces trois niveaux d'étude de l'étendue du cancer découle une classification de stade qui sera utilisée pour déterminer la prise en charge :

Tableau 1 : Classification de stade du cancer colorectal

	TNM		
Stade 0	T _{is}	N ₀	M ₀
Stade I	T ₁ , T ₂	N ₀	M ₀
Stade II	T ₃ , T ₄	N ₀	M ₀
Stade IIA	T ₃	N ₀	M ₀
Stade IIB	T _{4a}	N ₀	M ₀
Stade IIC	T _{4b}	N ₀	M ₀
Stade III	Tout T	N ₁ , N ₂	M ₀
Stade IIIA	T ₁ , T ₂	N ₁	M ₀
	T ₁	N _{2a}	M ₀
Stade IIIB	T ₁ , T ₂	N _{2b}	M ₀
	T ₂ , T ₃	N _{2a}	M ₀
	T ₃ , T _{4a}	N ₁	M ₀
Stade IIIC	T ₃ , T _{4a}	N _{2b}	M ₀
	T _{4a}	N _{2a}	M ₀
	T _{4b}	N ₁ , N ₂	M ₀
Stade IV	Tout T	Tout N	M ₁
Stade IVA	Tout T	Tout N	M _{1a}
Stade IVB	Tout T	Tout N	M _{1b}
Stade IVC	Tout T	Tout N	M _{1c}

4. Traitements du cancer colorectal

Les lignes classiques de traitements anti-tumoraux sont représentées par la chirurgie et la radiothérapie (traitement locaux-régionaux), ainsi que la chimiothérapie (traitement systémique, agents chimiques). On peut également avoir recours à l'hormonothérapie ou à l'immunothérapie (traitement systémique, agents biologiques). Les cellules sont plus ou moins sensibles et répondent de manières différentes selon le traitement.

De ce fait, selon la localisation et l'étendue du cancer colorectal, et notamment selon la présence ou non de métastases péritonéales, les méthodes utilisées sont différentes.

En absence de métastases, une résection de la tumeur est mise en place, sauf s'il y a un envahissement postérieur qui empêche la résection totale du cancer et des organes et

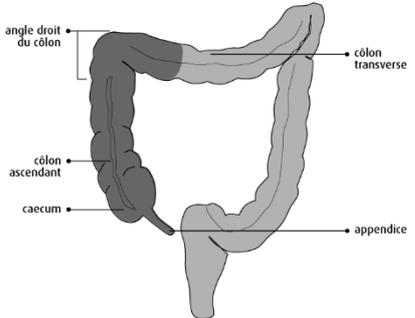
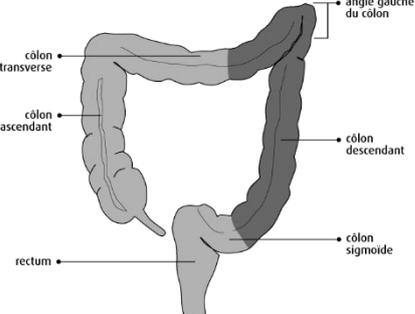
structures envahies. Il est possible de mettre en place un traitement préopératoire pour rendre résecable la lésion.

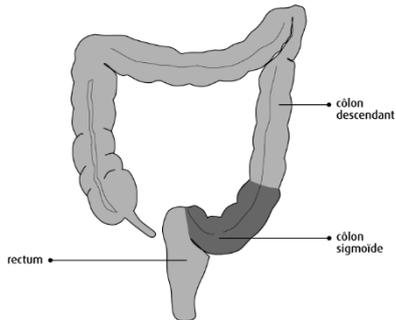
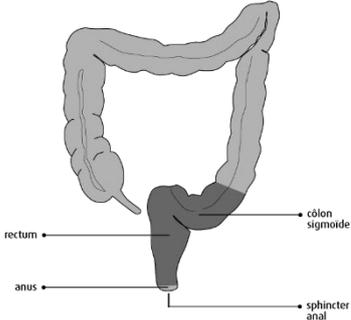
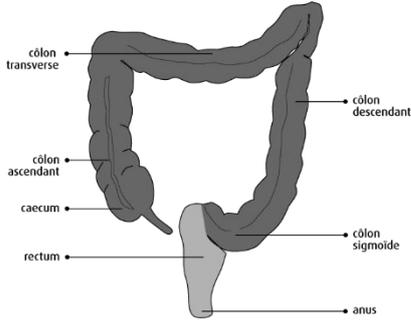
En présence d'un envahissement métastatique résecable, une résection de la tumeur primitive ainsi que des métastases est réalisée en un ou deux temps selon les symptômes et les localisations. Selon l'extension, une chimiothérapie est mise en place entre les deux temps. En présence d'un site métastatique non résecable, il n'y a pas d'indication pour le traitement initial de la tumeur primitive sauf si celle-ci est hémorragique, s'il y a un syndrome occlusif ou une perforation. Dans ce cas-là, il est préférable de mettre en place une chimiothérapie première.

a. La chirurgie

La chirurgie du cancer colorectal consiste à la résection de la partie atteinte du côlon avec une marge distale et proximale de 5 cm (sur pièce fraîche) et au curage des ganglions drainant ces zones. Selon la localisation et l'avancement de la maladie la partie retirée est plus ou moins importante.

Tableau 2 : Types de colectomies du cancer (d'après la société canadienne du cancer)

<p style="text-align: center;">Hémi-colectomie droite</p> 	<p>Si la tumeur est située au niveau du côlon droit ou gauche, une hémi-colectomie est réalisée (résection de la moitié droite ou gauche du côlon ainsi que de la moitié adjacente du côlon transverse).</p>
<p style="text-align: center;">Hémi-colectomie gauche</p> 	

<p style="text-align: center;">Colectomie sigmoïdienne</p> 	<p>Si la tumeur se situe au niveau de la partie terminale du côlon (sigmoïde), une sigmoïdectomie est mise en place.</p>
<p style="text-align: center;">Proctocolectomie avec anastomose colo-anale</p> 	<p>Si la tumeur est localisée au niveau du rectum ce dernier est retiré, c'est la proctectomie</p>
<p style="text-align: center;">Colectomie totale</p> 	<p>Dans les cas de cancers colorectaux très avancés l'intégralité du côlon est retiré, c'est une colectomie totale.</p>

Dans tous les cas, les ganglions drainant la tumeur sont retirés, évitant ainsi la propagation de cellules cancéreuses qui auraient déjà disséminées en leur sein. Par ailleurs, le retrait du mésocôlon, ou du mésorectum (repli du péritoine qui relie le côlon ou le rectum à la paroi abdominale) qui entoure la tumeur diminue le risque de récurrence.

b. La radiothérapie

La radiothérapie consiste en l'administration de la dose minimale efficace de rayons sur les zones à traiter en épargnant les tissus sains environnant. Ce traitement permet de réduire les risques de récurrence locale du cancer, cependant le cancer du côlon a tendance à se propager vers des organes comme le foie et les poumons. La radiothérapie n'est donc pas généralement indiquée dans le traitement du cancer du côlon, mais elle peut être utilisée pour traiter certaines métastases isolées ou certains symptômes causés par la tumeur lorsque celle-ci n'a pas pu être retirée (saignement dans le côlon, douleur...).

c. La chimiothérapie

La chimiothérapie n'est pas proposée systématiquement à tous les patients. D'une manière générale, seuls les cancers étendus au-delà de la paroi du côlon sont traités par chimiothérapie. Ainsi la chimiothérapie peut être curative, adjuvante à la chirurgie, néoadjuvante à la chirurgie ou palliative.

Tableau 3 : Nature du traitement du cancer colorectal selon l'avancé de la maladie

Stades 0 et I : Cancers localisés	Chirurgie seule (exérèse chirurgicale et curage ganglionnaire).
Stade II	Chirurgie seule recommandée. Si les risques de récurrences sont élevés, une chimiothérapie peut être envisagée.
Stade III : Atteintes ganglionnaires	La chimiothérapie adjuvante est recommandée.
Stade IV : Cancers métastatiques	Chimiothérapie associée ou non à une thérapie ciblée est envisagée.

D'après les essais randomisés menés dans les années 1980, comparant l'association de 5-fluorouracile (5-FU) à une chirurgie seule pour les cancers de stades II et III, la chimiothérapie adjuvante est indiquée pour les stades III. En effet, les résultats ont démontré une réduction de la mortalité de 30% et un gain en survie de 10% à 5 ans. Les résultats étant plus modestes pour les stades II (2 à 5% de bénéfice selon le risque de récurrence), la chimiothérapie adjuvante se discute avec le patient et en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) selon les risques de récurrences (Quasar Collaborative, Gray et al. 2007) :

- risque faible ou modéré : T3 avec, plus de 12 ganglions analysés, absence d'embolies veineuses et/ou lymphatiques, pas d'engainements périnerveux, tumeur bien ou moyennement différenciée, absence de perforation ou d'occlusion.

- risque élevé : T4 avec, moins de 12 ganglions analysés, présence d'embolies veineux et/ou lymphatiques, présence d'engainements périveineux, tumeur peu différenciée, occlusion ou perforation.

Les chimiothérapies principales pour traiter le cancer colorectal sont :

- 5-FU et ses dérivés (Capécitabine, Tegafur) + l'acide folinique (qui accroît l'efficacité du 5-FU)

- Oxaliplatine

- Raltitrexel

- Irinotecan

Le plus souvent, les chimiothérapies sont utilisées en association, on parle de protocole de chimiothérapie.

Tableau 4 : Exemple de protocoles de chimiothérapie les plus communs pour le traitement du cancer colorectal

FOLFOX	5-FU/acide folinique + Oxaliplatine
XELOX	Capécitabine + Oxaliplatine
LV5FU2	5-FU/acide folinique
FOLFIRI	5-FU/acide folinique + Irinotecan

La chimiothérapie doit débuter 6 à 8 semaines après la chirurgie et s'étale sur une durée de 6 mois.

Dans le cas d'un cancer colorectal métastatique, selon la résecabilité, l'état général du patient, l'agressivité de la maladie, l'existence d'anomalies génétiques et des souhaits du patient, le traitement et le protocole de chimiothérapie seront adaptés.

Si les métastases sont synchrones et à priori résecables, le standard de traitement repose sur une chirurgie plus une chimiothérapie préopératoire de 6 mois, selon un protocole FOLFOX4. Cette chimiothérapie préopératoire a pour but de faciliter le geste chirurgical mais aussi de tester la chimiosensibilité de la maladie en écartant ainsi les maladies rapidement évolutives sous chimiothérapie.

Si les métastases sont non résecables, le traitement repose uniquement sur la chimiothérapie dont le but est le maintien de la qualité de vie et l'allongement de la survie du patient.

Plusieurs protocoles de chimiothérapie associés aux thérapies ciblées comme les anti-EGFR (Cétuximab) et les anti-VEGF (Bévacizumab) sont possibles.

Les agents de chimiothérapie ciblent les capacités de proliférations exacerbées des cellules tumorales, en endommageant de manière irréversible leur ADN, ce qui entraîne la mort ou la sénescence de ces dernières. Bien que tuant préférentiellement les cellules tumorales, les chimiothérapies induisent également la mort de cellules non tumorales ayant un fort taux de prolifération, ceci explique la toxicité des chimiothérapies et les effets anti-prolifératifs observés sur certaines populations cellulaires saines.

d. L'immunothérapie

L'immunothérapie consiste à agir sur le système immunitaire afin de limiter et stopper la croissance des cellules tumorales. Cependant à l'heure actuelle et contrairement à d'autres types de tumeurs, les inhibiteurs de *Programmed cell Death protein-1* (PD-1) / *Programmed cell Death Ligand-1* (PDL-1) ou *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4* (CTLA-4) n'ont pas encore montré d'efficacité significative dans le cancer colorectal non sélectionné, de même pour le transfert cellulaire adoptif ou la vaccination (Lynch and Murphy 2016). En effet, seul un sous-groupe génétiquement particulier du cancer colorectal se prête à l'inhibition des points de contrôle : ce sont les tumeurs déficientes en système de réparation des mésappariement (MMRd) / microsatellite instable (MSI). Néanmoins, dans un contexte métastatique, ces tumeurs MMRd / MSI sont largement surpassées en nombre par des tumeurs au système MMR compétant (MMRp) et microsatellite stable (MMS). Cette résistance à l'immunothérapie est due au microenvironnement tumoral qui contrecarre l'immunité antitumorale, par la présence de cellules tumorales peu antigéniques et un microenvironnement immunosuppresseur (Kather, Halama et al. 2018, Stein and Folprecht 2018). La mise en place de stratégies combinatoires visant l'activation de plusieurs cibles immunitaires (activation des lymphocytes T mémoires, des fonctions effectrices des macrophages ou l'amélioration de la présentation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)) combinées aux thérapies classiques sont à court terme les traitements les plus prometteurs (Ghiringhelli 2018).

II. Les métastases péritonéales d'origine colique

1. Carcinose péritonéale

Le péritoine est une fine membrane séreuse qui tapisse la cavité abdominale (péritoine pariétal) et la surface des viscères digestifs qu'elle contient (péritoine viscéral). Il délimite une cavité virtuelle, la cavité péritonéale contenant le liquide péritonéal, dans laquelle se déplacent les anses intestinales. Le tissu stromal péritonéal, riche en facteurs de croissance et chimiokines, est un environnement favorable pour la prolifération tumorale (Terzi, Arslan et al. 2014). Ainsi la carcinose péritonéale est définie par l'envahissement de la cavité péritonéale par des cellules tumorales. Les cancers péritonéaux primaires, tels que le mésothéliome péritonéal ou le carcinome séreux papillaire, sont rares. En revanche, la dissémination péritonéale des cancers digestifs est fréquente. Cette carcinose résulte de l'implantation de métastases spécifiques de cancers intra- ou extra-abdominaux, principalement d'origine ovarienne ou gastro-intestinale et est associée à un mauvais pronostic avec une médiane de survie inférieure à 6 mois pour les carcinoses d'origine non-ovarienne (Alkhamesi, Ziprin et al. 2005).

Les tumeurs du péritoine peuvent être synchrones ou métachrones à la découverte de la tumeur primitive. Dans le cas d'une carcinose péritonéale d'origine colique, l'envahissement tumoral peut se faire par rupture de la paroi intestinale lors de la chirurgie ou par dissémination passive au travers de la séreuse. Une fois la cavité péritonéale atteinte, les cellules tumorales migrent dans la cavité selon la circulation des fluides (Benlahfid, Erguibi et al. 2017). Les cellules adhèrent par la suite à la matrice extracellulaire au sein du péritoine grâce aux protéines de la famille des intégrines (Burlison, Hansen et al. 2004) et dans une moindre mesure à la surface des cellules mésothéliales (tapissant l'intérieur du péritoine) grâce aux molécules d'adhésion cellulaire comme ICAM-1 et/ou VCAM (Alkhamesi, Ziprin et al. 2005). La carcinose péritonéale chez les patients atteints de cancer colorectal est un évènement qui réduit le pronostic des patients et conduit à la réévaluation de leur prise en charge.

Classifications : PCI (*Peritoneal Cancer Index*)

Au moment de la cytoréduction, le PCI (*Peritoneal Cancer Index*) est déterminé. L'indice de cancer péritonéal est une classification publiée par Sugarbaker en 1998 et qui permet de déterminer l'étendue du cancer péritonéal dans la cavité péritonéale et d'estimer la probabilité de cytoréduction complète. À cet effet, la cavité péritonéale est divisée en 9 secteurs pour l'abdomen et en 4 secteurs supplémentaires pour l'intestin grêle. Dans chacune des 13 régions, la taille du plus grand nodule tumoral est mesurée. Si aucune tumeur n'est visualisée, un score de "0" est donné à cette région. Si le plus grand nodule tumoral est inférieur à 0,5 cm, le score est "1". Pour les tumeurs mesurant entre 0,5 cm et 5 cm, le score est "2". Pour les lésions supérieures à 5 cm, le score est "3". S'il y a une stratification ou une confluence de multiples petits nodules tumoraux, le score est "3". Le PCI est calculé en additionnant les scores des 13 régions avec un score maximum de 39 (13 × 3) (figure 4) (Harmon and Sugarbaker 2005).

Le PCI est le principal facteur pronostique après l'achèvement de la chirurgie cytoréductrice et tend à être utilisé comme référence pour fixer les indications et contre-indications de la chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP). Ainsi plus le PCI est élevé et plus le pronostic du patient est mauvais. La plupart des instituts ont défini un PCI maximum (PCI = 20). Si le PCI d'un patient dépasse cette limite supérieure, l'opération est interrompue et la procédure HIPEC est annulée car le bénéfice de la procédure en termes de survie ne l'emporte pas sur ses risques (Harmon and Sugarbaker 2005).

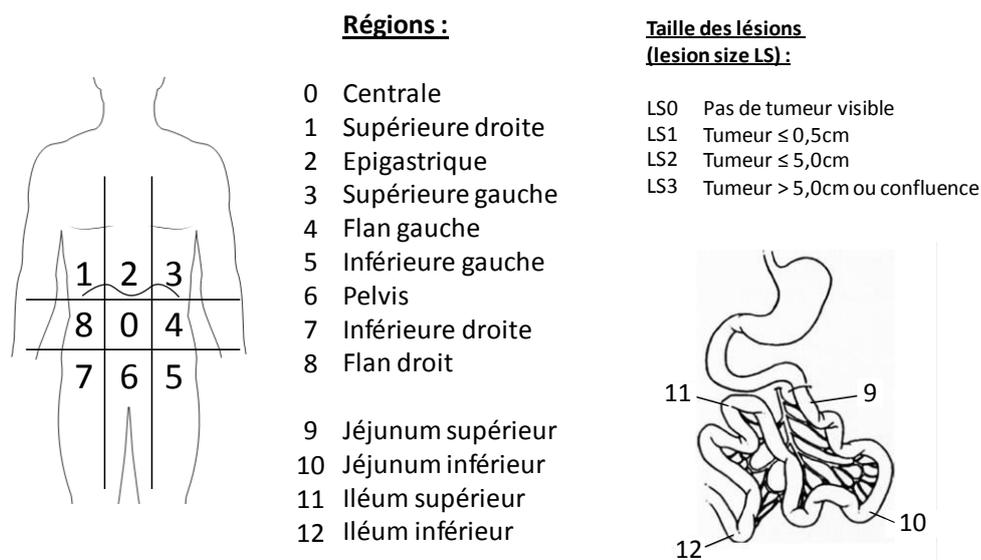


Figure 4 : *Peritoneal Cancer Index*, outil d'évaluation quantitative de la carcinose péritonéale.

2. CHIP : Chimiothérapie Hyperthermique IntraPéritonéale

a. Généralités

Les patients ayant une carcinose péritonéale présentent généralement un bilan d'extension métastatique touchant plusieurs organes (péritoine, foie, poumons). Le traitement alors reposait sur l'injection par voie générale de chimiothérapies, mais les concentrations atteignant la cavité abdominale n'étaient pas suffisantes (Otto 1995). C'est dans ce contexte que fut proposé la technique de chimiothérapie intrapéritonéale (CIP), afin d'augmenter les concentrations de drogues anti-cancéreuses *in situ* (au moins 25 fois supérieures à celles atteintes en systémiques) et épargner les tissus sains périphériques. La chimiothérapie intrapéritonéale est une stratégie thérapeutique pour traiter les métastases péritonéales associant une chirurgie de cytoréduction complète suivie d'un bain de chimiothérapie.

Le cytoréduction permet de traiter la maladie visible (macroscopique), puis la maladie résiduelle invisible (microscopique) est traitée par le bain de chimiothérapie. La cytoréduction chirurgicale complète est indispensable avant de réaliser la chimiothérapie intrapéritonéale puisque la pénétration tissulaire des molécules de chimiothérapie est limitée à quelques couches de cellules. Effectivement, les patients traités par une chimiothérapie locorégionale ont montré une meilleure survie lorsqu'ils présentaient une masse tumorale inférieure à 1 cm (Lu, Wang et al. 2010). Il est également important que le bain de chimiothérapie soit réalisé immédiatement après la chirurgie, avant que les cellules tumorales résiduelles n'aillent se piéger dans les adhérences post-opératoires, qui sont de véritables niches pour ces cellules.

b. Molécules de chimiothérapie utilisées pour la chimiothérapie intrapéritonéale

Des données d'une équipe française ont montré que l'utilisation de l'oxaliplatine pour la CHIP améliorait la survie médiane et globale après une cytoréduction macroscopique complète de la carcinose péritonéale d'origine colique. En effet, Elias et ses collaborateurs ont rapporté une survie médiane de 62.7 mois et un taux de survie à 5 ans de 51% après une CHIP avec de l'oxaliplatine intrapéritonéale et du 5-FU/acide folinique par voie intraveineuse (Elias, Lefevre et al. 2009). Ces résultats ont entraîné un changement dans les standards de protocoles pour la CHIP dans certains centres qui étaient jusqu'alors principalement effectués à base de mitomycine c plus doxorubicine. Une étude rétrospective allemande s'est intéressée en 2013 à la morbidité et la mortalité de 80 patients atteints de carcinose péritonéale d'origine colique, traités selon ces deux régimes de CHIP basés l'un sur la combinaison de mitomycine c et doxorubicine et l'autre basé sur l'utilisation de l'oxaliplatine. Ainsi Glockzin et ses

collaborateurs concluent que l'utilisation de l'oxaliplatine pour la CHIP (en combinaison avec l'injection en intraveineux de 5-FU et d'acide folique), n'augmente pas la mortalité et la morbidité de la procédure comparée à l'utilisation de la mitomycine c et la doxorubicine et propose l'utilisation de l'oxaliplatine comme un nouveau standard de protocole pour la CHIP (Glockzin, von Breitenbuch et al. 2013). Malgré ces études les agents chimiothérapeutiques utilisés en routine pour la CHIP restent variables et sont la mitomycine c (combinée avec soit la doxorubicine ou le cisplatine), l'oxaliplatine, le cisplatine (combiné à la doxorubicine) ou l'irinotecan.

D'autres molécules de chimiothérapie sont également utilisées en intrapéritonéal comme le melphalan en seconde ligne de traitement pour les patients ayant peu répondu à la CHIP avec mitomycine c ou oxaliplatine (Sardi, Jimenez et al. 2014), et le paclitaxel pour le traitement de carcinose péritonéale d'origine ovarienne ou gastrique (évaluation de l'efficacité dans le cancer colorectal uniquement chez l'animal) (Bouquet, Deleye et al. 2011).

c. Méthodes ou agents potentialisateurs utilisés pour la chimiothérapie intrapéritonéale

La chimiothérapie intrapéritonéale hyperthermique (CHIP) est la procédure la plus commune de chimiothérapie intrapéritonéale. La température de l'agent chimio-thérapeutique est maintenue entre 42 et 43°C lors de la CHIP. Il a été montré que l'hyperthermie augmenterait la concentration et l'efficacité de la chimiothérapie utilisée (doxorubicine, mitomycine c, cisplatine et oxaliplatine) (Los, van Vugt et al. 1994, Jacquet, Averbach et al. 1998, Emoto, Sunami et al. 2014). Cependant, si l'administration locale de drogues de chimiothérapie permet une toxicité générale moins élevée, les procédures normothermiques ou hyperthermiques présentent une augmentation du risque de fièvre et de diarrhées post-opératoires importantes (Huang, Xu et al. 2012), tandis que l'utilisation du cisplatin entraîne un risque de dysfonctionnement rénal pendant le traitement.

La Reviparine, une héparine de bas poids moléculaire, a montré un certain potentiel en tant qu'agent chimiothérapeutique intrapéritonéale dans une étude sur des animaux en réduisant le poids de la tumeur (Pross, Lippert et al. 2004).

L'utilisation de nanoparticules permettant une absorption lente des agents thérapeutiques est également à l'étude chez l'animal (Muroso, Kawai et al. 2018).

Certains agents susceptibles d'augmenter l'efficacité de la CHIP comme le bevacizumab (qui cible le facteur de croissance vasculaire endothélial) (Muroso, Kawai et al. 2018) ou

l'amifostine qui prévient la toxicité rénale du cisplatine) ont également été testés (Bouhadjari, Gabato et al. 2016).

d. Bilan du protocole de CHIP

Malgré l'augmentation du nombre d'équipes chirurgicales réalisant cette intervention, la procédure de bain de chimiothérapie n'est pas standardisée, de ce fait de nombreux paramètres, pourtant essentiels, sont variables et restent le choix du chirurgien : la drogue utilisée, la température, le soluté utilisé pour reprendre la chimiothérapie (isotonique ou hypotonique), la pression exercée sur la cavité abdominale du patient lors de l'intervention, le temps d'exposition à la drogue, le type de chirurgie.

Deux procédures de CHIP s'opposent : la technique ouverte et la technique fermée. La technique « du colisée » ou méthode ouverte consiste en l'instillation de la chimiothérapie au sein de l'abdomen restant largement ouvert, le bain de CHIP peut être brassé et l'intégralité de l'abdomen exposé. La méthode fermée consiste à refermer l'abdomen de façon étanche après avoir mis en place les cathéters d'entrée et de sortie du circuit. Son avantage est de diminuer les risques théoriques d'exposition du personnel de bloc aux vapeurs et aux éclaboussures du bain de chimiothérapie, mais au détriment de l'homogénéité d'exposition des différentes zones abdominales qui ici est réalisée par inclinaison de la table chirurgicale. En pratique clinique, aucune des deux techniques n'a démontré une supériorité sur l'autre.

Un milieu isotonique est un milieu de même pression osmotique que le milieu intracellulaire, il n'y a pas de flux d'eau à travers les membranes plasmiques semi-perméables des cellules. La concentration de solutés dissous au sein du cytoplasme est identique à la concentration de solutés dissous dans le milieu extracellulaire. A la différence d'un milieu hypotonique, qui possède une concentration plus faible de solutés que le milieu intracellulaire. Dans ce cas, afin de remédier à la différence de concentrations de solutés qui existe de part et d'autre de la membrane plasmique (solutés qui ne peuvent pas passer passivement la membrane), le phénomène d'osmose se met en place. Ainsi, l'eau va diffuser du compartiment le moins concentré vers le compartiment le plus concentré, pour diluer le soluté qui ne peut pas traverser la membrane. En présence d'un milieu hypotonique, l'eau va rentrer au sein des cellules et entraîner leur turgescence. Dans le cas de la CHIP, le bain de chimiothérapie peut être réalisé dans un milieu isotonique (ex : sérum physiologique) ou bien un milieu hypotonique (ex : glucose 2.5%) au choix du chirurgien réalisant la procédure.

L'impact de la pression intra-abdominale au cours de la CHIP n'a été étudié dans le passé que dans plusieurs études sur des animaux. Ces études ont révélé qu'une chimiothérapie intrapéritonéale avec augmentation de la pression améliore la diffusion de l'agent de chimiothérapie dans le péritoine, son accumulation dans les tumeurs et l'effet antitumoral lui-même (Gesson-Paute 2008, Facy 2012, Esquis 2006).

L'hyperthermie entre 42°C et 43°C est associée dans l'intention d'optimiser l'effet cytotoxique de la chimiothérapie sur les cellules tumorales. Cependant, l'hyperthermie seule est un facteur de cytotoxicité majeur et présente un problème quant à l'homogénéisation de la température eu sein de la cavité abdominale. En effet, l'élévation thermique voulue n'est pas assurée partout ni pour la même durée, cette diffusion de la chaleur (au péritoine, viscères, nerfs...) ne peut pas être vérifiée. Tout en sachant qu'un bain pas suffisamment chaud perd son efficacité rapidement et qu'un bain trop chaud peut entraîner des brûlures sévères voire létales.

De plus, nous savons d'ores et déjà que certaines associations de paramètres ne sont pas envisageables comme le montre l'étude clinique menée par le Professeur Elias en 2002 qui mettait en évidence une toxicité (hémorragie et thrombopénie) et une mortalité accrues lors de l'utilisation de l'hypotonie en association avec l'hyperthermie (Elias 2002).

Cette approche thérapeutique de la CHIP est compliquée, reste limitée à quelques centres experts et est réalisée avec une conception hétérogène de la procédure. Tout l'enjeu est de trouver la meilleure association de paramètres afin d'atteindre des résultats optimaux en termes d'efficacité et d'effets secondaires.

III. Chimiothérapies et morts cellulaires

1. Molécules de chimiothérapie

Les modifications génétiques confèrent aux cellules tumorales une capacité de prolifération exacerbée, c'est cette capacité qui est ciblée par les agents chimiothérapeutiques. Ces agents appartiennent à différentes classes et possèdent des mécanismes d'action variés, allant de la déstabilisation (agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérases) et de l'inhibition de la synthèse d'ADN (antimétabolites) à l'inhibition des mécanismes de mitose (poisons du fuseau) ou encore à la production massive d'espèces réactives de l'oxygène (antibiotiques cytotoxiques).

Tableau 5 : Classification des chimiothérapies

Mécanismes d'action	Catégories	Chimiothérapies (non exhaustif)
Alkylants	Moutardes à l'azote	Mephalan, Cyclophosphamide
	Dérivés du platine	Oxaliplatine, Cisplatine et Carboplatine
	Nitroso-urées	Carmustine
	Divers	Mitomycine c*, Busulfan
Anti-métabolites	Antifoliques	Méthotrexate, Raltitrexed
	Antipyrimidiques	5-fluorouracile, Gemcitabine
	Antipuriques et autres	Clofarabine, Hydroxycarbamide
Inhibiteurs de topoisomérases	Topoisomérase I	Irinotecan, Topotecan
	Topoisomérase II	Etoposide
Intercalants	Anthracyclines	Doxorubicine*, Epirubicine
	Anthracènes et divers	Mitoxanthrone, Bleomycine*
Anti-tubulines	Vinca-alcaloïdes	Vincristine, Vinblastine
	Taxanes	Docetaxel, Paclitaxel
	Divers	Eribuline

* : antibiotiques cytotoxiques

Les anti-métabolites sont des agents qui vont bloquer la synthèse des acides nucléiques en phase S du cycle cellulaire, soit en inhibant les protéines nécessaires au métabolisme des bases puriques et pyrimidiques (exemple du MéthoTreXate MTX), soit en se substituant aux bases azotées (comme le 5-FluoroUracile 5-FU), soit également en hydrolysant la L-asparagine, qui est un précurseur de la synthèse protéique.

Les topoisomérases sont des enzymes qui permettent de condenser/décondenser l'ADN, après avoir coupé de manière transitoire l'un (topoisomérase I) ou les deux (topoisomérases II) brins, puis de les ressouder. Les inhibiteurs de topoisomérases I (Irinotecan) ou de topoisomérase II (etoposide) ne s'intercalent pas dans l'ADN mais bloquent le site catalytique soit en empêchant l'étape de religation des brins d'ADN, soit en empêchant le recrutement des topoisomérases, ce qui entraîne la coupure définitive de l'ADN.

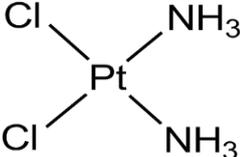
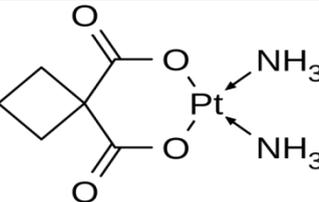
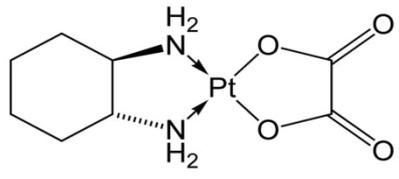
Les agents intercalants de l'ADN sont caractérisés par plusieurs noyaux aromatiques condensés. La dimension et la structure de ces molécules entraînent une détorsion de la molécule d'ADN et empêchent l'avancement des ARN et ADN polymérases, ainsi que la réplication et la transcription (doxorubicine et mitoxanthrone). La présence de ces agents intercalés dans l'ADN peut également perturber l'action des topoisomérases et entraîner des cassures mono- et bicaténares.

Les antitubulines sont des poisons du fuseau mitotique. Ce fuseau est formé de la polymérisation de tubulines alpha et beta en microtubules et permet de positionner les chromosomes au niveau de la plaque équatoriale pour ensuite les séparer en deux lots égaux lors de la mitose. Ainsi, les anti-tubulines vont interagir avec les tubulines et bloquer la polymérisation (par exemple la Vinblastine) / dépolymérisation (le Paclitaxel) des microtubules.

Les agents alkylants l'ADN sont des molécules fortement électrophiles qui vont réagir avec les groupements nucléophiles -SH, -OH, -COOH ou -NH₂ des acides nucléiques et des protéines. Ces agents alkylants vont donc se fixer à l'ADN et former des liaisons intra- ou interbrins et empêcher la réplication et la transcription. Les alkylants sont composés principalement des moutardes azotées (melphalan), des composés nitroso-urées (carmustine) et des sels de platine.

Les médicaments à base de platine, tels que le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine, sont le pilier des composés à base de métal dans le traitement du cancer. Les trois dérivés principaux du platine (ayant obtenu l'approbation de la *Federal Drug Administration* FDA) seront plus particulièrement étudiés ci-dessous.

Tableau 6 : Les dérivés du platine

Dérivés du platine	Génération	Représentation topologique
Cisplatine cis-diamminedichloroplatinum(II)	1ère	
Carboplatine cis-diammine(1,1-cyclobutane dicarboxylato)platinum(II)	2nde	
Oxaliplatine trans-1-diaminocyclohexane oxalate platinum(II)	3ème	

a. Le cisplatine

Le cisplatine est connu sous le nom de chlorure de Peyrone depuis la fin du XIXe siècle (du nom de Michele Peyrone, qui l'a synthétisé en premier en 1844). Ces propriétés anticancéreuses ont été mises en évidence dans les années 1970 et son approbation par la *Federal Drug Administration* (FDA) a été reçue le 19 décembre 1978. Le cisplatine est utilisé pour traiter un grand nombre de néoplasmes solides, comme le cancer de l'ovaire, des testicules, de la vessie, du côlon et du rectum, du poumon et de la tête et du coup (Dasari and Tchounwou 2014).

Le cisplatine est un agent alkylant et agit majoritairement sur la double hélice de l'ADN (sur l'azote 7 des résidus de Guanine et aussi d'Adénosine) en formant des liaisons intra- et inter-brins (Dilruba and Kalayda 2016). Ces adduits se forment à 90% entre deux bases puriques adjacentes (65% entre deux Guanines adjacentes et 25% entre une Guanine et une Adénosine) présentes sur le même brin ou sur des brins différents, et entraînent une distorsion de la structure de l'ADN (angle 47°). La réplication et la transcription sont perturbées et les adduits ADN-Cisplatine vont être reconnus par plusieurs systèmes de réparations de l'ADN, principalement le système de réparation des nucléotides (NER), mais aussi le système de réparation des mésappariements (MMR), afin de réparer les dommages ou bien si cela n'est pas possible d'enclencher le processus de mort par apoptose (Rancoule, Guy et al. 2017, van Zyl, Tang et al. 2018). Il a été décrit que seul 1% du cisplatine intracellulaire se liait à l'ADN

nucléaire. En effet, le cisplatine peut également agir au sein du cytoplasme sur un large nombre de substrats, notamment les nucléophiles endogènes (glutathion), la méthionine, les métallothionéines et autres protéines (via leurs cystéines). Ainsi, le cisplatine possède une activité cytotoxique importante en faisant pencher la balance redox vers un stress oxydant qui entraîne la perméabilisation de la membrane mitochondriale et facilite les dommages à l'ADN (Rancoule, Guy et al. 2017).

Le cisplatine pénètre dans les cellules grâce au transporteur de cuivre 1 (CTR1), qui est une protéine transmembranaire impliquée dans l'homéostasie du cuivre (Howell, Safaei et al. 2010). Les ATPases de types P transportant le cuivre, ATP7A et ATP7B, participent également au transport du cisplatine. Le transporteur ATP7A séquestre le cisplatine dans les structures vésiculaires empêchant la distribution du médicament, tandis que l'ATP7B est responsable de l'efflux du cisplatine. D'autres transporteurs semblent impliqués, notamment les pompes Na^+K^+ ATP et les canaux anioniques régulateurs de volume (*Volume-Regulated Anion Channels* : VRAC). Une dérégulation de ces transporteurs est, en partie, responsable des phénomènes de résistance au cisplatine développés par certaines cellules malignes. Une absorption cellulaire réduite, un efflux augmenté et une séquestration/dégradation cytoplasmique renforcée du cisplatine peuvent entraîner une réponse adaptative des cellules et les rendent moins sensibles aux effets du cisplatine (Dilruba and Kalayda 2016).

A noter également, que le cisplatine possède de nombreux effets indésirables aigus et tardifs. Parmi eux, des nausées et vomissements sévères, une néphrotoxicité qui va limiter la dose, une myélossuppression (thrombopénie, leucopénie, anémie), et une neuropathie sensorielle périphérique (ototoxicité) (Rancoule, Guy et al. 2017).

Suite à la découverte du cisplatine, 23 autres médicaments à base de platine sont entrés dans des essais cliniques avec seulement deux de ceux-ci (carboplatine et oxaliplatine) ayant obtenus l'approbation de commercialisation internationale, et trois autres (nédaplatine, lobaplatine et heptaplatine) ayant été approuvés seulement dans certains pays (Wheate, Walker et al. 2010).

b. Le carboplatine

Le carboplatine, platine de seconde génération, a été développé afin de réduire la toxicité limitant la dose de cisplatine et mis sur le marché en 1989. Le mécanisme d'action du carboplatine est similaire à celui du cisplatine. En raison de la réduction de sa réactivité, la neurotoxicité et l'ototoxicité après traitement au carboplatine sont beaucoup moins prononcées. Sa toxicité réduite convient à une chimiothérapie à haute dose plus agressive. Mais la dose est limitée par la myélosuppression, la thrombocytopénie étant plus sévère que la neutropénie et l'anémie (Dasari and Tchounwou 2014, Dilruba and Kalayda 2016). Le carboplatine est principalement utilisé en traitement contre le cancer des ovaires, des poumons et les cancers de la sphère ORL. En effet, le carboplatine montre une efficacité limitée contre les cancers des cellules germinales testiculaires, les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou et le cancer de la vessie. En conséquence, le cisplatine reste le médicament de choix pour traiter ces maladies. Comme dans le cas du cisplatine, la résistance tumorale au carboplatine pose un problème clinique majeur. Les mécanismes sous-jacents à la résistance au carboplatine sont généralement similaires aux mécanismes de résistance au cisplatine (Stewart 2007).

c. L'oxaliplatine

L'oxaliplatine est un analogue du platine de troisième génération, qui a obtenu sa mise sur le marché par la FDA en 2002 pour le traitement des cancers colorectaux. Cet agent thérapeutique est l'un des plus utilisés, seul ou en association, pour le traitement des cancers du côlon de stades II/III et des cancers colorectaux métastatiques mais également pour le traitement des cancers du poumon à non petites cellules.

Ce médicament est à base d'un atome de platine groupé avec de l'oxalate et un ligand diaminocyclohexane (DACH). L'oxalate réduit significativement la réactivité de l'oxaliplatine et limite ainsi un des effets secondaires toxiques, la neuropathie sensorielle périphérique (Dilruba and Kalayda 2016). Le ligand DACH joue un rôle majeur dans la cytotoxicité et le protège contre la résistance croisée avec le cisplatine (Ndagi, Mhlongo et al. 2017). Ce groupement DACH est également plus lipophile augmentant l'absorption passive de l'oxaliplatine par rapport au cisplatine et au carboplatine.

Une lipophilie plus élevée peut également être une raison pour laquelle l'oxaliplatine utilise également d'autres voies d'entrée cellulaire que les médicaments de première et deuxième génération. Les transporteurs de cations organiques OCT1 et OCT2 ont été impliqués dans la médiation de l'absorption d'oxaliplatine, car leur surexpression augmente significativement

l'accumulation cellulaire d'oxaliplatine, mais pas de cisplatine ou de carboplatine. Les cellules cancéreuses colorectales surexpriment les transporteurs de cations organiques, ce qui peut expliquer l'efficacité de l'oxaliplatine dans ce type particulier de cancer. En ce qui concerne CTR1, la preuve que le transporteur est impliqué dans l'absorption de l'oxaliplatine n'est pas aussi forte que dans le cas du cisplatine; néanmoins, l'acquisition de la résistance à l'oxaliplatine a été signalée comme étant accompagnée d'une régulation à la baisse de CTR1. Une expression réduite de la sous-unité $\beta 1$ de la Na^+ , K^+ -ATPase a également été trouvée dans certaines cellules résistantes à l'oxaliplatine. Les transporteurs d'efflux de cuivre semblent également jouer un rôle important dans la sensibilité à l'oxaliplatine (Dilruba and Kalayda 2016).

De manière similaire au cisplatine, l'oxaliplatine forme principalement des liaisons croisées sur les bases de guanine adjacentes ou entre la guanine et l'adénine, mais dans une moindre mesure. Néanmoins, les adduits oxaliplatine-ADN sont plus efficaces dans l'inhibition de la synthèse de l'ADN. En raison du ligand DACH plus volumineux, l'oxaliplatine induit une distorsion conformationnelle différente sur l'ADN. L'encombrement et la lipophilie de DACH sont considérés comme responsables du traitement différentiel des adduits oxaliplatine-ADN. Ces derniers ne sont pas reconnus par les protéines MMR. Fait intéressant, il ne conduit pas à une cytotoxicité réduite mais rend l'activité antitumorale de l'oxaliplatine indépendante du MMR. En outre, l'augmentation du pontage répliatif, c'est-à-dire la synthèse d'ADN contournant les adduits platine-ADN, n'a pas été mise en corrélation avec la cytotoxicité de l'oxaliplatine (Dilruba and Kalayda 2016). L'oxaliplatine a un spectre d'activité différent par rapport au cisplatine ou au carboplatine.

L'oxaliplatine induit l'apoptose des cellules tumorales en permettant l'oligomérisation de Bax sur les mitochondries et la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (Kim, Song et al. 2014). Ce médicament a un meilleur profil de sécurité que le cisplatine, en tant que tel et est utilisé chez les patients qui ne peuvent pas tolérer le cisplatine (Ndagi, Mhlongo et al. 2017). En effet, il n'induit aucune toxicité rénale ou hépatique, mais peut causer une neuropathie sensorielle cumulative (Elias, Raynard et al. 2006).

2. Morts cellulaires conventionnelles

La mort cellulaire se manifeste par des altérations morphologiques macroscopiques qui ont été utilisés historiquement par *the Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)* pour classer classiquement la mort cellulaire en trois formes différentes : mort cellulaire de type I ou apoptose, la mort cellulaire de type II ou autophagie et la mort cellulaire de type III ou nécrose. Bien que limitée, cette classification morphologique est encore largement utilisée, indépendamment des aspects moléculaires essentiels du processus de mort. Les nouvelles classifications du NCCD se centrent sur les mécanismes moléculaires et la biochimie des effecteurs des cascades de signalisation intracellulaires qui régulent et exécutent la mort cellulaire. Il est dorénavant clair qu'il existe des interconnexions et chevauchement entre les différents types de mort cellulaire.

Les molécules de chimiothérapies peuvent induire la mort des cellules cancéreuses par différentes voies. La majorité de ces molécules est connue pour induire la mort des cellules de préférence par apoptose ou nécrose (Kim, Song et al. 2014). L'enclenchement de telle ou telle voie de mort dépend du type de stress, des interactions entre les facteurs inducteurs de mort, du statut de la cellule, de son contenu en organites et de son arsenal protéique et enzymatique.

a. L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée garantit le maintien de l'homéostasie cellulaire (pendant le développement et le vieillissement), en permettant aux cellules qui doivent être éliminées d'enclencher elles-mêmes leur propre mort sans causer d'inflammation (car il y a conservation de l'intégrité de la membrane plasmique avec externalisation des phosphatidylsérines) ou de dommages au reste de l'organisme. L'apoptose intervient également en tant que mécanisme de défense, par exemple dans les réactions immunitaires ou lorsque les cellules sont endommagées par des agents pathogènes ou nuisibles. L'irradiation ou les chimiothérapies anticancéreuses entraînant des lésions de l'ADN dans les cellules, peuvent entraîner une mort apoptotique par une voie p53-dépendante (Elmore 2007). Le gène suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription qui régule le cycle cellulaire et constitue le gène le plus muté dans la tumorigenèse humaine (il est muté dans plus de 50% de tous les cancers humains). Si le gène p53 est endommagé, la suppression tumorale est sévèrement réduite. En effet, p53 peut activer les protéines de réparation de l'ADN lorsque celui-ci est endommagé, peut maintenir le cycle cellulaire au point de régulation G1 / S sur la reconnaissance de dommages à l'ADN et peut déclencher l'apoptose si ces dommages s'avèrent irréparables (Elmore 2007). Les cellules apoptotiques sont caractérisées par un

rétrécissement cytoplasmique, une condensation de la chromatine (pycnose), une fragmentation nucléaire et un petit bourgeonnement de la membrane plasmique, aboutissant à la formation de petites vésicules intactes (appelées corps apoptotiques) efficacement absorbées par les cellules voisines à activité phagocytaire et dégradées dans les lysosomes (figure 5). Deux voies distinctes peuvent initier l'apoptose, la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale). En dépit de la grande variété de signaux pouvant déclencher l'apoptose, les processus apoptotiques aboutissent à une phase effectrice commune, l'activation de protéases à cystéines, appelées caspases (cysteiny-l-aspartate-cleaving protease). L'activation de ces caspases induit la protéolyse d'un certain nombre de cibles protéiques et l'apoptose des cellules (Salvesen 1997).

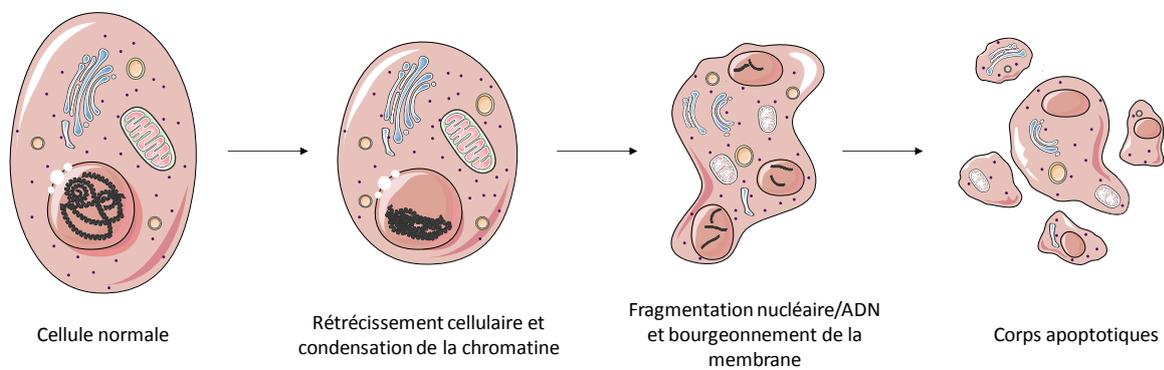


Figure 5 : Aspects morphologiques du processus d'apoptose d'une cellule. Les changements morphologiques de la cellule qui surviennent lors de la mort cellulaire apoptotique commencent par un rétrécissement cellulaire et une condensation de la chromatine, puis une fragmentation nucléaire et l'apparition concomitante d'un bourgeonnement de la membrane, qui va entraîner la formation de corps apoptotiques qui seront finalement engloutis par les macrophages ou les cellules voisines par endocytose /phagocytose. (adapté d'après Hengartner 2000, Hotchkiss 2009)

L'apoptose extrinsèque est initiée par des perturbations du microenvironnement extracellulaire et est conduite par deux types de récepteurs transmembranaires, les récepteurs de mort dont l'activation dépend de la liaison de ligands apparentés et les récepteurs à dépendance dont l'activation se produit lorsque le taux de leurs ligands spécifiques chute sous un seuil spécifique. Les récepteurs à dépendance, au contraire des autres récepteurs transmembranaires, ne sont pas éteints en absence de leur ligand mais sont actifs en présence et en absence de celui-ci. Lorsque le ligand est fixé à ce récepteur à dépendance, un signal positif est activé entraînant la prolifération, la survie, la migration ou la différenciation, tandis qu'en absence du ligand un signal proapoptotique est transmis. Ainsi, l'expression de ces récepteurs à la surface des cellules rend leur survie dépendante de la présence du ligand (Forcet 2001). De nos jours, la famille des récepteurs à dépendance compte 20 membres dont l'homologie est uniquement liée à leurs doubles fonctions. En absence de leur ligand, ces

récepteurs sont capables d'entraîner l'activation des caspases. Tous les récepteurs à dépendance possèdent un domaine intracellulaire nécessaire à l'induction de l'apoptose qui va être exposé par le clivage des caspases, permettant leur amplification souvent via le recrutement de plateformes protéiques complexes. Ces complexes activant les caspases varient d'un récepteur à dépendance à l'autre et peuvent être différents de ceux impliqués dans les voies apoptotiques classiques. Ces récepteurs sont impliqués lors de l'embryogenèse et de la tumorigenèse. Lors de cette dernière, l'expression de ces récepteurs est souvent diminuée. Si leur expression est augmentée cela peut limiter la progression tumorale par élimination des cellules surnuméraires dans un environnement limité en ligand, ces récepteurs pourraient avoir un rôle suppresseur de tumeurs (Negulescu 2018). Les récepteurs de mort dont l'activation dépend de la liaison de ligands apparentés comprennent le récepteur de mort de surface cellulaire FAS (*FAs cell Surface death receptor*) ou connu sous l'acronyme CD95 ou APO-1, et les membres 1A des récepteurs de la superfamille TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (TNFR1 : *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*), 10a (TRAILR1 : *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1* ou DR4) et 10b (TRAILR2 : *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 2* ou DR5). D'une manière générale, après la fixation des ligands spécifiques à chaque récepteur, à savoir le FAS ligand (FASL ou encore CD45L), le TNF et TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*), un complexe supramoléculaire se forme au niveau de la partie intracellulaire du récepteur de mort. Des complexes tels que le « Death Inducing Signaling Complex » (DISC), le complexe I ou le complexe II s'assemblent et fonctionnent alors comme des plateformes moléculaires de régulation de l'activation et des fonctions de la caspase 8 (ou de la caspase 10 dans certains cas limités) (Lavrik, Golks et al. 2005). Le recrutement des membres de ces complexes s'effectue au niveau du « Death Domain » (DD) du récepteur. Sont recrutés des protéines comme RIP1 (*Receptor-Interacting serine/threonine-Protein kinase 1*), FADD (*Fas Associated protein with a Death Domain*), diverses isoformes de cFLIP (*cellular FLICE (FADD-Like IL-1 β -Converting Enzyme)-Like Inhibitory Protein*) aux propriétés pro ou antiapoptotiques, mais aussi des protéines antiapoptotiques de la famille des IAPs (*Inhibitor of Apoptosis*). Une fois assemblés, les complexes entraînent l'activation par clivage enzymatique de la caspase 8 (Stupack 2013, Krueger 2001). L'exécution de l'apoptose extrinsèque entraînée par les récepteurs de mort suit deux voies distinctes. Dans les « cellules de type I », la maturation de la caspase 8 permet de cliver directement les caspases 3 et 7, les effecteurs classiques de l'apoptose, qui ne peuvent pas être inhibées par la surexpression des protéines BCL2 anti-apoptotiques, la co-délétion de Bax et Bak1, ou la perte de BID, et enclencher l'apoptose. Dans les « cellules de type II »,

l'activation des caspases 3 et 7 est inhibée par XIAP, l'apoptose extrinsèque nécessite alors le clivage du *BH3-interacting domain* (BID) par la caspase 8 (Luo 1998), tBID (forme tronquée de BID) va entraîner la perméabilisation de la membrane mitochondriale, le relargage de son contenu (notamment du cytochrome c) et l'assemblage, via la protéine APAF-1 (*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*), de l'apoptosome, un autre complexe supramoléculaire ayant pour rôle de cliver la caspase 9. La caspase 9 va alors activer les caspases effectrices 3 et 7 et conduire à la lyse de protéines cibles dont la PARP (*Poly (ADP-Ribose) Polymérase*) et mener à l'apoptose. (figure 6)

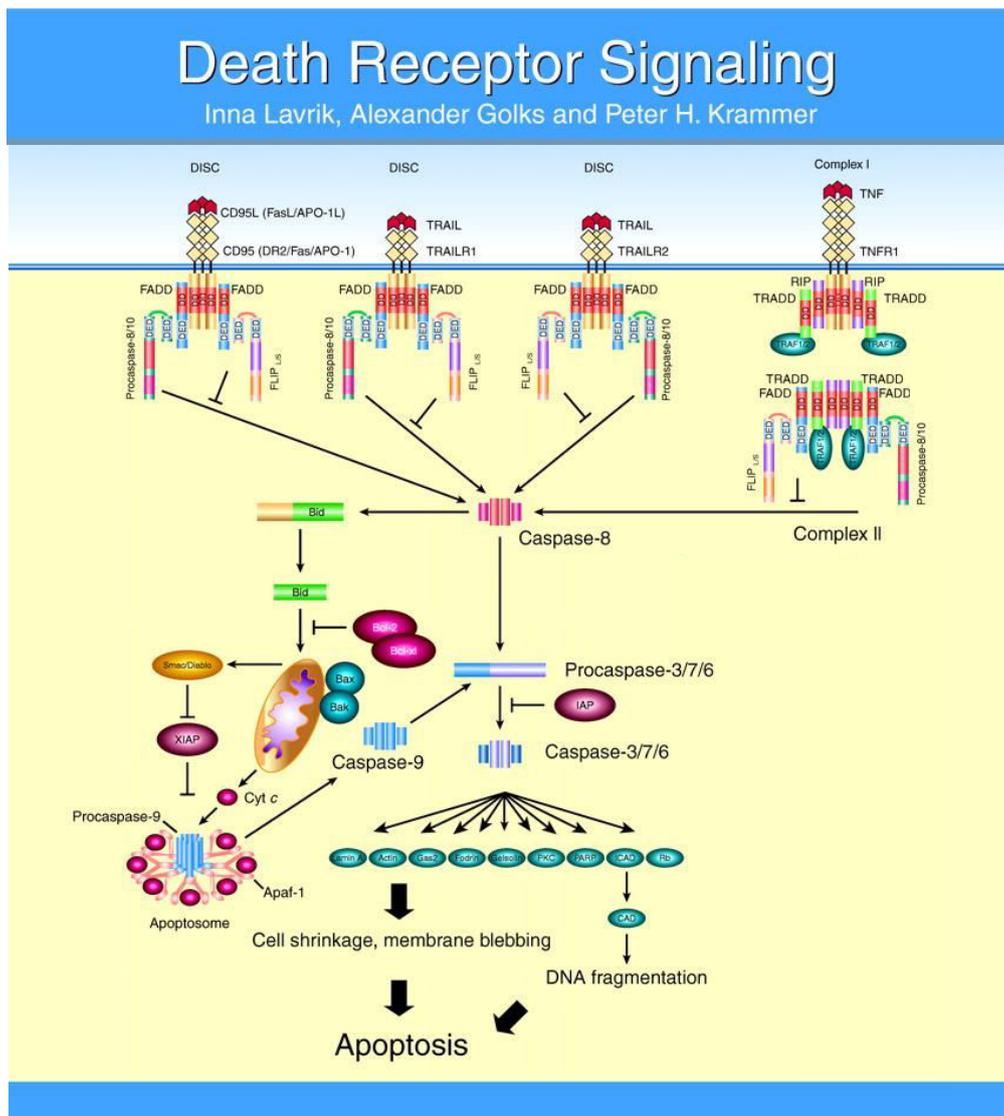


Figure 6 : Représentation simplifiée de l'apoptose extrinsèque. Activée par les récepteurs de mort elle conduit à l'activation de la caspase 8 qui une fois libérée dans le cytosol va propager le signal apoptotique en activant les caspases effectrices avec perméabilisation de la membrane mitochondriale pour les « cellules de type II », ou sans, pour les « cellules de type I ». (d'après (Lavrik, Golks et al. 2005))

L'apoptose intrinsèque est initiée par des perturbations intracellulaires incluant les dommages à l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique (RE), la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, l'altération des microtubules, ou encore la défaillance mitotique. Les cellules apoptotiques conservent l'intégrité de la membrane plasmique et l'activité métabolique (dans une certaine mesure) pendant le processus. Les différents stress activent des voies intracellulaires différentes mais convergent toutes vers les mitochondries pour entraîner la perméabilisation de ses membranes. Cette perméabilisation est régulée principalement par les protéines Bak (*BCL2-antagonist/killer*) et Bax (*BCL-2-associated X*) appartenant toutes les deux à la famille de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). La perte du potentiel transmembranaire mitochondrial entraîne la libération de deux groupes de protéines pro-apoptotiques normalement séquestrées dans l'espace inter-membranaire ou le cytosol. Le premier groupe comprend le cytochrome c, SMAC (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*) / DIABLO (*Direct IAP-Binding protein with Low pI*) et la sérine protéase HTRA2 (*High Temperature Requirement protein A2*), ces protéines active la voie dépendante des caspases. Le cytochrome c se lie et active APAF-1 ainsi que la pro-caspase 9, formant l'apoptosome et entraînant l'activation de la caspase 9. SMAC/DIABLO et HTRA2 vont inhiber l'activation des molécules IAP aux propriétés antiapoptotiques et favoriser l'activation des caspases effectrices. Le second groupe de protéines comprend AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), l'endonucléase G (ENDO G) et CAD (*Caspase Activated-DNase*), elles fonctionnent de manière indépendante des caspases. AIF et l'endonucléase G transloquent dans le noyau et vont toutes deux fragmenter l'ADN. La CAD est ensuite libérée par la mitochondrie et migre vers le noyau plus tardivement (après clivage de son inhibiteur ICAD par la caspase 3) pour cliver l'ADN et induire la mort cellulaire (figure 7) (Elmore 2007, Brentnall 2013, Galluzzi, Vitale et al. 2018).

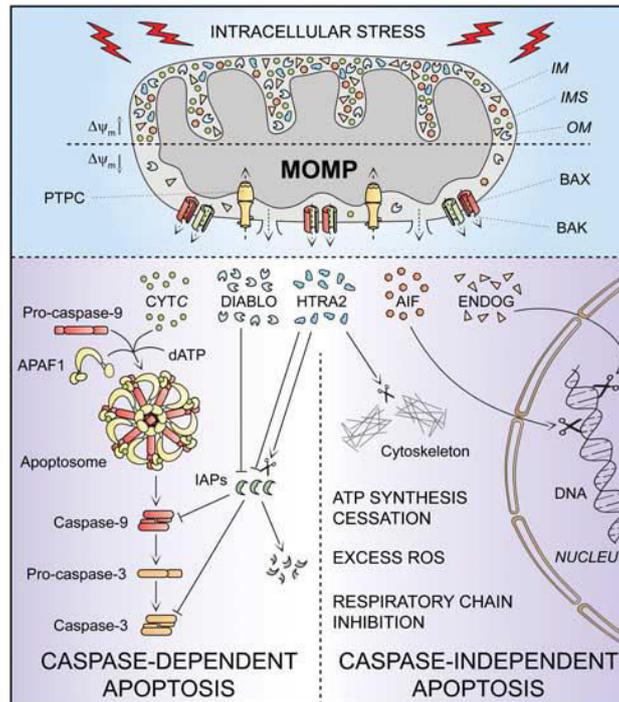


Figure 7 : Représentation simplifiée de l'apoptose intrinsèque. Induite par de multiples stress intracellulaires, la perméabilisation mitochondriale provoque le relargage de médiateurs proapoptotiques comme le cytochrome c, DIABLO ou HTRA2 menant à la formation de l'apoptosome et au clivage de la caspase 9 puis de la caspase 3. L'apoptose intrinsèque peut aussi être indépendante des caspases notamment par l'intermédiaire d'AIF et de l'ENDOG qui en étant adressés au noyau conduisent au clivage de l'ADN. (d'après (Galluzzi, Vitale et al. 2012))

In vitro, l'apoptose en phase terminale est généralement suivie d'une dégradation complète de la membrane plasmique et de l'acquisition d'un morphotype nécrotique (nécrose secondaire) avec libération de signaux de danger inflammatoires dans le milieu, à moins que les capacités phagocytaires des cellules soient suffisantes (Galluzzi, Vitale et al. 2018).

b. Mort cellulaire par autophagie

L'autophagie est un processus actif au niveau basal dans les cellules qui intervient lors du développement, de la différenciation cellulaire, dans le contrôle de la croissance et le remodelage de tissus. L'autophagie est un mécanisme cellulaire régulé de dégradation et de recyclage, participant au renouvellement des organites et à la dégradation des agrégats protéiques qui une fois dégradés seront réutilisés pour la biosynthèse de nouvelles macromolécules. L'autophagie permet donc de maintenir l'homéostasie cellulaire et est un mécanisme de survie cellulaire.

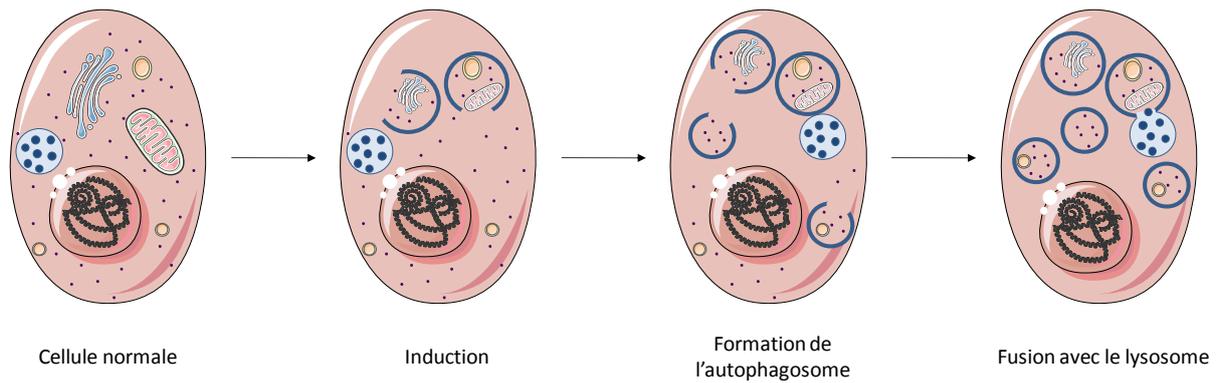


Figure 8 : Aspects morphologiques du processus d'autophagie d'une cellule. En présence d'un inducteur d'autophagie, la ségrégation progressive du matériel cytoplasmique par des structures membranaires appelées phagophores s'initie. Ce phagophore s'allonge emprisonnant le matériel cellulaire, tels que les agrégats protéiques, les organites et les organismes étrangers (bactéries et virus), la membrane séquestrante se ferme et entraîne la formation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome, qui va fusionner avec des lysosomes pour former des autolysosomes où la cargaison est dégradée par des hydrolases acides. Les produits de ces réactions cataboliques sont des éléments de bases moléculaires tels que les acides aminés, les acides gras et les nucléotides, qui sont libérés dans le cytoplasme par des perméases lysosomales. (adapté d'après Hotchkiss 2009, Nunes 2014)

Cependant, en conditions de stress tels que la privation de nutriments, les dommages aux organites ou l'accumulation de protéines anormales, l'autophagie est exacerbée pour répondre aux besoins de la cellule, puis est dépassée et enfin transformée en mécanisme de mort cellulaire. C'est ainsi qu'a été défini le terme de mort cellulaire de type II ou autophagie, décrite morphologiquement par une vacuolisation cytoplasmique étendue, une absorption phagocytaire et une dégradation lysosomale (Marinkovic, Sprung et al. 2018). Cette mort autophagique a été mise en évidence dans deux contextes distincts : *in vivo*, lors du développement de la drosophile (Denton, Shrivage et al. 2009) et *in vitro* lors de la mort de cellules cancéreuses en réponse à des agents chimiothérapeutiques en absence de modulateurs apoptotiques comme BAX et BAK ou les caspases (Shimizu, Kanaseki et al. 2004).

Il existe plusieurs types d'autophagie dont principalement la macroautophagie qui est communément appelée « autophagie », la microautophagie, et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (AMC). La macroautophagie étant le sous-type essentiellement impliqué dans la mort cellulaire, il sera le seul développé ici.

L'exécution de l'autophagie est régulée par des gènes appelés ATG (*AuTophagy-related Genes*) qui sont retrouvés et conservés depuis la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) jusqu'au mammifère (travaux menés par le biologiste japonais Ohsumi qui lui vaudront le prix Nobel de médecine en 2016). Les différents orthologues des gènes ATG codent pour des protéines

qui forment des complexes de régulations des différentes étapes du processus d'autophagie depuis la nucléation, l'élongation de la membrane de l'autophagosome, en passant par la fermeture de ce dernier, sa fusion avec le lysosome et enfin la dégradation du contenu de l'autophagolysosome (figure 8).

La macroautophagie peut être régulée chez les mammifères par la protéine kinase mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) qui en réponse à la présence de nutriments (glucose, facteurs de croissances...) est activée au sein du complexe mTORC1 et inhibe l'autophagie en réprimant ULK1/2. Lors de privation nutritive ou d'inhibition pharmacologique de mTOR (avec la rapamycine par exemple), le complexe ATG13 et ULK1 est activé et favorise l'initiation de l'autophagie (Kimmelman 2011). La formation de l'autophagosome (structure à double membrane qui englobe de manière sélective ou non la cargaison cytoplasmique destinée à la dégradation) est également régulée par un second complexe qui contient les protéines VPS34 phosphorylé et beclin1. L'activation de LC3 II (*Light Chain 3II*) résulte de l'activation de la protéine soluble LC3 par ATG4 (menant à la forme LC3 I), puis par ATG3 et ATG7 (menant à la forme couplée à la phosphatidyléthanolamine LC3 II). L'élongation et la maturation de l'autophagosome sont régulées par LC3 II qui se fixe aux phosphatidylinositols de la membrane de la vésicule puis à p62 pour faciliter sa fermeture. Le marquage de LC3 II est la technique la plus utilisée pour marquer la formation de la vésicule autophagique (Mathew, Karantza-Wadsworth et al. 2007). Finalement l'autophagosome mature fusionne avec le lysosome pour former l'autolysosome et subit l'action des hydrolases qui vont dégrader son contenu pour qu'il puisse être recyclé en composants simples et libérés dans le cytoplasme (figure 9) (Galluzzi, Pietrocola et al. 2015).

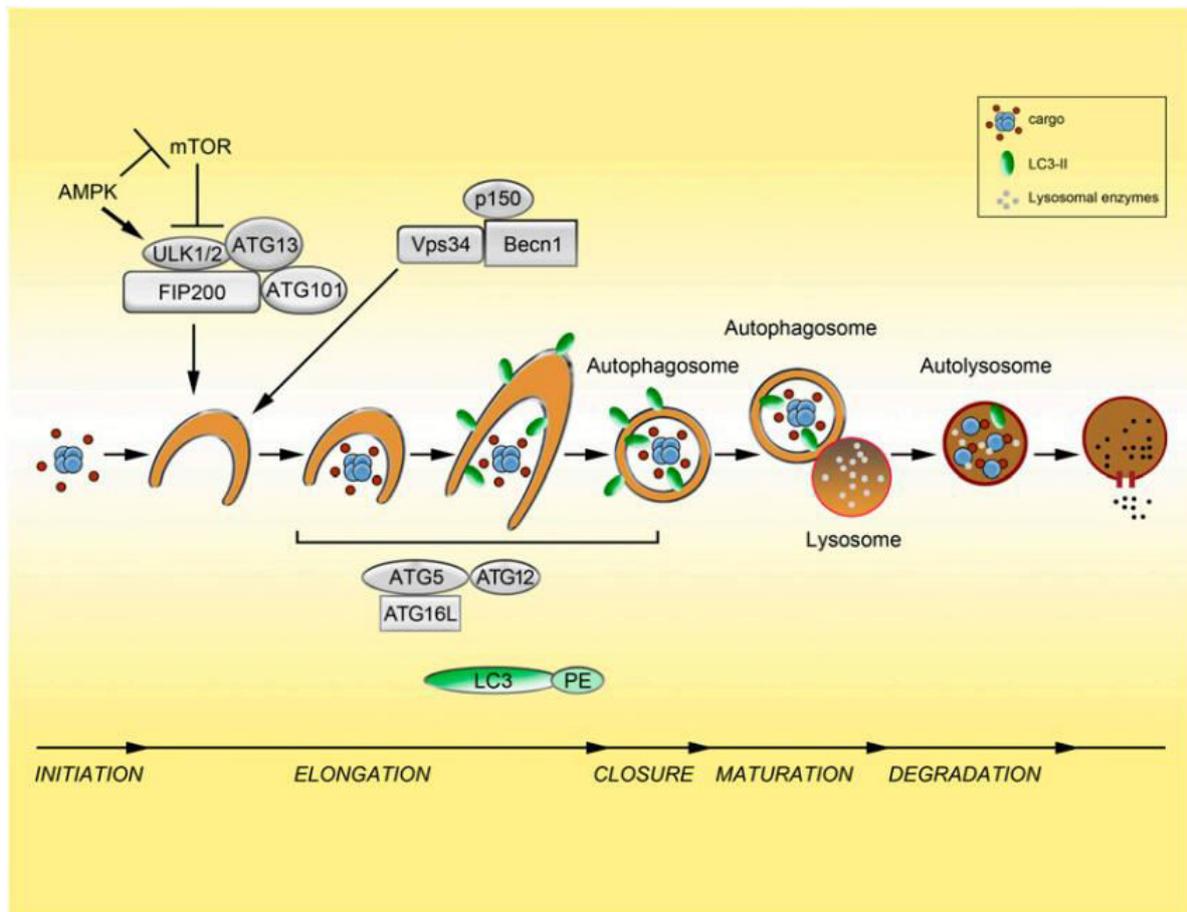


Figure 9 : Schéma de la régulation de la macroautophagie (autophagie). Les composants intracellulaires en attente de dégradation ont été séquestrés par les phagophores et formés dans un autophagosome à double membrane. La forme soluble LC3-I a été transformée par ajout d'un résidu éthanolamine en LC3-II membranaire et lié à un phagophore. L'autophagosome a voyagé dans des zones périnucléaires afin de fusionner avec des lysosomes et a mûri dans un autolysosome, entraînant une dégradation. Le matériau dégradé peut entrer dans la production d'énergie notamment pour la cellule tumorale. Il existe deux complexes de régulation de l'autophagie : mTORC1 et VPS34/beclin1. Pour le complexe mTORC1, en présence de nutriments, mTOR inhibe ULK1/2 et inhibe donc l'autophagie. Lors de privation, mTOR active ATG13 et ULK1 qui initient l'autophagie. Le deuxième complexe VPS34/beclin inhibe l'autophagie au niveau de l'autophagosome. (d'après (Kimmelman 2011)).

Dans un contexte cancéreux, l'autophagie est considérée comme possédant des capacités suppressives de la transformation tumorale au stades précoces de la tumorigenèse, cependant l'autophagie possède un rôle potentialisateur dans les cancers avancés (Mokarram, Albokashy et al. 2017).

Ainsi, l'autophagie a été proposée comme étant un mécanisme pouvant supprimer la transformation maligne par plusieurs moyens, y compris : la préservation de la stabilité génétique (protection contre les dommages à l'ADN, élimination des micronoyaux, régulation des membres homologues de la famille des ras, la dégradation des ARN rétrotransposants) ; le

maintien des fonctions bioénergétiques normales (élimination des sources endogènes d'espèces réactives de l'oxygène potentiellement mutagènes (ROS), élimination des agrégats) ; la dégradation des protéines potentiellement oncogéniques (*mutant tumor protein p53* : TP53^{mut}, *breakpoint cluster region– ABL proto-oncogene 1* : BCR-ABL1, *promyelocytic leukemia – retinoic acid receptor alpha* PML-RAR(A), p62) ; des effets antiviraux et antibactériens; l'activation optimale de la sénescence induite par l'oncogène et la mort cellulaire induite par l'oncogène ; le maintien d'un compartiment de cellules souches normales; des fonctions anti-inflammatoires multi-fonctions ; et un rôle clé dans l'éllicitation et l'exécution de l'immunosurveillance anticancéreuse (relargage d'ATP, activité des lymphocytes T cytotoxiques, recrutement des cellules présentatrices d'antigènes et relargage de chemokines). Inversement une fois la transformation maligne survenue, l'autophagie favorise la progression de la tumeur et la résistance au traitement. Ces fonctions de soutien des tumeurs reflètent la capacité de l'autophagie à : améliorer la résistance des cellules cancéreuses aux conditions endogènes qui provoquent normalement la mort cellulaire, telles que le détachement de la membrane basale, l'hypoxie et la privation de nutriments ; rendre les cellules transformées moins sensibles à la mort cellulaire induite par la thérapie ; soutenir la survie des cellules cancéreuses qui entrent dans un état de dormance ou de sénescence en réponse à la thérapie ; et assurer le maintien du compartiment des cellules souches cancéreuses. Au niveau cellulaire, les réponses autophagiques ont presque toujours des effets bénéfiques, mais elles sont préjudiciables à l'hôte lorsqu'elles se produisent dans des cellules qui ont déjà initié une transformation maligne (figure 10) (Kimmelman 2011, Burada, Nicoli et al. 2015, Galluzzi, Pietrocola et al. 2015).

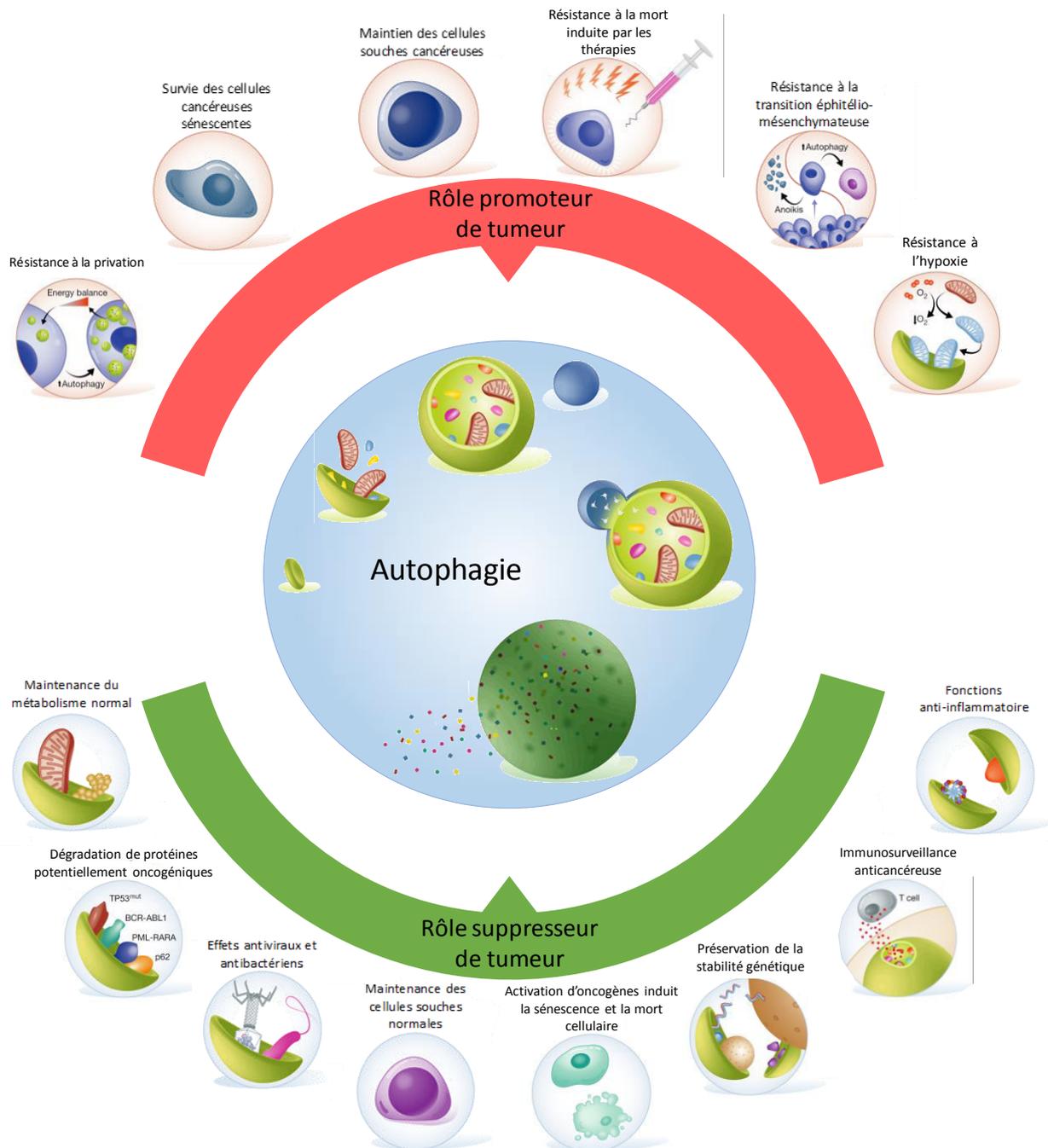


Figure 10 : Les rôles doubles et contradictoires de l'autophagie dans le cancer. L'autophagie peut potentiellement agir comme un promoteur ou un inhibiteur de la transformation de la cellule normale en cellule maligne. Les fonctions oncosuppressives de l'autophagie sont due à ses capacités à maintenir la stabilité génétique, le métabolisme normal et les cellules souches normales, les activités antibactériennes, antivirales et anti-inflammatoires, la dégradation des protéines éventuellement oncogéniques, l'activation de la sénescence et de la mort cellulaire induites par des oncogènes et enfin une immunosurveillance anticancéreuse efficace. L'autophagie a également des fonctions soutenant la progression tumorale, par le maintien des cellules souches tumorales, la survie des cellules sénescents cancéreuses, la résistance à l'hypoxie, à la famine, à la mort cellulaire induite par les thérapies et à la transition épithélio-mésenchymateuse. (adapté d'après (Burada, Nicoli et al. 2015, Galluzzi, Pietrocola et al. 2015))

Les inhibiteurs pharmacologiques de l'autophagie exercent des effets antinéoplasiques sur les tumeurs établies, en particulier en association avec d'autres formes de thérapie. Cependant il n'existe pas d'inhibiteurs hautement spécifiques de l'autophagie destinés à être utilisés chez l'homme, et les molécules utilisées jusqu'à présent dans ce but (à savoir, la chloroquine et l'hydroxychloroquine) ont plusieurs effets non ciblés. De plus, l'impact réel de l'autophagie sur l'oncogenèse et la progression tumorale est très dépendant du contexte, il est donc essentiel de caractériser les néoplasmes spécifiques pour leur dépendance réelle à l'autophagie avant de mettre en œuvre l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie dans la routine clinique (Galluzzi, Pietrocola et al. 2015).

Le concept d'autophagie comme processus de mort cellulaire est controversé et au centre du débat, la question portant sur la place de l'autophagie comme exécutrice de la mort cellulaire ou comme simple mécanisme qui accompagne et favorise un autre type de mort cellulaire (comme l'apoptose extrinsèque, la nécroptose ou le ferroptose) reste à élucider (Galluzzi, Vitale et al. 2018).

c. La nécrose

La mort cellulaire nécrotique ou nécrose a été considérée pendant longtemps comme un simple mécanisme de mort cellulaire accidentelle et a été définie par l'absence de caractères morphologiques de l'apoptose ou de l'autophagie. Cette mort est caractérisée par une entrée massive du milieu extracellulaire au sein de la cellule entraînant un gain de volume cellulaire (oncoses), un gonflement des organites qui vont perdre leurs fonctions, une perte de cohésion et donc une rupture de la membrane plasmique et une perte subséquente du contenu intracellulaire déclenchant un signal de danger (figure 11). Ce processus est suivi par une réaction inflammatoire, caractérisée par un afflux de cellules immunitaires (polynucléaires neutrophiles et lymphocytes) au niveau du site de l'inflammation.

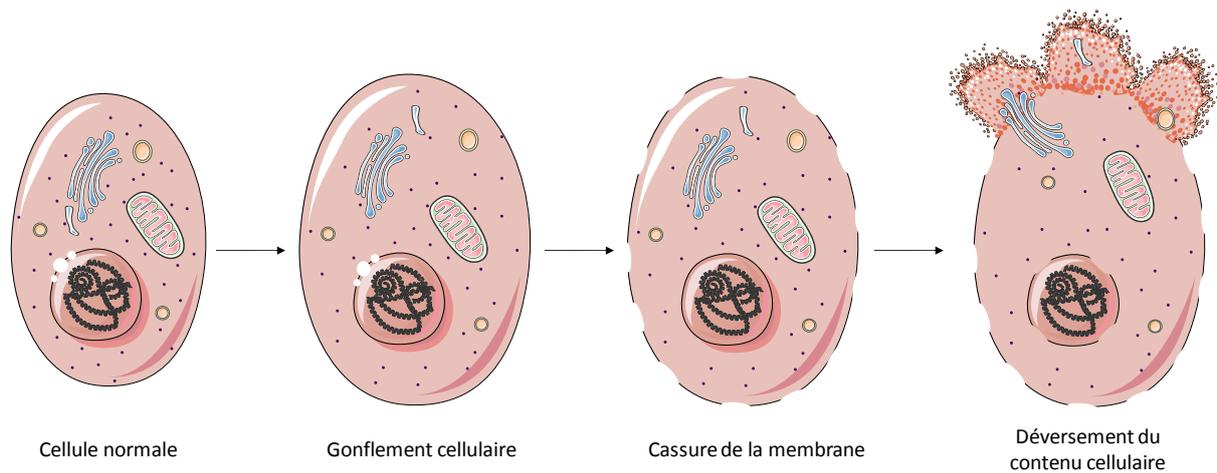


Figure 11 : Aspects morphologiques du processus de nécrose d'une cellule. Le premier changement morphologique qui survient lors de la nécrose est l'entrée massive de milieu extracellulaire au sein de la cellule entraînant son gonflement jusqu'à rupture de la membrane plasmique et déversement du contenu de la cellule dans son environnement, déclenchant une réaction inflammatoire. (adapté d'après Hotchkiss 2009, Nunes 2014)

Aujourd'hui nous savons que cette mort nécrotique est un processus qui peut être régulé par un ensemble de voies de transduction du signal et de mécanismes cataboliques. Par exemple, les récepteurs du domaine de mort (TNFR1, Fas et TRAILR) et les récepteurs de type Toll (TLR3 et TLR4) se sont révélés provoquer une nécrose, en particulier lors de l'utilisation d'inhibiteurs de caspases (comme le z-VAD), où la sérine/thréonine kinase RIP1 et son homologue RIP3 ne sont pas dégradés et s'engagent plutôt dans des interactions physiques et fonctionnelles avec FADD et TRADD qui finissent par activer le nécrosome et l'exécution de la mort cellulaire nécrotique (Holler 2000).

Plusieurs sortes de nécroses émergent ces dernières années, on identifie la nécrose accidentelle, par opposition à d'autres types de nécroses régulées. Comme la nécroptose qui est identifiée en tant que nécrose régulée déclenchée par des perturbations extracellulaires détectées par des récepteurs de mort spécifiques (par exemple FAS et TNFR1) (Vercammen 1997, Vercammen 1998) ou les récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR) (TLR3, TLR4 ; et ZBP1 liant l'ADN-Z protéine 1 (ZBP1)) ou des perturbations de l'homéostasie intracellulaire (Kaiser 2013, Upton 2012). La nécroptose dépend de façon critique de MLKL (*Mixed Lineage Kinase domain Like pseudo kinase*), de l'activité kinase de RIP3, et de RIP1, ainsi elle peut être inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs de RIP1 (nécrostatine) (figure 12).

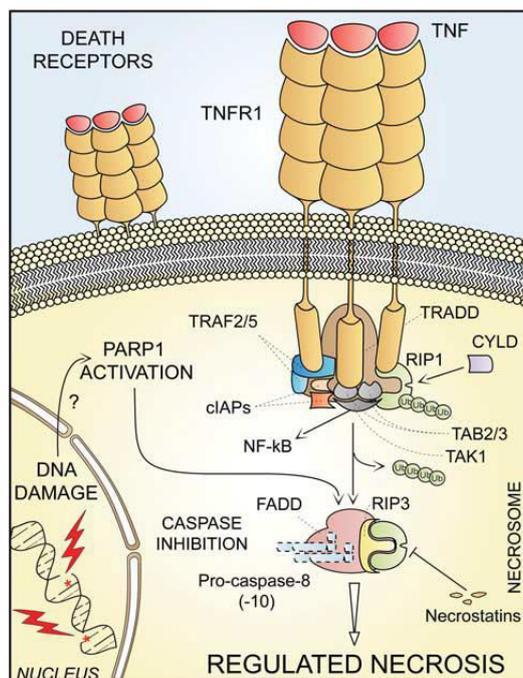


Figure 12 : La nécrose régulée. La stimulation du TNFR1 peut entraîner le recrutement intracellulaire de TRADD (*TNF Receptor type 1-Associated Death Domain protein*), TRAFs (*TNF Receptor-Associated Factor*), cIAPs et RIP1. Dans ce cas RIP1 est polyubiquitinée par cIAPs menant au recrutement des TABs (*TAK binding proteins*) et TAK (*TGFβ-Activated Kinase*), à l'activation nucléaire du facteur de transcription NF-κB et la survie cellulaire. Dans des conditions d'inhibition de la caspase-8 notamment, de désubiquitination de RIP1 par l'enzyme de la cylindromatose (CYLD) ou activation de la PARP1, RIP1 et RIP3 interagissent avec FADD pour former le nécrosome et enclencher la nécrose. (d'après Galluzzi 2012)

On identifie également la nécrose liée à la transition de perméabilité mitochondriale « MPT-driven necrosis » pour *Mitochondrial Permeability Transition-driven necrosis*, qui est initiée par une perturbation spécifique de l'environnement intracellulaire tels que le stress oxydatif sévère et une surcharge en Ca^{2+} cytosolique qui entraîne une perte soudaine de l'imperméabilité de la membrane mitochondriale interne aux petits solutés, résultants en une dissipation rapide du potentiel transmembranaire mitochondrial, la rupture osmotique des deux membranes de la mitochondrie et la mort cellulaire régulée (Izzo 2016). La composition, la régulation et le mécanisme précis d'action du complexe PTPC (*Permeability Transition Pore Complex*) au niveau de la jonction des deux membranes interne et externe de la mitochondrie sont encore sous investigation (Galluzzi, Vitale et al. 2018).

3. Mort cellulaires atypiques

a. Entose

L'entose est un type de mort émergent qui tend à devenir le quatrième type de mort cellulaire programmée. L'entosis est une forme de cannibalisme cellulaire ou xénophagie (destruction intracellulaire d'organismes étrangers) découvert dans les tumeurs humaines mais se produisant également dans les tissus sains, au cours de laquelle les cellules se détachent de la matrice extracellulaire et perdent la signalisation de l'intégrine, les cellules forment entre elles lors d'interactions des jonctions adhérentes contenant des E-cadhérines et des β -catenines. Ces adhérences vont permettre l'englobement de cellules viables par des cellules non phagocytaires de même type (homotypique) ou différent (hétérotypique) (structure « cellule-dans-cellule ») (Martins, Raza et al. 2017, Galluzzi, Vitale et al. 2018). Cette internalisation de cellules est un phénomène indépendant des processus apoptotiques (Overholtzer, Mailleux et al. 2007). Les cellules entotiques internalisées sont éliminées par dégradation lysosomale par les cellules hôtes, dans certains cas ces cellules entotiques échappent à la mort ou se divisent à l'intérieur de leur cellule hôte, puis sont libérées et recommencent à proliférer (Martins, Raza et al. 2017).

b. Ferroptose

La ferroptose est une mort cellulaire régulée, découverte récemment, initiée par des perturbations oxydatives du microenvironnement intracellulaire, une peroxydation lipidique sévère, qui repose sur la génération de ROS et la disponibilité en fer et se caractérise principalement par un rétrécissement du volume cellulaire et une densité membranaire mitochondriale. La ferroptose est sous le contrôle de l'enzyme Gluthation-PeroXydase 4 (GPX4), cette enzyme limite la peroxydation lipidique et est donc capable d'inhiber de manière endogène la ferroptose. La ferroptose est indépendante des caspases, des composants des nécrosomes et des CYPD (*CycloPhilin D*), et de la machinerie moléculaire de l'autophagie, cependant elle manifeste un morphotype nécrotique (Galluzzi, Vitale et al. 2018). Cette mort cellulaire est impliquée dans des pathologies humaines, notamment dans la survenue et la prolifération d'un certains types de tumeurs, le cancer du pancréas, le carcinome rénal et la carcinome hépatocellulaire (cancer primitif du foie) (Yu, Guo et al. 2017).

c. Pyroptose

La pyroptose est déclenchée par des perturbations de l'homéostasie intra- ou extracellulaire liée à l'immunité innée (lors d'invasion par des agents pathogènes, notamment en présence du LPS cytosolique des bactéries Gram négatives) et est caractérisée par la condensation de la chromatine ainsi que le gonflement cellulaire entraînant la perméabilisation de la membrane plasmique. Cette mort cellulaire repose sur l'activation d'une ou plusieurs caspases (y compris CASP1, CASP3, CASP11 murine, et ses homologues humains CASP4 et CASP5) en fonction du stimulus initiateur et est associée à la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18. La pyroptose dépend de la gasdermine D qui est un substrat des caspases inflammatoires et est une protéine qui entraîne la formation de pores dans la membrane plasmique (porogène). Entraînant la libération du contenu cytoplasmique des cellules hôtes mourantes, fournissant ainsi des signaux pro-inflammatoires robustes (Man, Karki et al. 2017, Galluzzi, Vitale et al. 2018).

d. Parthanatose

La parthanatose est provoqué par des stimuli qui induisent des dommages à l'ADN, tels que les irradiations aux ultraviolet ou des agents alkylants, mais également par un stress oxydatif, l'hypoxie, l'hypoglycémie et les signaux inflammatoires, qui suractivent la Poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) une transférase impliquée dans la réparation de l'ADN. Cette hyperactivation de PARP1 entraîne une catastrophe bioénergétique, la production de polymères PAR qui induisent la libération de la forme tronquée du facteur induisant l'apoptose (AIF) de la membrane mitochondriale externe et son entrée dans le noyau, où AIF induit une fragmentation nucléaire par un mécanisme méconnu et une condensation de la chromatine (Soriano, Mora-Espi et al. 2017, Galluzzi, Vitale et al. 2018). La synthèse et l'accumulation de PAR et la translocation nucléaire de AIF sont uniques à la parthanatose (Fatokun, Dawson et al. 2014).

e. Mort cellulaire NETotic

La NETose est une forme particulière et controversée de la mort cellulaire mise en évidence dans des neutrophiles PolyMorphoNucléaires (PMN) qui, en réponse à divers acteurs microbiens ou stimuli des récepteurs spécifiques tels que les TLR, libèrent des pièges extracellulaires neutrophiles (NET). Les NETs sont des réseaux de fibres libérés par les neutrophiles qui sont composées de chromatine décondensée dans un complexe avec différentes protéines granulaires et cytoplasmiques neutrophiles qui peuvent capturer, neutraliser et tuer les microbes (Yang, Jiang et al. 2015). La libération de NETs peut être retrouvée chez les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles et n'entraîne pas forcément

une lyse cellulaire. Au vue de ces observations une investigation plus poussée est nécessaire pour déterminer si la NETose est un cas spécifique de ces sous-programmes de mort cellulaire limité aux cellules hématopoïétiques ou si elle constitue un mécanisme de mort cellulaire en soi.

f. Mort cellulaire lysosome dépendante

Les lysosomes sont des organites acides qui interviennent dans la dégradation intracellulaire des macromolécules grâce à leur contenu riche en enzymes hydrolytiques. L'endommagement de ces organites entraîne souvent la perméabilisation de la membrane lysosomale et la libération dans le cytoplasme du contenu lysosomale soluble, qui comprend des enzymes protéolytiques de la famille des cathepsines (cathepsines B et D) et d'autres protéases lysosomales (chymotrypsine B et protéinase 3). Ceci active plusieurs cascades intracellulaires qui favorisent un type de mort cellulaire régulée, appelée mort cellulaire lysosomale (Serrano-Puebla and Boya 2018). Les mécanismes moléculaires fonctionnant en amont de la perméabilisation membranaire du lysosome ne sont pas complètement élucidés. Dans certaines circonstances, la perméabilisation semble se produire en aval de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale à la suite d'une signalisation apoptotique (Galluzzi, Vitale et al. 2018). Cette mort cellulaire dépendante des lysosomes peut être inhibée par un blocage pharmacologique ou génétique de l'activité de la cathepsine ou par la protection de la membrane lysosomale, stabilisant ainsi l'organelle. Les altérations lysosomales sont courantes dans les cellules cancéreuses et peuvent augmenter la sensibilité de ces cellules à des agents qui favorisent la perméabilisation des membranes lysosomales (Serrano-Puebla and Boya 2018).

IV. Chimiothérapie et modulation de la réponse immunitaire : **Mort cellulaire immunogène**

L'action des chimiothérapies sur le cancer ne repose pas uniquement sur leur cytotoxicité directe vis-à-vis des cellules tumorales mais également dans certains cas sur leur action sur le système immunitaire. La mise en place d'une réponse immunitaire dépend d'un cycle de sept étapes principales, commençant par la libération des antigènes de la cellule cancéreuse et se terminant par la destruction des cellules cancéreuses. Lors de la première étape, les néo-antigènes tumoraux sont libérés par les cellules tumorales et capturés par les cellules dendritiques pour traitement. Ensuite, ces cellules dendritiques présentent les antigènes capturés sur les molécules CMH I et CMH II aux cellules T (étape 2), ce qui entraîne l'amorçage et l'activation de réponses des cellules T contre les antigènes spécifiques du cancer (étape 3). Les cellules T effectrices activées se propagent (étape 4) et infiltrent le lit de la tumeur (étape 5), elles reconnaissent et se lient spécifiquement aux cellules cancéreuses par l'interaction de son récepteur des cellules T et son antigène apparenté lié au CMH I (étape 6) et tuent leur cellule cancéreuse cible (étape 7). La mise à mort de la cellule cancéreuse libère des antigènes associés à la tumeur (étape 1 à nouveau) pour augmenter l'ampleur et la profondeur de la réponse lors de révolutions ultérieures du cycle (Chen 2013).

1. Immunogénicité de la mort cellulaire induite par chimiothérapie

Certains agents chimiothérapeutiques entraînent des dommages qui vont conduire à l'exposition membranaire de protéines (calréticuline), à la sécrétion de cytokines ou à la rupture de la membrane plasmique et la libération du contenu cellulaire. Ce relargage de molécules sont des signaux de dangers, appelés DAMPs (« *Damage Associated Molecular Patterns* ») et permettent de « sensibiliser » le système immunitaire à la reconnaissance des antigènes.

Les premiers travaux qui ont mis en évidence la capacité de certaines chimiothérapies à entraîner une mort immunogène ("*Immunogenic Cell Death*" ICD), c'est-à-dire une mort cellulaire capable d'activer une réponse immunitaire adaptative spécifique des antigènes endogènes (cellulaires) ou exogènes (viraux) exprimés par les cellules mourantes, sont ceux du laboratoire de recherche du Pr. Guido Kroemer. Son équipe a montré que des cellules tumorales coliques murines (CT26) exposées à des doses létales de chimiothérapie

(doxorubicine) *in vitro* permettent de vacciner des souris syngéniques contre une future injection de cellules tumorales et cela sans l'utilisation d'adjuvant. Les effets de ces chimiothérapies ne sont pas retrouvés avec des souris immunodéficientes (nu/nu). Mettant en évidence que les cellules mettent en place une réponse immunitaire efficace grâce aux deux facteurs nécessaires : la présentation d'antigènes tumoraux et les DAMPs qui stimulent l'immunité innée (Casares, Pequignot et al. 2005). Cette même équipe a démontrée qu'un grand nombre d'agents chimiothérapeutiques (mitoxantrone, oxaliplatine) ou physiques (haute pression hydrostatique, rayonnement ionisant) sont capables d'induire l'ICD. Ces inducteurs ont la capacité de déclencher une mort par apoptose dépendante des caspases et un stress du réticulum endoplasmique (RE), changeant ainsi la croyance de l'époque qui considérait l'apoptose comme une mort non inflammatoire et non immunogène.

L'ICD est caractérisée par l'exposition à la membrane plasmique des cellules mourantes de la calréticuline (CRT) (protéine chaperonne du RE dont l'exposition à la membrane plasmique est dépendante de la phosphorylation d'eIF2 α), le relargage d'ATP, la libération de HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*) dans l'espace extracellulaire, l'activation d'une réponse IFN α (intrinsèque aux cellules tumorales) et la sécrétion consécutive de CXCL10 (*CXC-Chemokine Ligand 10*) (figure 13).

2. Stress du réticulum endoplasmique et exposition membranaire de la calréticuline

Les chimiothérapies immunogènes induisent l'exposition de la calréticuline (une protéine chaperonne fixant le calcium la plus abondante au sein du RE) à la surface des cellules tumorales mourantes, qui agit comme un signal "eat me" pour les DC (*Dendritic Cell*) circulantes. Les cellules dendritiques vont initier la réponse immunitaire spécifique en assurant la cross présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T cytotoxiques. Cette translocation se produit de manière précoce dans le processus d'ICD, avant le passage des phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique et la rupture de la membrane (Obeid, Tesniere et al. 2007) et est donc un événement pré-apoptotique. Trois événements de signalisation sont nécessaires pour conduire à l'exposition de la calréticuline : un stress du RE avec phosphorylation du facteur eIF2 α (*eukaryotic Initiation Factor 2 α*), un signal apoptotique et un transport antérograde du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Le processus commence par une production importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui permettraient l'activation des voies de stress du RE. Au niveau du stress

du RE, la kinase PERK (*Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*) phosphoryle eIF2 α qui va favoriser le processus apoptotique en entraînant l'activation de la caspase 8 et par conséquent le clivage de la protéine BCPA31. Ce clivage entraîne la libération de Bax et Bak qui vont perturber la perméabilité mitochondriale, conduisant à la libération du cytochrome c. La combinaison des deux événements (stress du RE et signal apoptotique) conduit à une modulation du transport vésiculaire permettant la mise en place de l'exocytose, qui implique le transport antérograde de la calréticuline du RE vers la membrane plasmique via l'appareil de Golgi. Ce transport est dépendant de la protéine VAMP1 (*Vesicle Associated Membrane Protein 1*) et de la protéine SNAP25 (*SyNaptosomal-Associated Protein25*) (Panaretakis, Kepp et al. 2009). La reconnaissance de la calréticuline par les cellules présentatrices d'antigènes (DC, macrophages et neutrophiles) grâce à la fixation de LRP1 (*Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1*) et CD69 favorise la phagocytose des corps apoptotiques et est nécessaire pour l'amorçage de la réponse immunitaire adaptative (Garg, Krysko et al. 2012). En plus des signaux «eat me» sur les cellules tumorales mourantes, des DAMP co-stimulateurs sont nécessaires pour générer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace (ATP et HMGB1).

3. Relargage d'ATP

De multiples inducteurs de mort immunogène (oxaliplatine, mitoxanthrone et doxorubicine) peuvent entraîner le relargage d'ATP des cellules tumorales mourantes. La libération d'ATP peut se produire par plusieurs mécanismes, cependant il semblerait que le mécanisme principal par lequel les niveaux d'ATP soient élevés dans les cellules subissant l'ICD soit l'autophagie. L'ATP contenu dans les vésicules cytoplasmiques est redistribué vers les autolysosomes grâce au processus autophagique dépendant des protéines ATG5, ATG7 et BCN1. Les protéines LAMP1 (*Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*) contenues dans les autolysosomes favorise la rupture de la membrane lysosomale et le relargage d'ATP dans le cytosol ou dans le milieu extracellulaire si les autolysosomes fusionnent directement avec la membrane plasmique. L'ATP peut également être relargué à l'extérieur de la cellule par un pore membranaire, la pannexine-1 (PANX1) après activation par les caspases (Martins, Wang et al. 2014). L'ATP extracellulaire va jouer un rôle d'attractant sur les cellules immunitaires et va également activer la voie de l'inflammasome. La fixation de l'ATP sur le récepteur P2Y2 des monocytes et des DC induit leur recrutement et leur différenciation dans le microenvironnement tumoral. Une fois les cellules immunitaires naïves recrutées sur les sites tumoraux et exposés aux signaux "eat-me", elles ont besoin de signaux d'activation pour

augmenter leurs activités anti-tumorales. La signalisation de l'ATP via les récepteurs P2RX7 conduit à un relargage de potassium (K⁺) et par voie de conséquence à l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les DC et les macrophages. La formation de l'inflammasome NLRP3 conduit à l'activation de la caspase-1 qui va cliver et entraîner la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18, deux cytokines aux propriétés pro inflammatoires puissantes (Ghiringhelli, Apetoh et al. 2009). Bien que P2RX7 soit exprimé sur plusieurs types de cellules, l'ATP agit principalement sur les DC pendant l'ICD. La surexpression des ectonucléotidases CD39 et CD73, qui dégrade l'ATP en AMP puis en adénosine qui est immunosuppressive, à la surface de certaines cellules (tumorales, lymphocytes T activés et lymphocytes T régulateurs) permet de limiter l'immunosurveillance induite par l'ATP et de stopper la réponse immunitaire (Senovilla, Aranda et al. 2014).

4. Libération d'HMGB1

HMGB1 est une protéine qui joue un rôle important dans la stabilisation des nucléosomes, la régulation transcriptionnelle de l'ADN et la réparation de l'ADN. En plus de son rôle intranucléaire, HMGB1 joue un rôle clé dans l'inflammation, la différenciation et la migration cellulaire et les métastases tumorales des cellules survivantes à la chimiothérapie (Luo, Chihara et al. 2013). HMGB1 est sécrétée par les macrophages (Bonaldi, Talamo et al. 2003), les DC (Dumitriu, Bianchi et al. 2007) et les *Natural Killer* (NK) (Semino, Angelini et al. 2005) en réponse à une infection ou une blessure. Après traitement par certaines chimiothérapies ou par irradiation, HMGB1 est libéré par les cellules tumorales mourantes, après perméabilisation de la membrane nucléaire et cytoplasmique, et est donc un évènement tardif du processus de mort cellulaire. Cependant le mécanisme derrière la libération d'HMGB1 reste encore à être pleinement élucidé. Une fois dans l'espace intercellulaire, HMGB1 se lie aux récepteurs TLR2, TLR4 ou encore aux récepteurs RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*) (Scaffidi, Misteli et al. 2002, Lotze and Tracey 2005). La fixation d'HMGB1 à TLR4 au niveau des cellules dendritiques semble être le signal permettant de percevoir la mort comme étant immunogène et permet de diminuer la dégradation lysosomale du matériel phagocyté et ainsi d'augmenter la présentation des antigènes, cependant ce signal n'induit pas la maturation des DC qui est principalement stimulée par RAGE. Ainsi, la mort n'est pas perçue comme immunogène si les cellules cancéreuses sont dépourvues d'HMGB1 ou s'il y a absence de TLR4 (Galluzzi, Vitale et al. 2018). Par ailleurs, la fixation d'HMGB1 à CXCL2 permettrait le chimiotactisme des cellules dendritiques via la signalisation CXCR4 (Schiraldi, Raucci et al. 2012).

Ainsi l'exposition de la calréticuline sur la membrane plasmique, la libération d'ATP et le relargage d'HMGB1 bien que nécessaire, ne sont pas suffisant séparément pour qu'une drogue de chimiothérapie soit immunogène. En effet pour stimuler le système immunitaire par une mort immunogène, ces trois signaux sont complémentaires et sont absolument nécessaires car ils permettent d'agir à différents niveaux de l'attraction et de la stimulation des cellules présentatrices d'antigènes. L'ATP et HMGB1 participent au recrutement des DC et à leur maturation, tandis que la calréticuline favorise la phagocytose des cellules mourantes et permet plus tard l'exposition des peptides tumoraux qui permettront d'activer les lymphocytes T naïfs et mémoires présents dans les organes lymphoïdes secondaires et tertiaires. Les cellules effectrices T-CD8 et T-CD4 vont migrer et infiltrer la tumeur pour inhiber la prolifération et détruire les cellules tumorales par l'intermédiaire de l'IFN γ , du TNF α ou encore des enzymes cytotoxiques (perforine et granzyme). Ainsi, l'oxaliplatine est capable de stimuler une réponse immunitaire ciblée contre la tumeur, à la différence du cisplatine qui ne déclenche pas l'exposition de la calréticuline à la membrane en raison de son incapacité à induire un stress du RE et échoue donc à initier l'ICD.

5. Sécrétion d'autres signaux de danger

La reconnaissance d'ADN cytosolique par les cellules dendritiques, un signal de danger issu des cellules tumorales mourantes, par différents capteurs cytosoliques, fournit un mécanisme de détection des tumeurs et d'activation de l'immunité anti-tumorale. La GMP-AMP cyclique (cGAMP) synthase (cGAS) est un capteur d'ADN cytosolique qui active les réponses immunitaires innées via la production du second messager, cGAMP, qui active au niveau du réticulum endoplasmique l'adaptateur *Stimulator of Interferon Genes* (STING). Cet adaptateur se rend alors dans le compartiment intermédiaire RE-Golgi puis dans l'appareil de Golgi. Après la phosphorylation de STING par *Serine/Threonine-protein Kinase 1* (TBK1), celui-ci recrute l'*Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) qui va se dimériser puis entrer dans le noyau, où avec NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) ils vont activer l'expression d'IFN de type I, du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et de molécules co-stimulantes telles que CD86. Les interférons stimulent la maturation des cellules dendritiques et facilitent la présentation des antigènes associés aux tumeurs dans le CMH I. Les cellules dendritiques migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques pour activer les cellules T CD8⁺, qui détruisent les cellules tumorales présentes dans les tissus cibles (Chen 2013).

La signalisation autocrine/paracrine de l'IFN de type I après activation de TLR3 dans les cellules cancéreuses est responsable de la libération de CXCL10, un facteur chimiotactique puissant des lymphocytes T permettant le recrutement des DC immatures (Sistigu, Yamazaki et al. 2014). On peut également retrouver d'autres signaux de dangers impliqués dans l'immunogénicité des cellules cancéreuses, tels que le relargage de l'annexine A1 (ANXA1), l'exposition à la membrane plasmique de la protéine disulfure isomérase A3 (protéine chaperonne du RE PDIA3 : *Protein Disulfide Isomerase Family A member 3*), le relargage des protéines de choc thermique 70kDa et 90kDa (HSP70 : *Heat Shock Protein 70* et HSP90 : *Heat Shock Protein 90*) et la sécrétion de métabolites lipidiques (cardiolipine, peptide N-formylé) (Galluzzi, Buque et al. 2017).

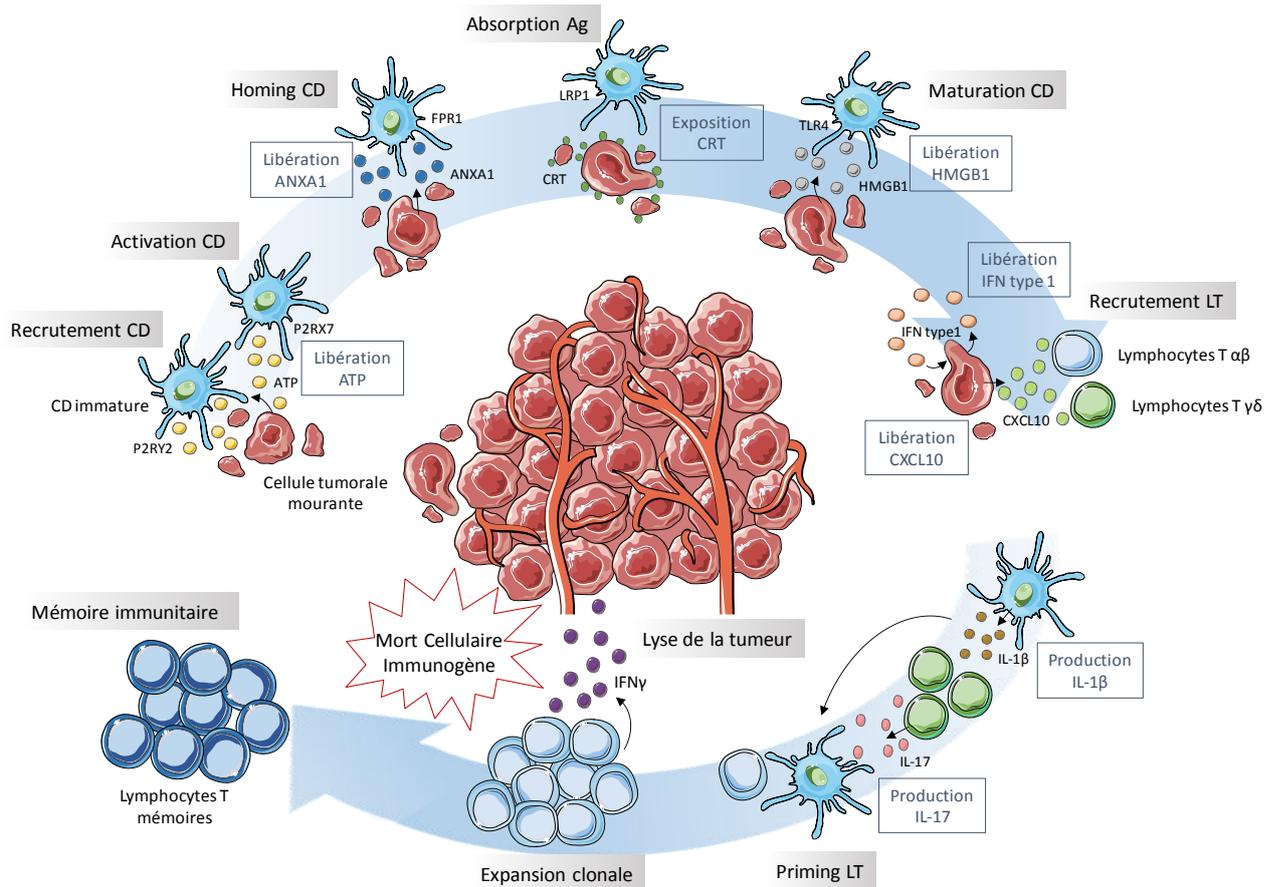


Figure 13: Mécanisme de mort cellulaire immunogène induite par la chimiothérapie. En réponse à un inducteur de mort cellulaire immunogène (ICD), tels que l'oxaliplatine, les cellules cancéreuses exposent la calréticuline (CRT) et d'autres protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique à leur surface, sécrètent l'ATP et HMGB1, initient une réponse intrinsèque de type interféron de type I (IFN) aboutissant à la production de CXCL10 et au relargage de l'annexine A1 (ANXA1). Lors de la liaison aux récepteurs apparentés à la surface des cellules myéloïdes ou lymphoïdes, ces DAMPs favorisent l'absorption des corps apoptotiques et de leurs débris par les cellules présentatrices d'antigènes, tels que les cellules dendritiques (DC). Dans le contexte de signaux immunostimulateurs robustes, tout ceci entraîne finalement l'amorçage d'une réponse immunitaire adaptative impliquant à la fois les cellules T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ en plus d'être associé à l'établissement de la mémoire immunologique, une telle réponse a le potentiel d'éradiquer les cellules tumorales qui survivent à la chimiothérapie via un mécanisme dépendant de l'IFN γ . CXCR3, récepteur CXC-chemokine 3; FPR1, récepteur du peptide formyle 1; IFNAR1, sous-unité α/β du récepteur interféron1; IL, interleukine; LRP1, protéine 1 liée au récepteur LDL; P2RX7, récepteur purinergique P2X7; P2RY2, récepteur purinergique P2Y2; TLR4, récepteur Toll-like 4 (adapté d'après (Galluzzi, Buque et al. 2017)).

L'activation de réponses immunitaires spécifiques est un enjeu important dans le développement de solutions thérapeutiques anti-cancéreuses. Les thérapies antitumorales conventionnelles, comme la chimiothérapie et la radiothérapie, peuvent permettre de moduler positivement les réponses immunitaires anti-cancéreuses. La compréhension des mécanismes impliqués dans les effets immunostimulants de ces thérapies est cruciale pour améliorer leur efficacité en les combinant par exemple à des agents immuno-modulateurs plus classiques.

Objectif de la thèse

Le but de ce projet a été de mettre en avant et de comprendre l'importance de l'un des paramètres variables de la CIP : l'hypotonie. En effet nous avons voulu étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les effets de l'hypotonie sur la mort cellulaire et la réponse immunitaire anti-tumorale en évaluant son impact sur la mort cellulaire immunogène. Nous avons également voulu transposer ces résultats *in vivo* avec un modèle d'envahissement tumoral du péritoine chez la souris. Dans le but de proposer un rationnel pour les chirurgiens afin qu'ils réalisent la chimiothérapie intrapéritonéale en conditions hypotoniques plutôt qu'hyperthermiques.

Il est nécessaire de développer des schémas chimiothérapeutiques sûrs et plus efficaces, ainsi que d'établir des critères complets pour la chimiothérapie intrapéritonéale en plus de produire de nouveaux schémas thérapeutiques avec des profils de toxicité acceptables.

PARTIE EXPERIMENTALE

Rôle de l'hypotonie dans la réponse à la chimiothérapie **intra-péritonéale :**

Étude des effets sur la mort des cellules cancéreuses et la mort immunogène induite par les dérivés du platine.

I. Introduction :

La prise en charge de la carcinose péritonéale secondaire d'un cancer colorectal consiste à ouvrir la cavité abdominale du patient pour mettre à nu le péritoine et faire un bain de chimiothérapie : la chimiothérapie intrapéritonéale. Pour le traitement des localisations péritonéales des carcinomes d'origine colorectale, la combinaison de la chirurgie et de la CHIP présente des effets bénéfiques sur la survie des patients, comparée au traitement standard de chimiothérapies administrées par voie intraveineuse. En effet, la CHIP permet de concentrer la chimiothérapie dans la cavité abdominale qui agit directement sur les cellules tumorales et les nodules péritonéaux cancéreux. Cependant, la survie à long terme est toujours limitée, suggérant que le traitement pourrait être optimisé (Lu, Wang et al. 2010).

Il n'existe pas de protocoles standardisés pour la CHIP et chaque chirurgien établi un protocole qui lui est propre de manière empirique et sans rationnel expérimental. Ainsi de nombreux critères sont variables, comme la nature et la dose de chimiothérapies (oxaliplatine, mitomycine C), la température (37 ou 42°C), la pression exercée sur l'abdomen du patient lors de l'intervention, le temps d'exposition à la chimiothérapie (entre 30 et 120 minutes) ou encore le soluté d'incubation (isotonique ou hypotonique).

C'est sur l'importance de ce dernier point que nous nous sommes focalisés. Nous avons dans un premier temps déterminé les conditions optimales de la chimiothérapie intrapéritonéale *in vitro*, en faisant varier les paramètres d'osmolarité, les doses et temps d'expositions. Puis nous avons voulu comprendre les effets et le rôle de l'hypotonie dans cette modélisation et notamment dans la mort des cellules cancéreuses et l'activation du système immunitaire à travers la mort immunogène. Une approche expérimentale animale a également été réalisée sur un modèle de souris Balb/c atteintes d'une carcinose péritonéale et traitées intrapéritonéalement. Dans ce modèle, la mort des souris est ralentie par les effets combinés de l'oxaliplatine et de l'hypotonie induite par le glucose 2.5%.

II. Matériels et méthodes

1. Lignées cellulaires

Les différentes lignées cellulaires provenant de l'*American Type Culture Collection* (ATCC) ont été cultivées dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640 : D.Dutscher), supplémenté avec 10% (vol/vol) de sérum de veau foetal (SVF : PAN Biotech) et 1% de PeniStreptomycine-Amphotéricine B (PSA : D.Dutscher) dans une étuve à 37°C et à une atmosphère humide à 5% de CO₂ et ont été testées régulièrement pour écarter les risques de contamination par des mycoplasmes.

Les lignées utilisées pour ce travail sont : HCT116, SW480, HCT8, HT29 (lignées humaines d'adénocarcinome colorectal) et CT26 (lignée murine de carcinome colorectal).

Lignées cellulaires cancer colorectal	Organisme	Sexe / Souche	Statuts mutationnels : microsatellite instable (MSI) / microsatellite stable (MSS)
HCT116	Homo sapiens	Masculin	MSI
SW480	Homo sapiens	Masculin	MSS
HCT8	Homo sapiens	Masculin	MSI
HT29	Homo sapiens	Féminin	MSS
CT26	Mus musculus	Balb/c	MSI

2. Réactifs et traitements

Les cellules sontensemencées à raison de 100 000 cellules par puits en plaques 24 puits. Le lendemain, les cellules tumorales coliques ayant adhéré au fond du puits, le milieu RPMI supplémenté est retiré délicatement et les cellules sont traitées pendant différents temps selon l'expérience avec une solution isotonique [OptiMem : 300 mosm/L (life technologies)] ou une solution hypotonique [glucose 2,5% - G2,5% : 142 mosm/L (B.Braun)] contenant les différents composés de chimiothérapies à différentes concentrations pendant 30 minutes. Ces traitements sont réalisés dans une étuve à 37 ou 42°C. Les solutions de traitements sont ensuite retirées et remplacées par le milieu supplémenté et placées à 37°C pendant différents temps selon l'expérience.

Réactifs		Fournisseur	Concentration
OptiMem		Life technologies	300 mosm/L
Glucose 2.5%		B.Braun	142 mosm/L
Chimiothérapie	Carboplatine	Dakota	500 μ M
	Cisplatine	Mylan	250 μ M
	Oxaliplatine	Sanofi aventis	400 μ M
	5-Fluorouracile	Sanofi aventis	250 μ M
	Raltitrexed	Hospira	50 μ M
	Paclitaxel	Bristol-Myers Squibb	0.5 μ M
	Vinblastine	Velbé	0.5 μ M
	Doxorubicine	Sigma-Aldrich	12.5 μ M
	SN38	Sigma-Aldrich	20 μ M
	Bléomycine	Bellon	50 μ M
	Mitomycine c	Sigma-Aldrich	50 μ M
	Melphalan	Aspen Pharma Trading	500 μ M
Cyclophosphamide	Baxter	500 μ M	
DMSO	Diméthylsulfoxyde	Sigma-Aldrich	
zVAD		Bachem	50 μ M
CuSO ₄	Sulfate de cuivre II	Sigma-Aldrich	1 mM

3. Tests de viabilité

Après traitement, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X (tampon salin phosphate - D.Dutscher) puis fixées avec de l'éthanol absolu pendant 60 minutes à température ambiante. L'éthanol a ensuite été retiré et les cellules ont été colorées avec une solution de crystal violet (0,5% dilué dans un mélange méthanol 10% / eau 90%) pendant 3 minutes et rincées avec de l'eau. Après séchage complet, les cellules ont été resuspendues dans de l'acide acétique 33% pendant 20 minutes. L'absorbance à 590 nm a été mesurée dans chaque puits grâce à un spectrophotomètre (UVM340 ASYS). Les puits contenant les cellules non traitées ont été normalisés à 100% de viabilité, les absorbances des autres puits ont été rapportées à ce contrôle.

4. Dosage intracellulaire du platine par spectrométrie d'absorption atomique

Les cellules ont été implantées en flasques de 25 cm² à 2 millions de cellules par flasque. Le lendemain, les cellules ont été traitées par l'oxaliplatine dans différentes conditions d'osmolarité, puis trypsinées et culotées. La teneur en platine des culots cellulaires a ensuite été analysée par spectrométrie d'absorption atomique comme décrit précédemment par la plateforme Welience (Polycarpe, Arnould et al. 2004).

5. Western Blotting

Après traitement des cellules, celles-ci ont été récupérées par trypsination et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire a été resuspendu dans du PBS et centrifugé à nouveau. Les cellules ont été ensuite resuspendues dans le tampon de lyse (1% de sodium dodécyl sulfate (SDS), 1mM de vanadate de sodium, 10mM de Tris (pH 7,5) et cocktail complet d'inhibiteurs de protéases). Pour améliorer la lyse, une sonication d'amplitude 30% pendant 7 secondes a été appliquée. La concentration protéique a ensuite été évaluée à l'aide du kit BioRad CD Protein Assay. Cinquante microgramme d'extraits protéiques ont ensuite été séparés sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes puis transférés sur membranes de nitrocellulose. Après une étape de saturation de 1 heure dans du tampon adapté à la nature de l'anticorps (Ac) primaire utilisé, les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire (dilué dans le tampon comme décrit ci-dessous) pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes ont été lavées 3 fois avec du PBST ou TBST (selon l'anticorps utilisé), puis incubées avec l'anticorps secondaire pendant 30 minutes à température ambiante dans la solution de saturation adéquate. Les membranes ont été lavées à nouveau 3 fois avec du PBST ou TBST pendant 10 minutes avant analyse par chimioluminescence à l'aide d'un appareil ChemiDoc (BioRad).

Réactifs		Fournisseur	Tampon
Anticorps	Anti- β -actine	Sigma-Aldrich	PBST 0.5% lait 5%
	Anti-caspase 3 clivée	Cellsignaling	PBST 0.1% lait 5%
	Anti-caspase 7 clivée	Cellsignaling	PBST 0.1% lait 5%
	Anti-caspase 9 clivée	Cellsignaling	PBST 0.1% lait 5%
	Anti-PARP clivée	Cellsignaling	PBST 0.5% BSA 5%
	Anti-P-eIF2 α	Cellsignaling	TBST 0.5% BSA 5%
	Anti-eIF2a total	Cellsignaling	TBST 0.5% BSA 5%
	Anti-IgG lapin couplé HRP produit chez le porc	Jackson Immunoresearch	
	Anti-IgG souris couplé HRP produit chez la chèvre	Jackson Immunoresearch	

6. Immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées en plaque 12 puits (150 000 cellules par puits) contenant une lamelle de verre (631-0150, WWR) qui a été préalablement prétraitée 10 minutes avec de la Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich). Le lendemain, les cellules ont été traitées selon les conditions indiquées. Après 18h ou 24h, les cellules ont été lavées, fixées avec 4% de PFA à 4°C pendant 10 minutes et perméabilisées avec un mélange PBS, 0.5% de BSA et 0.1% de saponine (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes à température ambiante. Les échantillons ont été incubés 2 heures à température ambiante avec les anticorps primaires (anti-CTR1 ou anti-HMGB1). Puis les échantillons ont été lavés 2 fois et incubés avec les anticorps secondaires anti-lapin couplés à Alexa488 pendant 30 minutes à température ambiante.

Les lamelles ont été montées sur une lame de microscopie (Dutscher) avec une goutte de milieu de montage contenant du DAPI (Sigma-Aldrich) pendant 15 minutes dans le noir. Les lames ont été imagées en utilisant un microscope droit à fluorescence (Zeiss) équipé d'une caméra CDD et d'un objectif 63x, 1.4NA.

Réactifs		Fournisseur
Anticorps	Anti-CTR1	NovusBiological

7. Détermination de la mort cellulaire

Pour un prétraitement par l'inhibiteur de caspases, le lendemain de leur ensemencement les cellules HCT116 ont été incubées pendant 2 heures avec 50µM de zVAD-fmk (Bachem), puis lavées avec du PBS 1X, avant d'être traitées par une solution isotonique ou hypotonique d'oxaliplatine 400µM pendant 30 minutes à 37°C. Les solutions de traitements ont été ensuite retirées et remplacées par les solutions de prétraitements et placées à 37°C pendant 24 heures. Les cellules ont été récupérées par action de la trypsine et les marquages AnnexineV (FITC)/7AAD (BD Biosciences) ont été réalisés en suivant les recommandations du fournisseur. La liaison de l'AnnexineV et l'incorporation du 7AAD ont été détectées par un cytomètre en flux LSRII (BD Biosciences) et analysées en utilisant le logiciel Flowjo.

8. Marquage Calréticuline

Après mise en culture de 100 000 cellules CT26 par puits et leur traitement, celles-ci ont été récupérées, trypsinées et centrifugées à 300g pendant 10 minutes à 4°C, puis reprises dans la solution de DAPI (NucBlue) et incubées 5 minutes à température ambiante. Après lavage et centrifugation, le culot a été repris dans du FSB (*Flow cytometry Solution Buffer*) et incubé 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont été de nouveau centrifugées et le culot repris dans la solution d'anticorps primaire (anti-calréticuline ou IgG contrôle dilués à 4µg/mL sans le FSB - Abcam). Après 1 heure d'incubation à température ambiante dans le noir, les cellules ont été lavées avec du FSB avant d'être centrifugées à 300g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est incubé 10 minutes dans du paraformaldéhyde à 0.25X, puis lavé avec du FSB. Après centrifugation, les cellules ont été incubées pendant 45 minutes dans le noir dans une solution d'anticorps secondaires couplés Alexa488 (Fischer Scientific) dilués dans le FSB. Enfin, les cellules ont été lavées avec du FSB, centrifugées, puis reprises dans du FSB avant d'être analysées par cytométrie en flux (cytomètre LSRII – BD Biosciences). L'analyse est réalisée sur les cellules négatives pour le DAPI.

9. Dosage ATP dans le surnageant

Le dosage de l'ATP est effectué avec le kit CellTiter-Glo® *Luminescent Cell Viability Assay* de Promega. Le test est basé sur la détection de l'activité de la luciférase qui est dépendante de l'ATP.

Après mise en culture et traitement des cellules CT26 dans un milieu de culture ne contenant pas de SVF, celui-ci a été récupéré et centrifugé deux fois à 300g pendant 10 minutes à température ambiante pour éliminer toutes les cellules résiduelles. Puis 100µL du surnageant de culture ont été déposés dans des puits d'une plaque 96 puits opaque, auxquels ont été ajoutés 100µL de *Cell Titer-GloReagent* pendant 10 minutes dans le noir. La luminescence a été mesurée avec un luminomètre Envision (Perkin Elmer) et la quantité d'ATP déterminée grâce à une gamme étalon.

10. Dosage HMGB1 dans le surnageant

Le taux d'HMGB1 est mesuré avec le kit de détection HMGB1 de Chondrex.

Les puits d'une plaque 96 puits ont été préalablement recouverts par l'anticorps de capture sur la nuit à 4°C, puis lavés trois fois avec la solution de lavage du kit. Après mise en culture et traitement des cellules CT26, 50µL du milieu de culture (préalablement centrifugé pour éliminer les cellules résiduelles) ont été déposés dans les puits de la plaque 96 puits. L'anticorps de détection couplé à l'HRP a été ensuite ajouté. Après agitation, la plaque a été incubée à 37°C pendant 1 heure, puis placée à 4°C pendant 16 à 24 heures. Les puits ont été ensuite lavés trois fois avec la solution de lavage, avant d'être incubés avec la Streptavidine Peroxidase pendant 30 minutes à température ambiante. Après lavage, le TMB (Tetramethylbenzidine) a été ajouté pendant 30 minutes d'incubation à température ambiante, puis la solution Stop a été ajoutée. L'absorbance à 450 nm a été mesurée dans chaque puits grâce à un spectrophotomètre (UVM340 ASYS).

11. Infiltrats tumoraux

Tous les animaux sont nourris et maintenus en accord selon la FELASA (*Federation for Laboratory Animal Science Associations*) et le Guide du Comité d'Ethique de l'Expérimentation Animal (Université de Bourgogne-Franche-Comté, France). Les animaux utilisés ont entre 6 et 22 semaines de vie. Les souris femelles Balb/c (âgées de 6 à 8 semaines) proviennent des Laboratoires Charles Rivers.

Les cellules CT26 (500 000) ont été injectées en sous-cutanées dans 100µL de PBS, les souris Balb/c ont été traitées lorsque la taille de la tumeur a atteint 8x8mm par une injection intratumorale de chimiothérapie (oxaliplatine : 150mg/L) en isotonie (optiMEM) ou en hypotonie (G2.5%). Trois jours plus tard les tumeurs sont récupérées et dissociées mécaniquement et enzymatiquement et les lymphocytes T CD8 triés positivement sur colonnes magnétiques LS (Miltenyibiotec). Les lymphocytes T CD8⁺ sont ensemencés en plaque et restimulés par les anticorps CD3, CD28 pendant une journée. Le surnageant de culture est utilisé pour doser l'IFN γ en ELISA en suivant les recommandations du fournisseur (BD Biosciences).

12. Modèle de carcinose péritonéale

Nous avons réalisé un décollement des adhérences abdominales des souris femelles Balb/c (âgées de 6 à 8 semaines) avec une injection de 2mL de solution de chimiothérapie ou non, en intra-péritonéal. Les solutions utilisées contenaient soit uniquement le liquide isotonique (optiMEM) ou le liquide hypotonique (glucose 2.5%), soit de la chimiothérapie (oxaliplatine : 150mg/L) en solution isotonique (optiMEM) ou en solution hypotonique (G2.5%). Ces solutions contenaient également 25 000 cellules CT26. Après injection, un massage du ventre des souris a été réalisé (ce qui permet une meilleure répartition des cellules au sein de la cavité, mimant ainsi un envahissement métastatique du péritoine). Les souris ont ensuite été sacrifiées lors de l'apparition de signes de souffrances critiques (critères généraux pour la décision d'euthanasie : prise de poids, abdomen distendu, posture anormale, membre traînant, prostration, poils hérissés, dos rond, hypoactivité...).

13. Tests statistiques

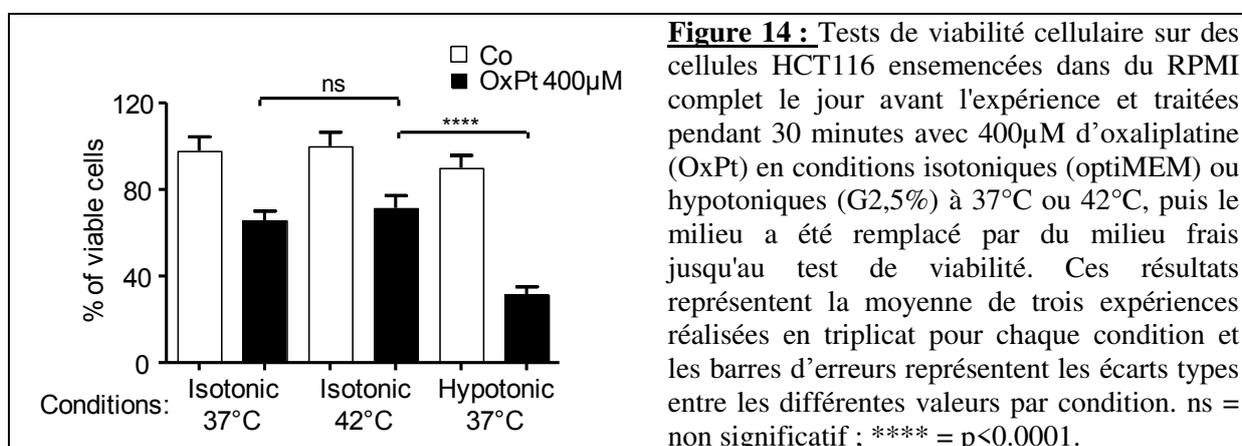
Le test statistique utilisé, lorsque les expériences ont été réalisées au moins trois fois, est un test t « one-tailed » non paramétrique avec un intervalle de confiance de 95%. Les barres d'erreurs représentent les écarts types entre les différentes valeurs par condition. ns = non significatif ; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

Le test statistique utilisé pour l'analyse de la modélisation de carcinose péritonéale *in vivo* est un test de Logrank non paramétrique avec un intervalle de confiance de 95%. **** = $p < 0.0001$.

III. Résultats

L'hypotonie augmente la mort cellulaire médiée par les dérivés du platine.

Afin d'évaluer l'importance de deux des principaux paramètres de la CIP que sont l'hyperthermie et l'hypotonie, nous avons étudiés l'impact de l'hyperthermie et de la solution hypotonique sur la capacité de l'oxaliplatine à induire la mort des cellules tumorales. Pour cela, les cellules de carcinomes colorectaux humains HCT116 ont été traitées 30 minutes avec ou sans oxaliplatine (400 μ M, correspondant à 150mg/L la concentration utilisée chez l'homme) dans l'optiMEM à 37°C (isotonie; 300mOsm - 37°C) ou à 42°C (isotonie - 42°C) ou dans du glucose 2.5% (hypotonie; 154mOsm - 37°C). Le milieu a été remplacé par du RPMI supplémenté avec du FBS et la viabilité cellulaire a été évaluée 24h plus tard.



Contrairement à l'hyperthermie qui échoue à augmenter la cytotoxicité de l'oxaliplatine, les effets de l'oxaliplatine sur la viabilité cellulaire sont augmentés en conditions hypotoniques. Le pouvoir de synergie de l'oxaliplatine avec l'hypotonie est plus fort qu'avec l'hyperthermie (figure 14). La suite des expériences a donc été réalisée en hypotonie à 37°C.

Nous avons ensuite cherché à savoir s'il était possible d'utiliser des concentrations en oxaliplatine plus faibles avec des temps d'expositions plus courts. Pour cela, nous avons fait varier les concentrations de chimiothérapies utilisées (doses d'oxaliplatine : 25, 50, 100, 200 et 400 μ M) et le temps d'exposition à la chimiothérapie (5, 10, 15 et 30 minutes).

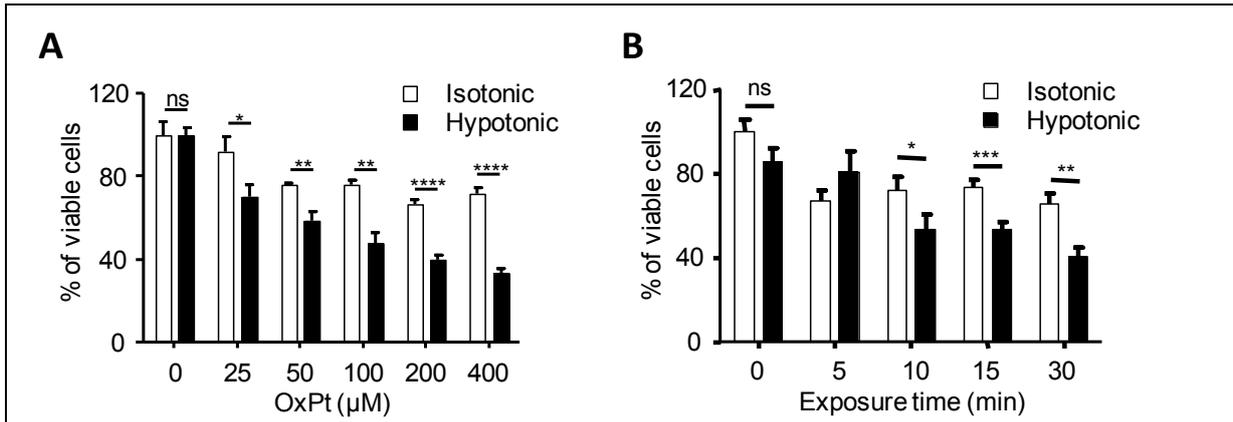


Figure 15 : Tests de viabilité cellulaire sur des cellules HCT116 traitées **A.** avec des doses croissantes d'oxaliplatine pendant 30 minutes en conditions isotoniques (optiMEM) ou hypotoniques (G2,5%) **B.** pendant différents temps avec 400μM d'OxPt. Ces résultats représentent la moyenne de trois expériences réalisées en triplicat pour chaque condition et les barres d'erreurs représentent les écarts types entre les différentes valeurs par condition. ns= non significatif ; * = p<0.05 ; ** = p<0.005 ; *** = p<0.001 ; **** = p<0.0001.

Ainsi, les effets de l'hypotonie sur la toxicité de l'oxaliplatine sont retrouvés dans des conditions de temps d'exposition et des concentrations plus courts, notamment pour une concentration de 100μM de chimiothérapie (figure 15A) et 15 minutes d'exposition (figure 15B).

Pour confirmer une concentration et un temps d'exposition optimaux pour la suite de la modélisation *in vitro*, nous avons vérifié la viabilité cellulaire 15 jours après un traitement de 15 ou 30 minutes avec 100μM ou 400μM d'oxaliplatine.

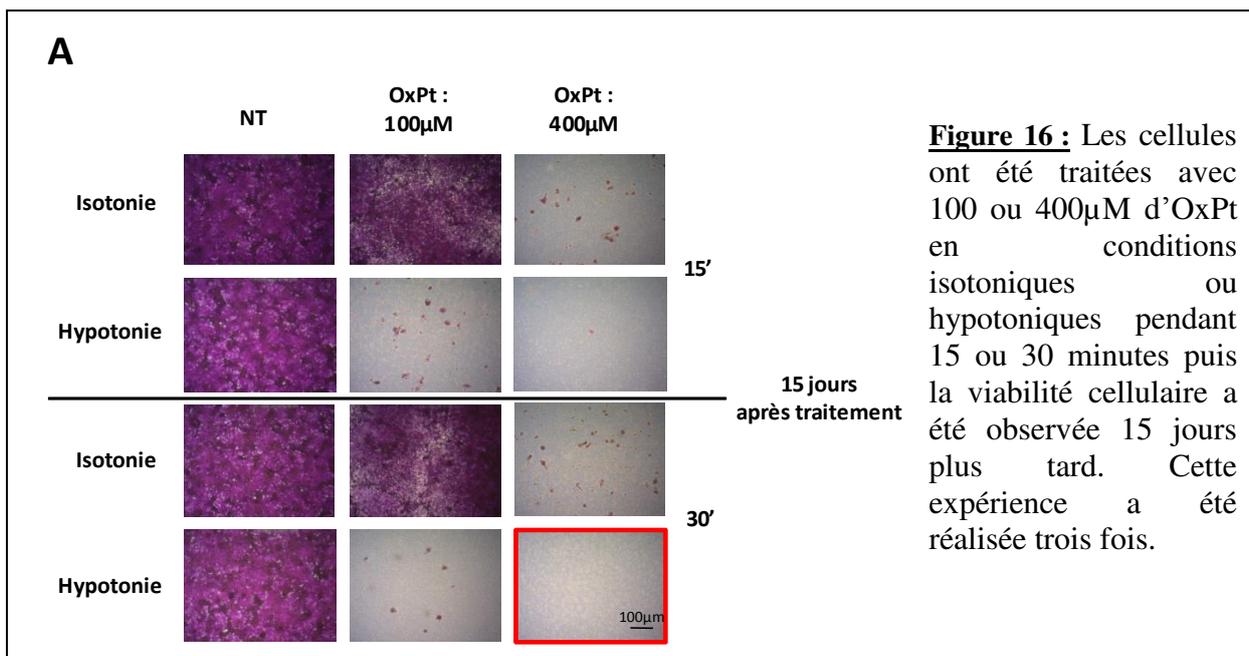
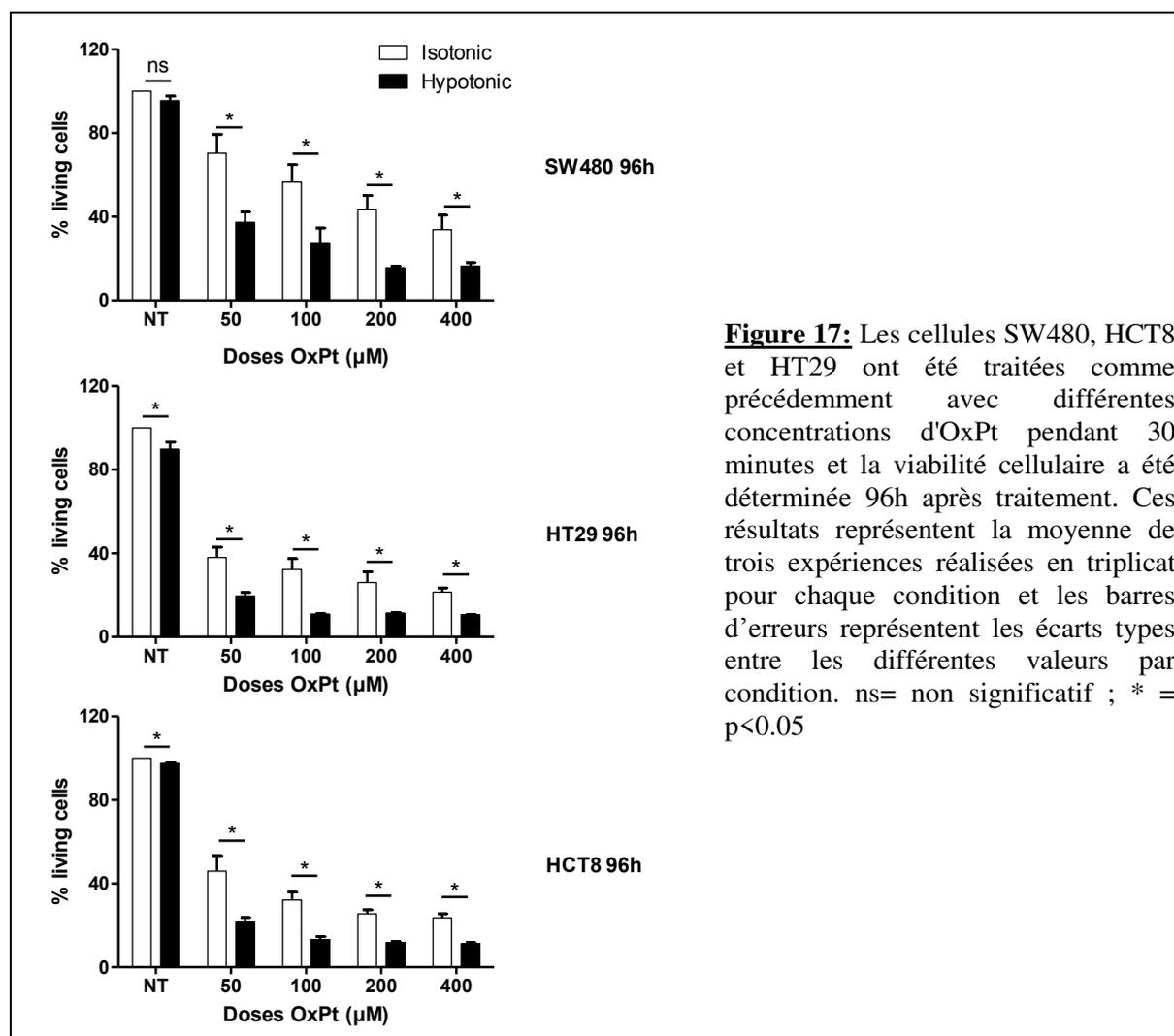


Figure 16 : Les cellules ont été traitées avec 100 ou 400μM d'OxPt en conditions isotoniques ou hypotoniques pendant 15 ou 30 minutes puis la viabilité cellulaire a été observée 15 jours plus tard. Cette expérience a été réalisée trois fois.

Bien que des effets synergiques aient pu être observés entre l'hypotonie et 30 minutes d'exposition à 100 μ M d'oxaliplatine après 24 heures, nous montrons que cette condition se révèle être peu efficace sur un plus long terme. En effet, des cellules tumorales persistent après un traitement à la concentration de 100 μ M en isotonie et en hypotonie. Pour la concentration de 400 μ M d'oxaliplatine, nous pouvons observer la présence de quelques cellules résiduelles pour le temps d'exposition de 15 minutes en isotonie et en hypotonie ainsi que pour 30 minutes d'exposition à la chimiothérapie en isotonie, alors qu'après une exposition de 30 minutes en hypotonie, aucune cellule ne survit (figure 16).

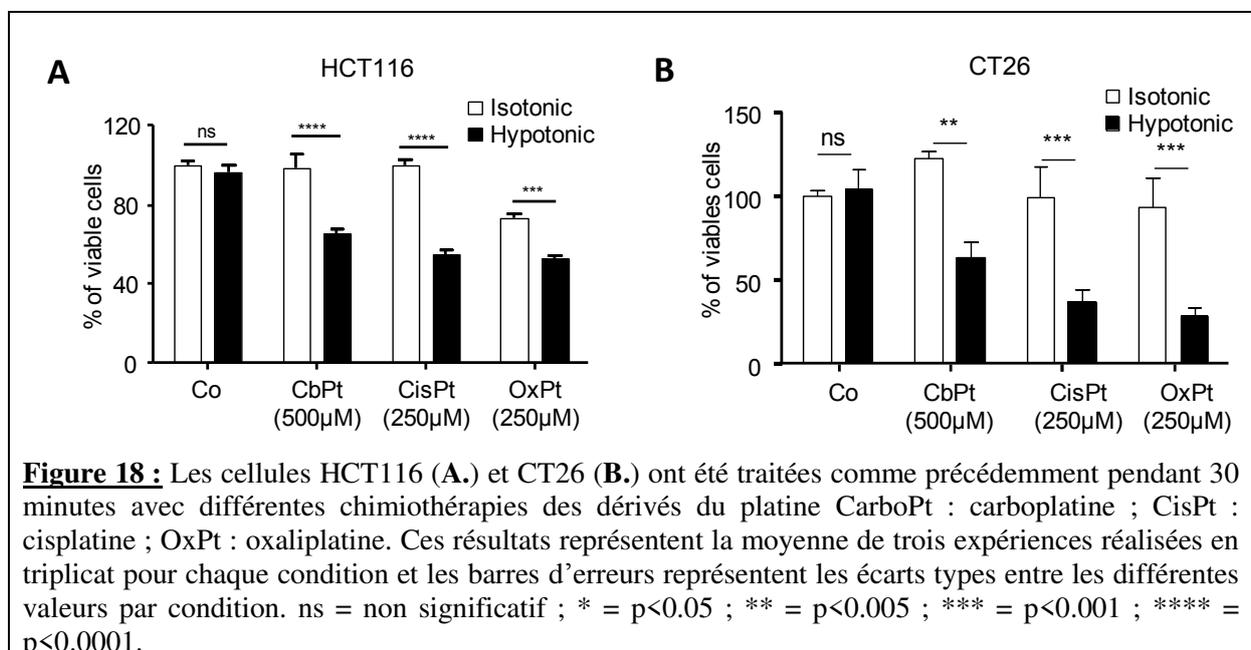
Nous avons donc choisi de travailler avec une concentration de 400 μ M d'oxaliplatine et un temps d'exposition de 30 minutes en hypotonie. Ces paramètres, étant les conditions utilisées actuellement au sein de l'équipe de chirurgie digestive du CHU de Dijon lors de la réalisation de CIP, ont une pertinence clinique.



Les effets synergiques de l'hypotonie et de l'oxaliplatine sont également retrouvés sur différentes lignées cellulaires cancéreuses coliques humaines aux statuts mutationnels différents tels que SW480 (MSS), HCT8 (MSI) ou HT29 (MSS) (figure 17).

De plus, nous pouvons noter que les effets de la combinaison oxaliplatine et hypotonie sont des effets qui durent dans le temps, l'hypotonie augmente durablement les effets de l'oxaliplatine sur la viabilité des cellules tumorales coliques même après 96h ou 15jours de traitement (figure 16 et 17).

Dans le but de savoir si les effets de l'hypotonie étaient limités à l'oxaliplatine nous avons testés deux autres membres de la famille des dérivés du platine : le cisplatine et le carboplatine.



Nous pouvons observer que les trois dérivés du platine (Carboplatine, Cisplatine et Oxaliplatine) voient leurs effets optimisés par le milieu hypotonique (figure 18A et 18B) dans deux lignées tumorales coliques différentes (HCT116 ; humaine et CT26 ; murine).

Ces résultats mettent en évidence que l'hypotonie augmente la capacité des dérivés du platine à diminuer la viabilité cellulaire.

L'hypotonie améliore l'incorporation cellulaire de l'oxaliplatine par l'intermédiaire de CTR1.

Dans un premier temps, nous avons vérifié si les effets de l'hypotonie sur la cytotoxicité de l'oxaliplatine étaient liés avec une augmentation de l'accumulation de platine au sein des cellules HCT116.

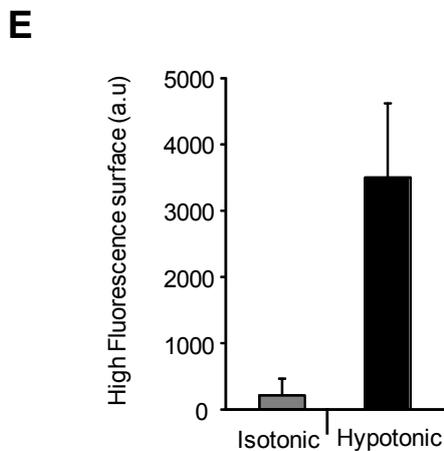
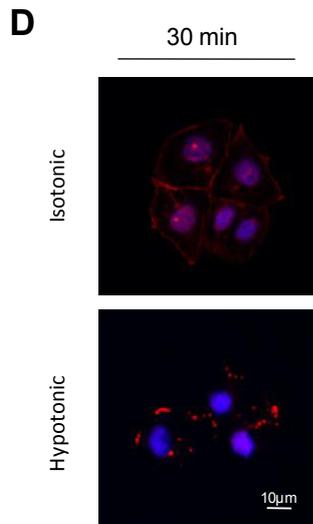
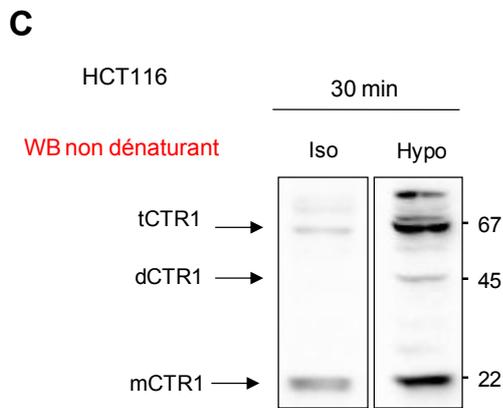
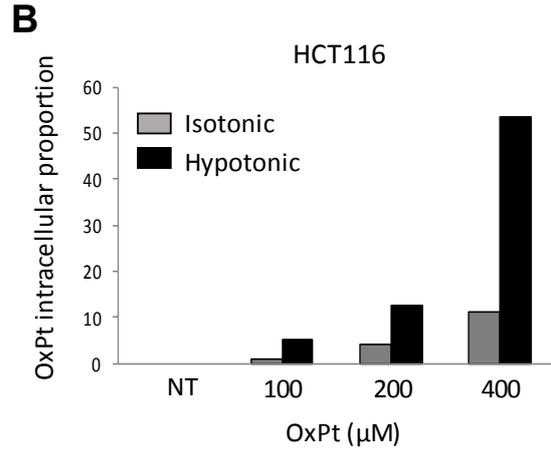
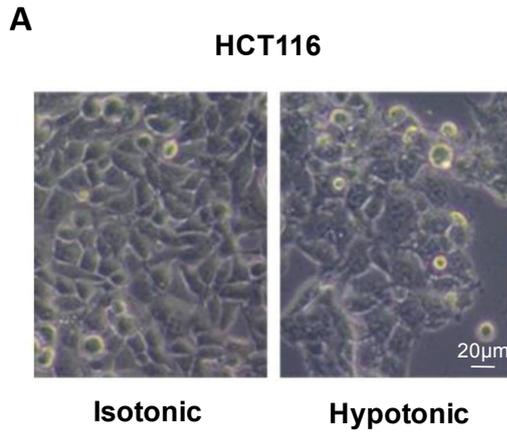
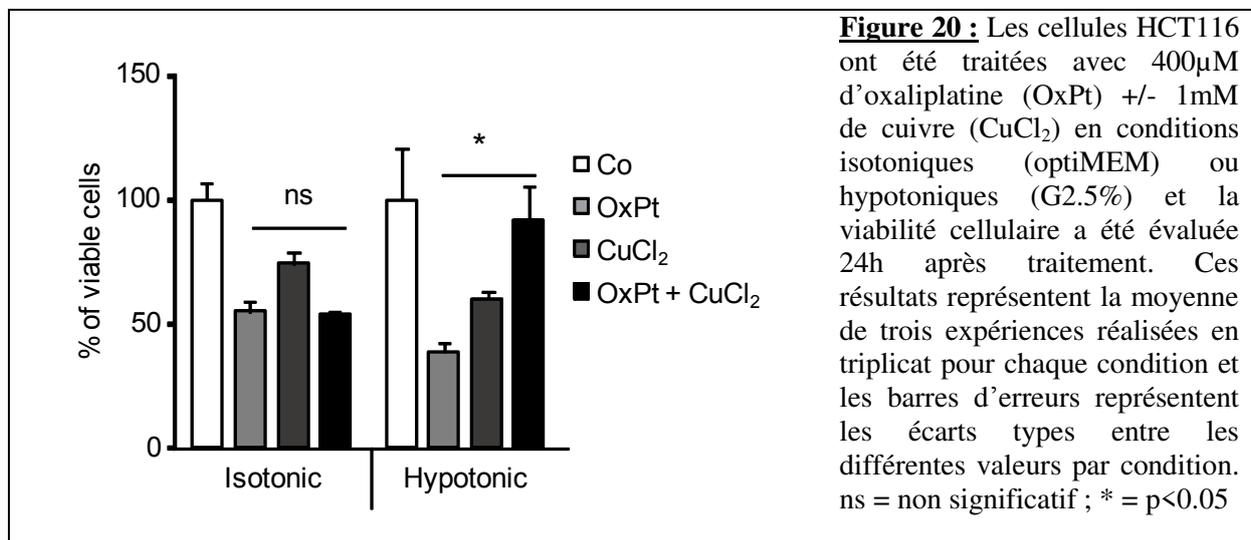


Figure 19: **A.** Morphologie cellulaire des cellules HCT116 observée par microscopie après exposition de 30 minutes à une solution hypotonique de G2.5%. Une expérience représentative de trois expériences. **B.** les cellules HCT116 ont été traitées pendant 30 minutes en conditions isotonique ou hypotonique avec les concentrations indiquées d'OxPt. Tout de suite après traitement, les cellules ont été recueillies et le contenu intracellulaire en platine a été déterminé par spectrométrie d'absorption atomique. Est représentée ici une expérience représentative de deux expériences. **C.** Détermination de l'oligomérisation de CTR1 par WB non dénaturant dans les cellules HCT116 post-exposition à 30 minutes de milieu isotonique (optiMEM) ou hypotonique (G2.5%). L'expérience a été réalisée trois fois. **D.** Visualisation de l'oligomérisation de CTR1 par immunofluorescence en conditions isotonique (optiMEM) ou hypotonique (G2.5%). L'expérience a été réalisée deux fois. **E.** Quantification de l'intensité de fluorescence (en U.A) des images d'immunofluorescence du panel D.

De manière attendue, l'hypotonie permet l'augmentation du volume des cellules HCT116 (figure 19A). Comme nous pouvons le voir dans la figure 19B, l'hypotonie augmente la proportion intra-cellulaire du platine après un traitement par l'oxaliplatine comparé aux traitements en isotonie. De plus, nous avons mis en évidence par western-blotting non dénaturant et immuno-fluorescence que cette accumulation du platine est corrélée avec une augmentation de l'oligomérisation de CTR1 (figures 19C et 19D), le transporteur membranaire du cuivre, responsable de l'accumulation du platine au sein de la cellule (Sun, Cai et al. 2017).

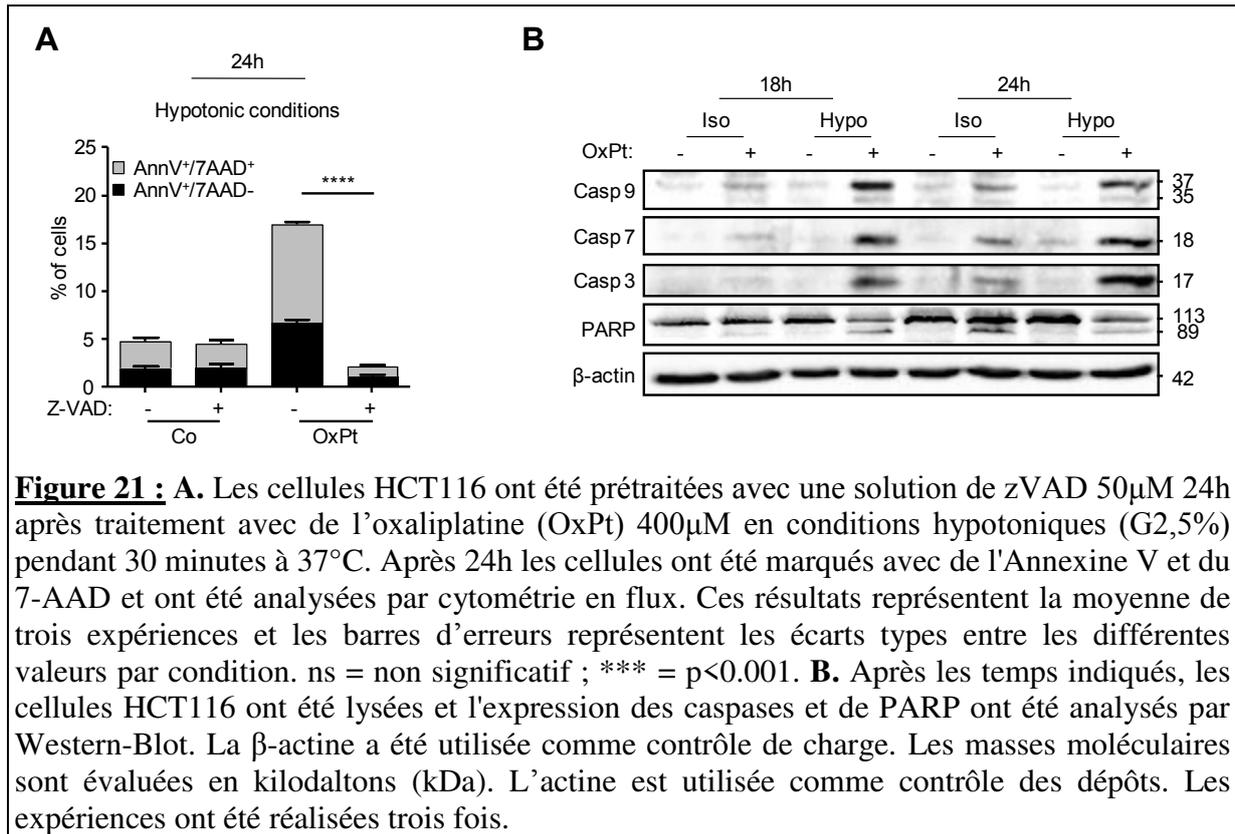
Afin de confirmer l'implication de CTR1 dans notre modèle, nous avons réalisé des expériences de compétition pour le transporteur avec l'utilisation du sulfate de cuivre, cible privilégiée de CTR1.



Nous voyons qu'en présence du compétiteur (CuCl₂), l'oxaliplatine perd ses effets cytotoxiques sur les cellules de carcinome colorectal lors du traitement en hypotonie (90% de cellules viables). Le cuivre n'influe aucunement la toxicité du platine lors du traitement en isotonie (figure 20). Ceci renforce l'importance de l'incorporation du platine (probablement par CTR1) dans les effets de l'hypotonie.

L'hypotonie augmente la mort par apoptose médiée par l'oxaliplatine.

Nous avons par la suite réalisé des expériences de mesure de la mort cellulaire par cytométrie en flux et western-blotting afin de définir le type de mort induite par l'association d'oxaliplatine avec l'hypotonie après modélisation de la CIP. Pour cela, nous avons réalisé un marquage des cellules HCT116 avec l'Annexine V et le 7AAD et nous avons utilisé un inhibiteur des caspases (zVAD.fmk).

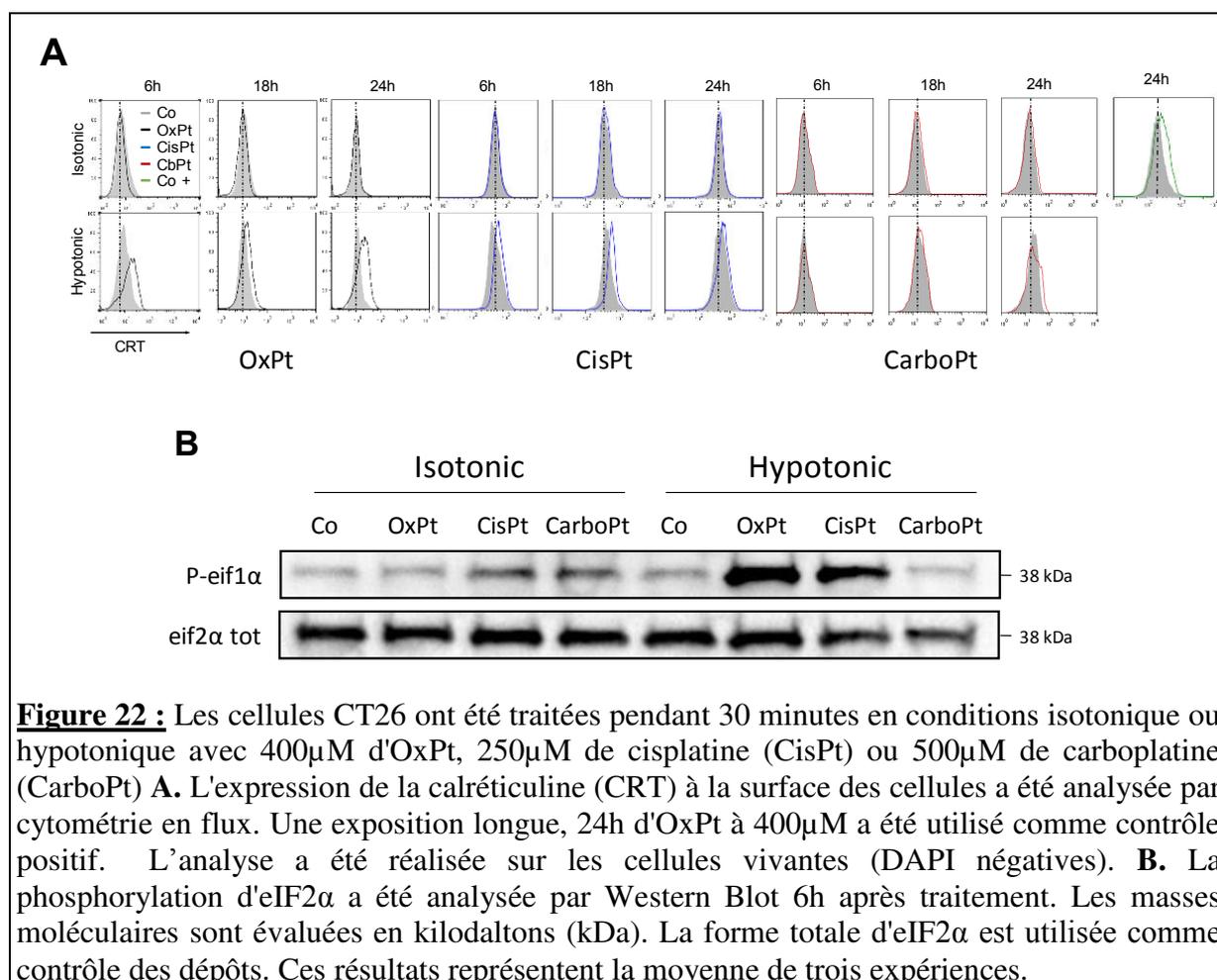


Nous pouvons voir une augmentation du pourcentage de cellules marquées positivement avec l'Annexine V (apoptose) seul et doublement marquées avec l'Annexine V et le 7AAD (nécrose) (figure 21A). Le pourcentage de cellules mortes par apoptose ou nécrose diminue drastiquement en présence de l'inhibiteur des caspases, z-VAD.fmk (figure 21A). Nous avons confirmé l'implication des caspases dans la mort cellulaire induite lors de la CIP par western blot, où nous observons une faible activation des caspases 3, 7 et 9, lors du traitement par l'oxaliplatine en isotonie (figure 21B). Nous pouvons voir une augmentation de cette activation des caspases, 18 heures et 24 heures après le traitement par l'oxaliplatine en conditions hypotoniques (figure 21B).

La mort cellulaire induite par l'oxaliplatine en conditions hypotoniques est donc dépendante des caspases et est très probablement de type apoptotique.

L'hypotonie induit l'exposition de la calréticuline lors d'un traitement par l'oxaliplatine et le cisplatine.

Nous avons envisagé l'hypothèse que nos traitements en hypotonie pouvaient déclencher ou augmenter la mort immunogène (*Immunogenic Cell Death* : ICD) dépendante des platines. Pour examiner cette possibilité, nous avons étudié l'apparition des caractéristiques spécifiques de l'ICD dans les cellules murines CT26, à savoir la translocation de la calréticuline du réticulum à la membrane plasmique, ainsi que le relargage d'ATP et d'HMGB1.



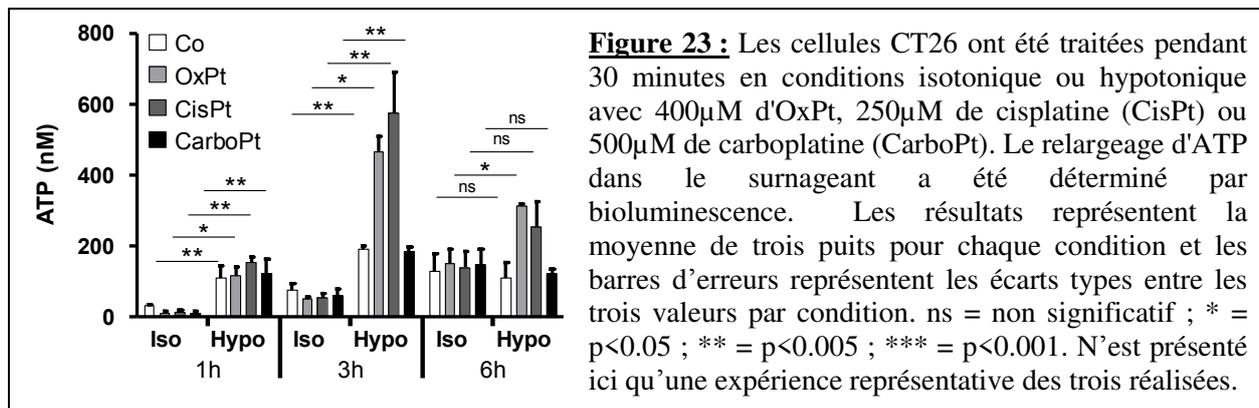
Nous avons d'abord montré que les platines dans les conditions isotoniques étaient inefficaces pour induire une exposition de la calréticuline à la surface cellulaire (figure 22A). Au contraire le cisplatine, et de manière encore plus importante l'oxaliplatine sont capables d'induire une exposition de la calréticuline dans des conditions hypotoniques, contrairement au carboplatine.

L'un des principaux mécanismes responsables de l'exposition de la calréticuline est la phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction eucaryote

(eIF2 α) (Galluzzi, Vitale et al. 2018). Nous pouvons voir qu'une exposition courte des cellules aux sels de platines en conditions isotoniques ne permet pas de déclencher la phosphorylation d'eIF2 α , contrairement aux traitements par l'oxaliplatine et le cisplatine en hypotonie qui eux en sont capables (figure 22B). Aucun effet du carboplatine en conditions hypotoniques n'est observé sur la phosphorylation d'eIF2 α , ce qui est cohérent avec les marquages de la calréticuline.

L'hypotonie induit le relargage d'ATP lors d'un traitement par l'oxaliplatine et le cisplatine.

Une autre caractéristique de la mort immunogène est le relargage d'ATP par les cellules mourantes.



Nous pouvons voir que la quantité d'ATP dans le milieu de culture des cellules CT26 1h, 3h et 6h après traitement avec les dérivés du platine en conditions isotoniques n'augmente pas. Le milieu hypotonique seul est capable d'induire une sortie d'ATP dans le surnageant des cellules, tout comme l'utilisation des platines en hypotonie. On notera que l'oxaliplatine et le cisplatine (mais pas le carboplatine) en hypotonie montrent un taux plus élevé d'ATP extracellulaire comparativement à l'hypotonie seule (figure23).

L'hypotonie induit le relargage d'HMGB1.

La mort immunogène est également associée avec la translocation d'HMGB1 du noyau au cytoplasme et enfin à son relargage en dehors de la cellule.

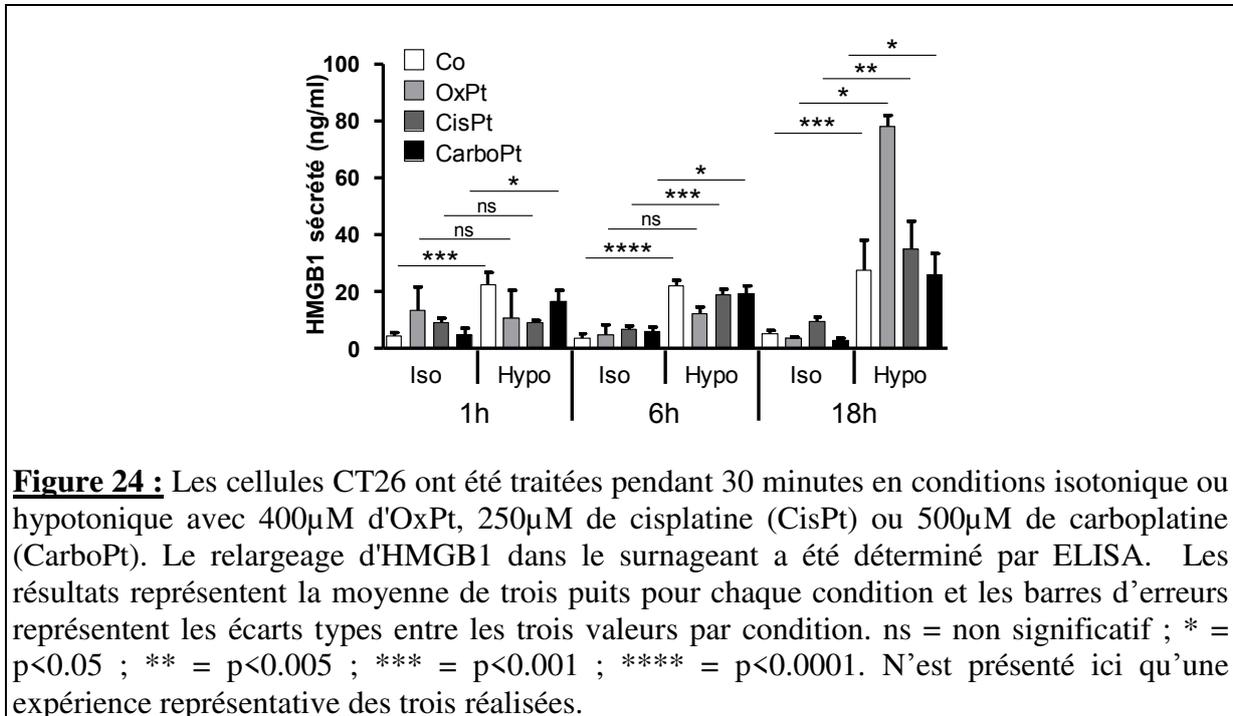


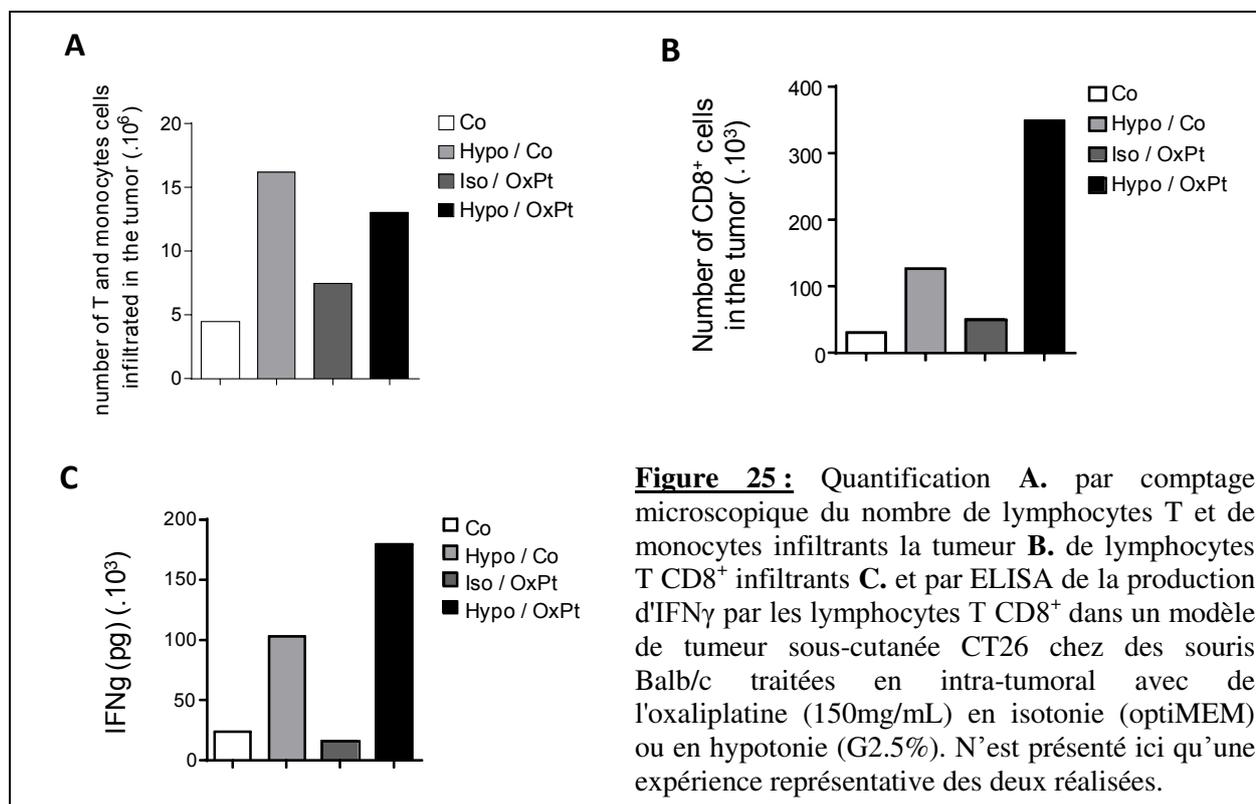
Figure 24 : Les cellules CT26 ont été traitées pendant 30 minutes en conditions isotonique ou hypotonique avec 400 μ M d'OxPt, 250 μ M de cisplatine (CisPt) ou 500 μ M de carboplatine (CarboPt). Le relargage d'HMGB1 dans le surnageant a été déterminé par ELISA. Les résultats représentent la moyenne de trois puits pour chaque condition et les barres d'erreurs représentent les écarts types entre les trois valeurs par condition. ns = non significatif ; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$. N'est présenté ici qu'une expérience représentative des trois réalisées.

Nous avons observé que la condition hypotonique seule était suffisante pour induire la libération de HMGB1 par les cellules CT26, alors qu'un traitement en isotonie de 30 minutes avec des dérivés du platine ne l'était pas. Cependant, lorsque les dérivés du platine ont été utilisés dans des conditions hypotoniques, nous n'avons observé aucune augmentation supplémentaire de la quantité d'HMGB1 dans le surnageant cellulaire, excepté pour l'oxaliplatine (figure 24).

Trois marqueurs de la mort cellulaire immunogène sont présents lors de la modélisation *in vitro* de la CIP en hypotonie avec l'oxaliplatine et le cisplatine: une externalisation de la calréticuline, un relargage d'ATP et une libération d'HMGB1. Nous pouvons donc envisager l'activation de la mort immunogène et l'implication du système immunitaire dans ce modèle. Contrairement au traitement par le carboplatine en hypotonie qui échoue à entraîner l'exposition de la calréticuline et donc ne peut pas entraîner la mort immunogène des cellules cancéreuses.

Le traitement par l'oxaliplatine en hypotonie entraine le recrutement et l'activation des lymphocytes T CD8 au sein de la tumeur

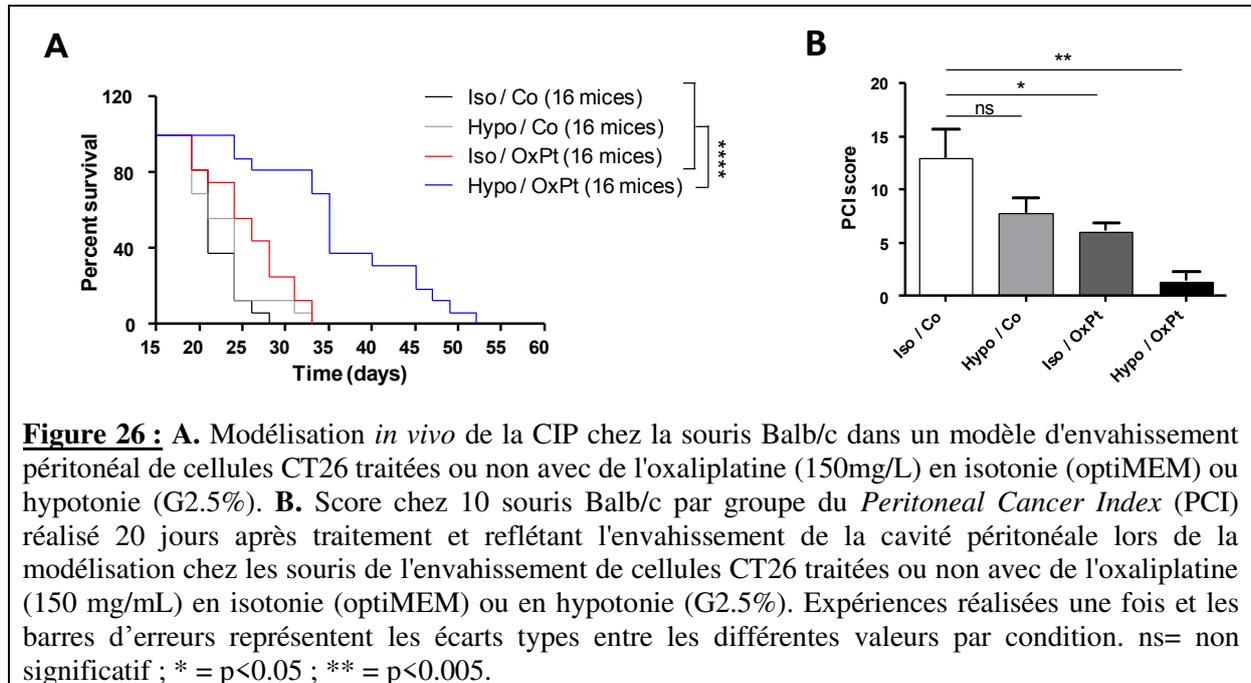
Nous avons voulu déterminer les effets de l'oxaliplatine en hypotonie sur le système immunitaire dans le cadre d'un traitement intra-tumoral d'une tumeur sous-cutanée établie chez la souris.



Nous avons mis en évidence dans ce modèle de tumeur sous-cutanée une augmentation du recrutement au site de la tumeur de lymphocytes T et de monocytes lors du traitement en hypotonie avec ou sans l'oxaliplatine comparé au traitement avec l'oxaliplatine en isotonie. Les lymphocytes de types CD8⁺ recrutés sont plus nombreux dans le groupe hypotonie + oxaliplatine ce qui est corrélé à une sécrétion plus importante d'IFN γ (figure 25). Nous pouvons voir également que l'hypotonie seule entraine un recrutement de cellules immunitaires au site de la tumeur, mais la production d'IFN γ par ces lymphocytes T (moins nombreux) est moins importante. Ces expériences, qui devront être répétées, tendent à montrer un réel effet du traitement en hypotonie sur l'activation du système immunitaire et sa potentielle efficacité sur le site tumoral.

Le traitement par l'oxaliplatine en hypotonie entraine un ralentissement du développement tumoral dans un modèle murin de carcinose péritonéale *in vivo*

Nous avons finalement modélisé la CIP *in vivo* avec un envahissement péritonéal de cellules murines de cancer coliques CT26 chez la souris Balb/c traitées avec un bain de 2ml d'oxaliplatine dans les différentes conditions d'intérêts.



Les souris traitées par des solutions isotoniques ou hypotoniques meurent rapidement avec des médianes de survie à 21 et 24 jours respectivement. Le traitement avec l'oxaliplatine en isotonie entraine seulement un léger décalage de la mort des souris avec une médiane de survie à 26 jours, tandis que le traitement de chimiothérapie en hypotonie augmente la survie des animaux avec une médiane de survie à 35 jours (figure 26A). L'envahissement de la cavité péritonéale chez ces souris est très nettement moins important que chez les souris traitées en isotonie (figure 26B). Ce ralentissement de la croissance des nodules entraine une augmentation de la survie des souris de 17 jours, cependant aucune rémission complète n'a pu être observée.

L'hypotonie augmente la mort cellulaire médiée par les chimiothérapies entraînant des dommages à l'ADN.

Dans le but de savoir si les effets de l'hypotonie étaient limités à la seule famille des dérivés du platine nous avons testé un panel de chimiothérapies contenant des molécules aux modes d'actions variés.

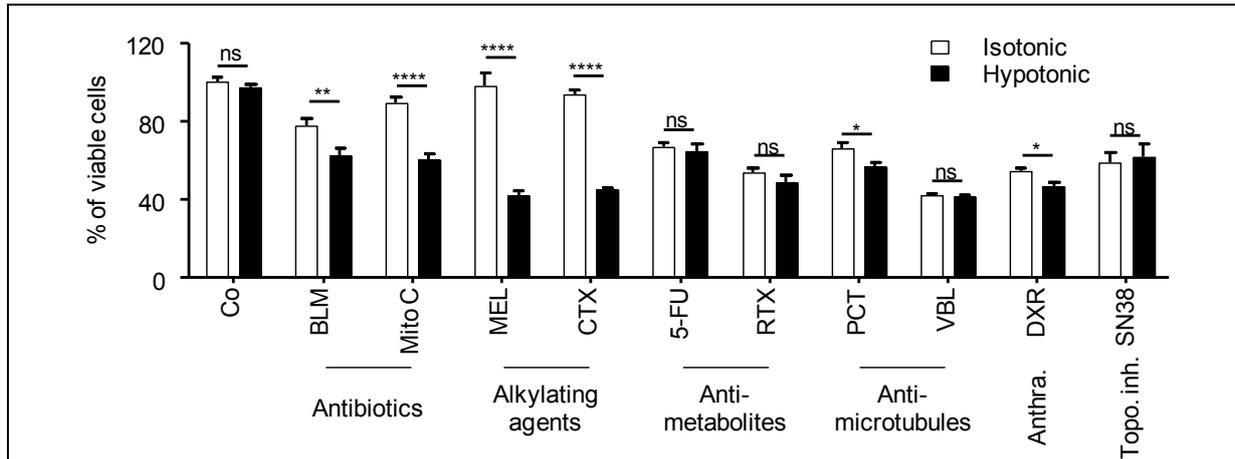


Figure 27 : Les cellules HCT116 ont été traitées avec des agents induisant des dommages de l'ADN (des antibiotiques : BLM : Bléomycine ; Mito C : Mitomycine c ; des agents alkylants : Mel : Melphalan ; CTX : Cyclophosphamide) ou des antimétabolites (5-FU : 5-Fluorouracile ; RTX : Raltitrexed), des inhibiteurs de microtubules (PCT : Paclitaxel ; VBL : Vinblastine) ou de topoisomérases I et II (DXR : Doxorubicine ; SN38 : composé actif de l'irinotecan) puis la viabilité cellulaire a été testée à 24h. Ces résultats représentent la moyenne de trois expériences et les barres d'erreurs représentent les écarts types entre les trois valeurs par condition. ns = non significatif ; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

Nous pouvons observer que seules certaines molécules de chimiothérapies voient leurs effets optimisés par le milieu hypotonique. Ainsi, les agents alkylants (Mitomycine c, Melphalan et Cyclophosphamide) et les agents induisant des dommages de l'ADN (Bléomycine) ont leur cytotoxicité fortement augmentée avec l'hypotonie (figure 27).

Au contraire, d'autres familles de chimiothérapies telles que les anti-métabolites (5-Fluorouracile, Raltitrexed), les inhibiteurs de microtubules (Paclitaxel, Vinblastine) et les inhibiteurs des ADN topoisomérases I et II (Doxorubicine et SN38) ne voient pas ou peu leurs effets augmentés en conditions hypotoniques (figure 27). On note une différence statistiquement significative pour les effets du Paclitaxel et de la Doxorubicine en hypotonie ; cependant une perte de 5 à 10% de la viabilité cellulaire ne permet pas de conclure à une réelle amélioration du traitement, contrairement aux agents alkylants pour lesquels on observe une augmentation de 30 à 50% de la cytotoxicité en hypotonie par rapport à l'isotonie.

Ces résultats mettent en évidence que l'hypotonie augmente la capacité des chimiothérapies entraînant des dommages à l'ADN à diminuer la viabilité cellulaire. Ainsi l'hypotonie a des effets synergiques avec non seulement les dérivés du platine mais également avec d'autres chimiothérapies entraînant des dommages à l'ADN.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ces résultats de modélisation *in vitro* de la chimiothérapie intrapéritonéale (CIP), nous permettent de montrer que l'oxaliplatine a des effets cytotoxiques sur les cellules tumorales colorectales humaines et murines qui sont augmentés lorsque celle-ci est effectuée en milieu hypotonique. En effet, nous avons mis en évidence que l'hypotonie a des effets synergiques forts avec l'oxaliplatine, contrairement à l'hyperthermie utilisée plus couramment en clinique.

En revanche, nous avons observé *in vitro*, une forte toxicité de la combinaison hypotonie/hyperthermie, avec ou sans oxaliplatine (données non montrées). Ceci est en accord avec une étude clinique portant sur des patients atteints de cancer colorectaux traités, après résection de la tumeur primaire, par une CHIP en hypotonie et hyperthermie et qui ont présenté d'importantes complications post-opératoires (hémorragies péritonéales et thrombopénies) entraînant la mort (Elias, 2002). Ainsi, même si une association hypotonie/hyperthermie présente des effets cytotoxiques plus importants, les conséquences observées pour les patients nous confortent dans l'idée d'utiliser l'hypotonie seule comme moyen de potentialiser les effets de l'oxaliplatine.

La combinaison hypotonie et oxaliplatine offrant une toxicité plus importante que l'oxaliplatine en isotonie, les paramètres optimaux de temps d'exposition et de concentrations en chimiothérapies ont dû être vérifiés pour être éventuellement réduits. Sur le court terme (24 heures après traitement) une réduction du temps d'exposition (15 minutes au lieu de 30) avec la concentration de 400 μ M d'oxaliplatine semblait être envisageable. Mais après vérification sur un plus long terme (15 jours après traitement) et observation de quelques cellules vivantes, le choix du temps d'exposition de 30 minutes avec la dose de 400 μ M (pour lequel nous n'observons plus de cellules) a été fait pour la suite de la modélisation *in vitro*. En effet, même s'il n'y a qu'un petit nombre de cellules cancéreuses restantes après traitement, cela est suffisant pour une éventuelle récurrence. Ce choix reste cliniquement pertinent car une exposition de 30 minutes à 400 μ M d'oxaliplatine est actuellement utilisée en clinique. Le

bénéfice serait un temps de chirurgie réduit, car la mise en place des dispositifs pour réaliser la CHIP en hyperthermie est très longue (plusieurs heures). La réalisation de la CIP en hypotonie serait beaucoup plus simple à mettre en place, avec des bénéfices sur la récupération postopératoire du patient.

Nous avons voulu savoir si l'augmentation de l'efficacité de l'oxaliplatine en conditions hypotoniques pouvait être étendue à d'autres composés de chimiothérapies. Ainsi, nous avons révélés par tests de viabilités cellulaires, que seule la famille des chimiothérapies causant des dommages de l'ADN voit ses effets améliorés avec l'hypotonie, comme les dérivés du platine, les alkylants et un antibiotique (Bléomycine). Les mécanismes pouvant expliquer cette cytotoxicité augmentée en hypotonie pour plusieurs chimiothérapies peuvent être multiples. En effet comme nous l'avons montré, lorsque les cellules sont placées en milieu hypotonique, elles deviennent turgescentes, la fluidité membranaire en est modifiée (Los 2004). Une meilleure incorporation des chimiothérapies médiée par des transporteurs spécifiques peut être impliquée. Dans ce cas, les modifications de la fluidité membranaire pourraient favoriser la fonctionnalisation de transporteurs (par exemple en rapprochant les rafts lipidiques contenant les sous-unités du transporteur), comme pour le transport de l'oxaliplatine qui est amélioré par l'activation des canaux transporteurs du cuivre CTR1 en conditions hypotoniques. L'incorporation par diffusion passive peut également être facilitée augmentant la quantité intracellulaire de chimiothérapie et expliquant les effets cytotoxiques plus importants. La modification de la fluidité membranaire peut également entraîner l'activation de voies de mort, comme par exemple l'oligomérisation des récepteurs à domaines de mort dans les rafts lipidiques (Segui and Legembre, 2010) ce qui expliquerait l'augmentation de la cytotoxicité.

La Bléomycine étant une molécule de grosse taille (1 415,552 g/mol), l'hypothèse du passage passif facilité à travers la membrane n'est peut-être pas la plus plausible afin d'expliquer les phénomènes observés. Des tests avec des sondes fluorescentes de différentes tailles (allant jusqu'à la taille de la Bléomycine) en hypotonie peuvent être envisagés pour savoir si toutes les tailles de molécules peuvent rentrer au cours d'un choc hypotonique. Cette hypothèse pourra être également approfondie en évaluant la pénétration de la Doxorubicine (une molécule fluorescente dont les effets cytotoxiques ne sont pas potentialisés par l'hypotonie) au sein de la cellule. Si l'incorporation de celle-ci est augmentée en hypotonie, cela signifierait que nous sommes en présence d'un mécanisme comprenant deux signaux différents : un premier qui permet à toutes les molécules de rentrer massivement dans la cellule et un second qui augmente leurs effets intracellulaires. Toutes les molécules ayant leurs effets augmentés avec l'hypotonie sont des molécules créant des pontages bifonctionnels et des cassures de l'ADN, ainsi l'hypotonie pourrait avoir un effet direct sur les dommages de l'ADN. Des expériences d'irradiations des cellules (rayons gammas) en conditions isotoniques ou hypotoniques permettraient de déterminer si l'hypotonie agit sur les cassures de l'ADN. Ainsi, si l'hypotonie augmente les effets des radiations cela signifierait que son action ne passe pas par une meilleure incorporation des chimiothérapies mais plutôt par un effet direct sur les dommages de l'ADN.

La mort cellulaire induite lors de la CIP en hypotonie est de type apoptotique et nécrotique secondaire. La mort cellulaire est fortement réduite en présence de l'inhibiteur des caspases, le zVAD. L'augmentation du pourcentage de cellules doublement positives après marquage avec l'Annexine V et le 7AAD peut signifier une mort des cellules par nécrose vraie mais dépendante des caspases (car le zVAD diminue également le taux de cellules doublement positives) ou peut être expliqué par le passage des cellules de l'apoptose vers une nécrose secondaire (ou tardive).

La mort cellulaire lors de la CIP en hypotonie serait donc dépendante des caspases. Ces résultats ont été confirmés par Western Blot, où nous avons pu mettre en évidence que les caspases 3, 7 et 9 étaient plus activées et que la protéine PARP était plus clivée avec l'oxaliplatine en conditions hypotoniques.

Les effets cytotoxiques des molécules de chimiothérapies envers les cellules tumorales ne suffisent pas pour obtenir une bonne réponse anti-tumorale chez les patients. En effet, outre les mécanismes de résistances, l'implication du système immunitaire, avec des effets pro ou antitumoraux, est une question majeure en cancérologie. La capacité de la mort cellulaire, induite lors de la CIP en hypotonie, à activer et renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale a été mise en évidence dans ce travail avec la caractérisation de trois marqueurs de la mort cellulaire immunogène (*Immunogenic Cell Death* : ICD) : l'expression de la calréticuline au niveau de la membrane plasmique, le relargage de l'ATP et d'HMGB1 dans le milieu extracellulaire (Ladoire et al., 2014). L'importance de cette mort immunogène a pu être mise en évidence dans plusieurs études montrant que les patients ayant des mutations sur les gènes codant pour les récepteurs des stigmates de la mort immunogène, tels que TLR4 (un des récepteurs d'HMGB1) ou P2X7 (le récepteur de l'ATP) ont des réponses aux traitements modifiées et ont un mauvais pronostic de survie (Rebe and Ghiringhelli 2015).

Dans ce travail, nous avons mis en évidence *in vitro* l'incapacité de l'oxaliplatine à induire l'ICD en isotonie, contrairement à ce qui a été observé dans des travaux antérieurs de l'équipe de Guido Kroemer, qui ont montré que l'oxaliplatine était capable d'induire l'exposition de la calréticuline, et le relargage d'ATP et d'HMGB1 par les cellules cancéreuses. Ceci est explicable par le fait que nous avons décidé de réaliser ces expériences avec une courte exposition des cellules cancéreuses à la chimiothérapie de manière à se rapprocher du milieu clinique et plus particulièrement de la CIP. Le cisplatine a été montré comme étant capable de relarguer l'ATP, mais pas d'exposer la calréticuline, tandis qu'HMGB1 peut ou non être

relargué dépendamment de la lignée cellulaire et/ou des concentrations utilisées (Aranda, Bloy et al. 2015, Martins, Kepp et al. 2011, Martins, Wang et al. 2014, Tesniere, Schlemmer et al. 2010).

Le carboplatine quant à lui a été très peu étudié dans le contexte de la mort immunogène, et seule une étude à notre connaissance a démontré que le carboplatine seul n'avait aucun effet sur le relargage de l'ATP ou d'HMGB1 ou sur l'exposition de la calréticuline, la combinaison avec des radiations ionisantes étant nécessaire pour entraîner l'ICD (Golden, Frances et al. 2014).

Quoi qu'il en soit, nous montrons que même avec une exposition courte, l'oxaliplatine et le cisplatine en conditions hypotoniques sont capables d'induire les stigmates de la mort immunogène dans les cellules tumorales coliques.

L'exposition de la calréticuline est médiée par le stress du réticulum et la phosphorylation d'eIF2 α , que nous avons pu mettre en évidence ici lors du traitement en hypotonie. Afin de détailler la voie de phosphorylation d'eIF2 α dans cette modélisation *in vitro* de la CIP, des expériences de shRNA visant les quatre kinases pouvant être impliquées dans cette phosphorylation ont été menées, à savoir PERK, HRI, GCN2 et PKR (Taniuchi, Miyake et al. 2016). Des cellules CT26 ont été transfectées avec des shRNA visant respectivement l'une de ces 4 cibles. Après sélection par la puromycine des clones transfectés et vérification par PCR de l'extinction de l'expression des ARNm d'intérêt, la phosphorylation de la protéine cible eIF2 α et le marquage de la calréticuline ont été vérifiés. Ces expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence la kinase impliquée dans notre modèle, il semblerait qu'un système de compensation de l'activité de la kinase éteinte par les trois autres encore actives soit mis en place. Afin de pouvoir éclaircir cette voie de signalisation, des transfections visant 2 ou 3 kinases à la fois vont devoir être menées. Cependant, il reste un doute quant à la mise au point de telles transfections. En effet les cellules dépourvues de telles kinases impliquées

dans la gestion du stress du réticulum (notamment PERK) sont très fragiles, l'extinction de plusieurs de ces protéines pourraient réduire fortement la survie de ces cellules et compromettre la réalisation des expériences.

L'efficacité et la pertinence thérapeutique du traitement en hypotonie a pu être démontrée *in vivo* chez des souris immunocompétentes Balb/c dans un modèle murin de carcinose péritonéale d'origine colique, où nous avons mis en évidence un ralentissement de la croissance des nodules tumoraux chez les souris traitées par la chimiothérapie en hypotonie. Ces souris seront rechallengées avec une injection en sous-cutanée de cellules CT26. La croissance tumorale sera évaluée et permettra de mettre en évidence si le traitement en hypotonie permet de créer une mémoire immunitaire.

L'étude du recrutement de cellules immunitaires au sein de tumeurs sous-cutanées CT26 chez la souris Balb/c traitées par chimiothérapie en hypotonie a permis de mettre en évidence un infiltrat de lymphocytes T CD8⁺ sécrétant de l'IFN γ . Ceci nous confortant dans l'idée d'une implication du système immunitaire dans l'efficacité du traitement. Les effets du système immunitaire, et plus particulièrement de son activation par la mort immunogène, devront être prouvés *in vivo*. Dans un premier temps, des expériences de vaccinations pourront être réalisées. Des cellules CT26 préalablement traitées *in vitro* avec de l'oxaliplatine en conditions hypotoniques seront injectées en sous-cutané dans des souris. Une semaine plus tard, une injection de cellules CT26 non traitées sera réalisée chez ces mêmes souris (dans le flanc opposé). Si la mort cellulaire induite par l'oxaliplatine en hypotonie est de type immunogène, les souris seront vaccinées par les antigènes tumoraux issus de la première injection et les cellules injectées la deuxième fois devraient être reconnues et éliminées par le système immunitaire de la souris. Dans un second temps, des expériences de modélisation de CIP *in vivo* soit sur des souris Nude immunodéficientes soit sur des souris Balb/c

préalablement déplétées en lymphocytes T CD8 et/ou CD4 seront également menées pour évaluer un rôle synergique éventuel du système immunitaire.

Cependant il faut noter que la pertinence de la mort immunogène n'a été que rarement prouvée chez les patients (Montico, Nigro et al. 2018). Ceci peut être expliqué par l'incapacité des chimiothérapies à entraîner l'ICD ou par leur incapacité à atteindre les doses et/ou temps d'exposition nécessaires au sein des tumeurs des patients.

Comme nous venons de le montrer, l'hypotonie entraîne les stigmates de la mort immunogène lorsqu'elle est combinée avec l'oxaliplatine ou encore avec le cisplatine utilisés pendant un temps très court, 30 minutes. L'étude de l'activation de la mort immunogène en hypotonie sera réalisée avec d'autres molécules de chimiothérapie afin de savoir si l'hypotonie peut déclencher ou amplifier la capacité de ces chimiothérapies à provoquer l'ICD et si l'utilisation du glucose 2.5% comme soluté pour reprendre les molécules de chimiothérapie pourrait être étendue. Nos observations sur l'augmentation de l'efficacité de l'oxaliplatine en conditions hypotoniques sur les cellules tumorales coliques humaines (avec statuts MSS et MSI différents : cf matériel et méthodes) et murines tendent à nous conforter dans une utilisation généralisable de l'hypotonie pour les patients, sans avoir à réaliser un génotypage de la tumeur.

L'étendu métastatique du cancer ovarien dans la cavité péritonéale étant une autre indication de la CIP, il serait intéressant d'étendre ces expériences aux lignées cancéreuses d'origine ovarienne.

Concernant la réponse immunitaire, chez les patients cancéreux, le cycle d'immunité contre le cancer (qui a été présenté dans la partie introductive à la mort cellulaire immunogène de ce manuscrit) ne fonctionne pas de manière optimale. Les antigènes tumoraux peuvent ne pas être détectés, les cellules dendritiques et les lymphocytes T peuvent traiter ces antigènes

comme des auto-antigènes plutôt que comme des étrangers, créant ainsi des réponses régulatrices des lymphocytes T plutôt que des réponses effectrices. Les lymphocytes T risquent de ne pas loger correctement dans les tumeurs ou l'infiltration peut être inhibée ou des facteurs du microenvironnement tumoral pourraient supprimer ces cellules effectrices produites. De plus, le cycle est également caractérisé par des facteurs inhibiteurs qui conduisent à des mécanismes de rétroaction de la régulation immunitaire, qui peuvent arrêter ou limiter le développement de la réaction immunitaire.

Pour que le cycle se poursuive, il faut outrepasser ces processus inhibiteurs, qui sont notamment l'activation des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires. L'immunothérapie anticancéreuse a pour objectif d'instaurer ou de relancer un cycle autonome d'immunité anticancéreuse, lui permettant de s'amplifier et de se propager (Chen 2013). L'utilisation du glucose lors du traitement par l'oxaliplatine permet de provoquer la mort immunogène. L'utilisation d'inhibiteurs de checkpoint inhibiteur (tels que des anti-PD1, anti-PDL1 et anti-CTLA4) pourraient dans notre cas renforcer différentes étapes du cycle de l'immunité (notamment le priming et l'activation des cellules dendritiques et la destruction des cellules cancéreuses par les lymphocytes T) et garantir une réponse immunitaire efficace.

Comme nous avons pu l'exposer dans l'introduction, la CHIP présente plusieurs limitations importantes, qui ont entraîné un questionnement quant au rationnel de son utilisation.

C'est pour cela qu'à été menée l'essai clinique ACCORD PRODIGE 7, qui consiste en la comparaison de la survie globale chez des patients porteurs d'une carcinose péritonéale d'origine colorectale, ayant fait l'objet d'une résection chirurgicale complète macroscopiquement ou suboptimale (laissant en place un tissu tumoral résiduel $\leq 1\text{mm}$) et bénéficiant, ou non, d'un traitement maximal avec chimiohyperthermie (utilisation d'un bain d'oxaliplatine chauffé à 42°C). Les résultats de cette large étude ont été dévoilés récemment, le mardi 5 juin 2018 lors du congrès de l'*American Society of Clinical Oncology* (ASCO).

L'étude PRODIGE7 a inclus 265 patients issus de 17 centres français (entre février 2008 et janvier 2014), qui avaient un cancer colorectal de stade IV avec des métastases uniquement sur le péritoine. Les patients randomisés ont été séparés en deux groupes : dans le 1er groupe les patients ont été opérés et ont reçu une CHIP ; ceux du second groupe ont été opérés de la même façon mais n'ont pas eu de CHIP. Presque tous les patients (96%) ont également reçu une chimiothérapie intraveineuse. Après 64 mois de suivi, les médianes de survie étaient de 41,7 mois pour les patients du groupe avec CHIP et de 41,2 mois pour les patients du groupe sans CHIP. La survie à cinq ans était de 39% dans le bras CHIP et de 36% dans le bras non CHIP. L'analyse des récurrences montre que l'ajout de la CHIP décale leur survenue d'environ un an, même si les résultats sur le long terme sont semblables. Le taux de mortalité post-opératoire a été de 1,5% sans différence entre les deux groupes et il n'y avait pas non plus de différence pour ce qui est des complications pendant les 30 premiers jours post-opératoires. En revanche, à 60 jours, le taux de complications était plus élevé pour les patients ayant eu une CHIP. Face à ses résultats, il a été convenu que la CHIP ne pouvait pas être considérée comme un standard de traitement et que la chirurgie seule devrait être envisagée systématiquement dans chaque centre expert en plus de la chimiothérapie systémique pour le traitement de la carcinose colorectale. Une analyse de sous-groupe de cette étude suggère que la CHIP augmente la survie des patients ayant un nombre de métastases sur le péritoine modéré, ainsi les patients ayant une carcinose faible ou avancée, à la différence de ceux ayant une carcinose modérée, ne seraient plus traités par CHIP et de nouveaux moyens thérapeutiques devront être mis en place.

Les limitations de la CHIP qui peuvent expliquer les résultats surprenant de cette étude sont les suivantes :

- la déperitonisation lors de la résection tumorale qui change l'objectif principal de la CHIP qui est d'offrir à la chimiothérapie une meilleure absorption transpéritonéale que

la voie systémique. Après chirurgie complète ce n'est plus du péritoine qui est en interface avec la chimiothérapie mais du muscle dénudé ou de l'aponévrose.

- La pénétration des chimiothérapies au sein des cellules est faible et limitée à 3mm soit moins de 20 couches cellulaires et le temps d'interaction de contact entre le produit cytotoxique et les cellules tumorales bref.

- Une faible cytotoxicité *in vitro* des chimiothérapies les plus utilisées en pratique, l'oxaliplatine et la mitomycine c. L'oxaliplatine est utilisé couramment pour le traitement du cancer colorectal mais toujours en association systémique avec le 5-FU et l'acide folinique. La pénétration péritonéale de la mitomycine c est inconnue et son ratio de concentration péritoine/plasma très élevé, exposant le patient à des pics de toxicité majeure telle l'insuffisance médullaire aiguë (Evrard 2018).

- L'homogénéisation et la diffusion de la température eu sein de la cavité abdominale n'est pas assurée. Ainsi, l'utilisation de l'hyperthermie comme agent potentialisateur de la chimiothérapie n'est pas le plus logique car l'hyperthermie reste un agent cytotoxique important pouvant entrainer de grave brûlures ou éventuellement le syndrome d'apéristaltisme post-CHIP probablement dû à une destruction des plexus nerveux splanchniques et/ou viscéraux.

Aux regards de cette étude, l'utilisation de l'hypotonie que nous proposons comme soluté pour reprendre la chimiothérapie reste une éventuelle solution aux limitations actuelles de la CHIP. En effet, la cytotoxicité *in vitro* de la chimiothérapie est augmentée lors de l'utilisation du glucose 2.5% et il n'y aurait plus de problème d'homogénéisation de l'agent potentialisateur, car ici le bain de chimiothérapie serait réalisé avec une solution homogène de G2.5% plus chimiothérapie. Il reste cependant des interrogations quant aux effets du G2.5% sur les tissus tels que les muscles et l'aponévrose qui sont découverts lors de la déperitonisation et sur la

pénétration au sein des tissus de la chimiothérapie en hypotonie. En présence de glucose 2.5% les cellules deviennent turgescentes, bien que cela permette une augmentation de l'incorporation de la chimiothérapie au sein de la cellule, l'augmentation du volume des cellules pourrait éventuellement restreindre la pénétration tissulaire en diminuant l'espace intercellulaire.

Il est évident qu'il reste un besoin de trouver de nouvelles thérapeutiques pour le traitement de la carcinose péritonéale. L'utilisation de l'hypotonie comme soluté pour chimiothérapie pourrait être étendu à plusieurs protocoles existant, notamment pour une utilisation lors du protocole de PIPAC, pour le traitement des cancers pleuraux et également lors de la reperfusion de foie isolé. La PIPAC qui signifie Chimiothérapie Intrapéritonéale Pressurisée par Aérosols est une technique innovante dans le traitement des carcinoses péritonéales d'origine colorectale, gastrique, ovarienne, ou provenant d'une maladie rare comme le pseudomyxome péritonéal ou le mésothéliome péritonéal. Lors de la PIPAC, la chimiothérapie est vaporisée sous forme d'aérosol dans la cavité abdominale lors d'une laparoscopie. Les aérosols sous pression, utilisant l'oxaliplatine, le cisplatine ou la doxorubicine, sont capables d'augmenter la concentration locale d'agents chimiothérapeutiques ainsi que leur pénétration tissulaire et peuvent diminuer les effets secondaires en maintenant une faible concentration sérique (Solass, Kerb et al. 2014). Cependant la PIPAC n'a jamais été comparé à un traitement de chimiothérapie intrapéritonéale liquide dans un contexte préclinique ou clinique.

L'utilisation de l'hypotonie comme soluté de chimiothérapie dans le protocole de PIPAC pourrait être intéressant. En effet, l'hypotonie pourrait augmenter la cytotoxicité de traitement (en pénétrant éventuellement plus profondément et plus facilement dans la tumeur) et pourrait moduler la réponse immunitaire (en entraînant l'ICD) et créer ainsi une pression antitumorale forte. Cela permettrait de traiter des patients qui à l'heure actuelle ne montrent aucune réponse

au traitement par PIPAC ou qui subissent une rechute précoce de la maladie après une régression tumorale initiale.

La perfusion sur foie isolé de la circulation est une méthode de délivrance de la chimiothérapie permettant d'augmenter fortement les doses en diminuant la toxicité extra-hépatique. Elle s'adresse à des patients porteurs de tumeurs hépatiques non résectables chirurgicalement. Les différentes chimiothérapies utilisées sont le melphalan, l'oxaliplatine, le cisplatine et la mitomycine c, à fortes doses, parfois associées à une hyperthermie modérée. La durée de perfusion oscille entre 30 et 90 minutes suivant les protocoles (Facy 2014). Les paramètres de réalisation de cette technique sont relativement proches de ceux utilisés en CHIP [exposition courte (30 à 90 minutes) à de fortes doses de chimiothérapie (oxaliplatine)]. Ainsi remplacer l'hyperthermie par l'utilisation du glucose permettrait éventuellement d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie.

La technique de chimiothérapie intracavitaire mise en place dans le traitement du cancer du péritoine pourrait bénéficier à la prise en charge de la carcinose pleurale. L'optimisation de la technique de CHIP par l'utilisation du glucose permettrait dans ce cas de carcinose pleurale, souvent plus agressive, d'augmenter les effets de la chimiothérapie et d'améliorer la survie des patients.

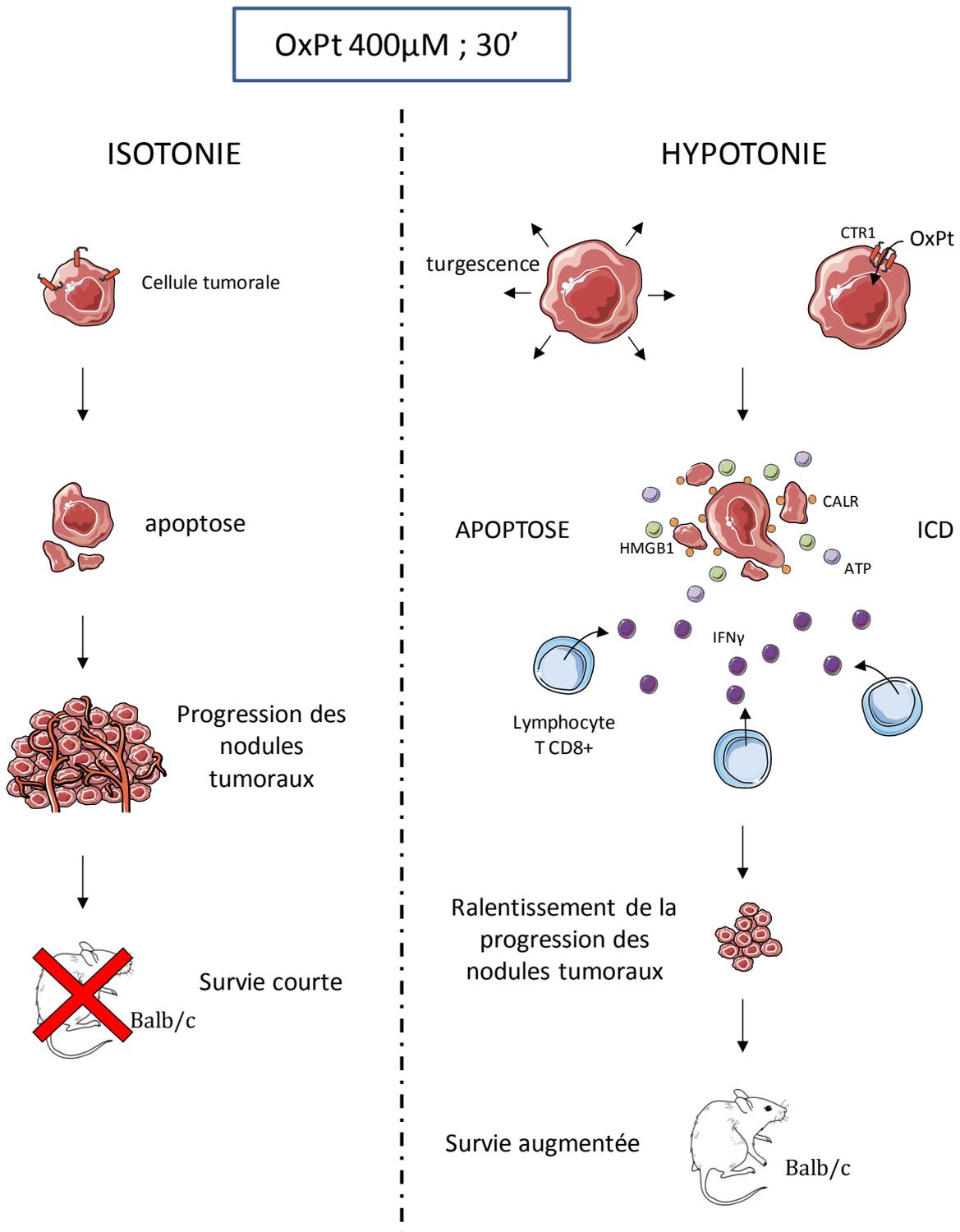


Figure 28 : Effet de l'hypotonie lors de la modélisation de la CIP. En solution hypotonique (panel de droite), une exposition courte à une forte dose d'oxaliplatine conduit à l'apoptose des cellules cancéreuses coliques. L'efficacité de l'oxaliplatine en hypotonie est expliquée par une pénétration intracellulaire favorisée du sel de platine comparée au traitement en isotonie (panel de gauche), due à la turgescence des cellules et une augmentation de la fluidité membranaire qui permet la trimérisation de CTR1. La mort cellulaire est accompagnée d'une exposition à la membrane de la calréticuline, et d'un relargage d'ATP et d'HMGB1 qui sont les caractéristiques principales de la mort cellulaire immunogène à l'origine d'un recrutement de cellules immunitaires antitumorales compétentes, les lymphocytes T CD8+ produisant de l'IFN γ . Ceci entraîne un ralentissement de la croissance des nodules tumoraux et une survie augmentée des souris traitées, grâce à une meilleure efficacité de la chimiothérapie locorégionale.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux menés durant ma thèse ont permis d'étudier le rôle de l'hypotonie sur la mort des cellules tumorales coliques humaines et murines et sur l'activation de la mort cellulaire immunogène dans un modèle de modélisation de la chimiothérapie intrapéritonéale.

Nous montrons que l'association de l'oxaliplatine et d'un milieu hypotonique (le glucose 2.5%) permet une augmentation de l'incorporation du platine au sein des cellules coliques, une toxicité accrue, ainsi qu'une exposition membranaire de la calréticuline et un relargage d'ATP et d'HMGB1 (qui sont les marqueurs de la mort cellulaire immunogène). Le recrutement de cellules immunitaires immunocompétentes, les lymphocytes CD8+ sécrétant de l'IFN γ , a été mis en évidence au sein de tumeurs CT26 établies chez la souris Balb/c. L'efficacité de l'association de l'oxaliplatine et de l'hypotonie a été mise en évidence dans un modèle *in vivo* de carcinomatose péritonéale et une modélisation de la chimiothérapie intrapéritonéale, où nous avons montré un ralentissement de la croissance des nodules tumoraux et une augmentation de la survie des souris.

Au niveau clinique, l'utilisation de l'hypotonie ne serait pas généralisable pour une administration en intraveineux ou en systémiques chez les patients, mais uniquement dans certaines conditions spécifiques, au site de la tumeur ou en bains de chimiothérapie.

Ces résultats constituent un espoir dans la prise en charge de la carcinose péritonéale d'origine colique et proposent l'hypotonie comme un outil qui pourrait permettre une meilleure efficacité de la chimiothérapie locorégionale.

BIBLIOGRAPHIE

Ahadova, A., R. Gallon, J. Gebert, A. Ballhausen, V. Endris, M. Kirchner, A. Stenzinger, J. Burn, M. von Knebel Doeberitz, H. Blaker and M. Kloor (2018). "Three molecular pathways model colorectal carcinogenesis in Lynch syndrome." Int J Cancer.

Alkhamesi, N. A., P. Ziprin, K. Pfistermuller, D. H. Peck and A. W. Darzi (2005). "ICAM-1 mediated peritoneal carcinomatosis, a target for therapeutic intervention." Clin Exp Metastasis**22**(6): 449-459.

Aranda, F., N. Bloy, J. Pesquet, B. Petit, K. Chaba, A. Sauvat, O. Kepp, N. Khadra, D. Enot, C. Pfirschke, M. Pittet, L. Zitvogel, G. Kroemer and L. Senovilla (2015). "Immune-dependent antineoplastic effects of cisplatin plus pyridoxine in non-small-cell lung cancer." Oncogene**34**(23): 3053-3062.

Benlahfid, M., D. Erguibi, K. Elhattabi, F. Bensardi, D. Khaiz, R. Lafriekh, D. Rebroub, A. Fadil and T. Aboussaouira (2017). "[Descriptive epidemiology of peritoneal carcinosis of gastrointestinal origin at the Ibn Rochd University Hospital, Casablanca (2008-2010)]." Pan Afr Med J**27**: 234.

Binefa, G., F. Rodriguez-Moranta, A. Teule and M. Medina-Hayas (2014). "Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine." World J Gastroenterol**20**(22): 6786-6808.

Bonaldi, T., F. Talamo, P. Scaffidi, D. Ferrera, A. Porto, A. Bachi, A. Rubartelli, A. Agresti and M. E. Bianchi (2003). "Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion." EMBO J**22**(20): 5551-5560.

Bouhadjari, N., W. Gabato, D. Calabrese, S. Msika and H. Keita (2016). "Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with cisplatin: Amifostine prevents acute severe renal impairment." Eur J Surg Oncol**42**(2): 219-223.

Bouquet, W., S. Deleye, S. Staelens, L. De Smet, N. Van Damme, I. Debergh, W. P. Ceelen, F. De Vos, J. P. Remon and C. Vervaet (2011). "Antitumour efficacy of two paclitaxel formulations for hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in an in vivo rat model." Pharm Res**28**(7): 1653-1660.

Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., Boise, L. H.. (2013). "Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis." BMC Cell Biol**14**:32.

Burada, F., E. R. Nicoli, M. E. Ciurea, D. C. Uscatu, M. Ioana and D. I. Gheonea (2015). "Autophagy in colorectal cancer: An important switch from physiology to pathology." World J Gastrointest Oncol**7**(11): 271-284.

Burleson, K. M., L. K. Hansen and A. P. Skubitz (2004). "Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers." Clin Exp Metastasis**21**(8): 685-697.

Casares, N., M. O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Metivier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel and G. Kroemer (2005). "Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death." J Exp Med**202**(12): 1691-1701.

- Chen, D. S., Mellman, I. (2013). "Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle." Immunity**39**(1):1-10.
- Dasari, S. and P. B. Tchounwou (2014). "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action." Eur J Pharmacol**740**: 364-378.
- de la Chapelle, A. (2004). "Genetic predisposition to colorectal cancer." Nat Rev Cancer**4**(10): 769-780.
- Denton, D., B. Shrivage, R. Simin, K. Mills, D. L. Berry, E. H. Baehrecke and S. Kumar (2009). "Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in Drosophila." Curr Biol**19**(20): 1741-1746.
- Dilruba, S. and G. V. Kalayda (2016). "Platinum-based drugs: past, present and future." Cancer Chemother Pharmacol**77**(6): 1103-1124.
- Dumitriu, I. E., M. E. Bianchi, M. Bacci, A. A. Manfredi and P. Rovere-Querini (2007). "The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells." J Leukoc Biol**81**(1): 84-91.
- Elias, D., El Otmany, A., Bonnay, M., Paci, A., Ducreux, M., Antoun, S., Lasser, P., Laurent, S., Bourget, P (2002). "Human pharmacokinetic study of heated intraperitoneal oxaliplatin in increasingly hypotonic solutions after complete resection of peritoneal carcinomatosis." Oncology**63**(4):346-52.
- Elias, D., J. H. Lefevre, J. Chevalier, A. Brouquet, F. Marchal, J. M. Classe, G. Ferron, J. M. Guilloit, P. Meeus, D. Goere and J. Bonastre (2009). "Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin." J Clin Oncol**27**(5): 681-685.
- Elias, D., B. Raynard, M. Bonnay and M. Pocard (2006). "Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin alone and in combination with intraperitoneal irinotecan: Pharmacologic studies." Eur J Surg Oncol**32**(6): 607-613.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol**35**(4): 495-516.
- Emoto, S., E. Sunami, H. Yamaguchi, S. Ishihara, J. Kitayama and T. Watanabe (2014). "Drug development for intraperitoneal chemotherapy against peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer." Surg Today**44**(12): 2209-2220.
- Esquis, P., Consolo, D., Magnin, G., Pointaire, P., Moretto, P., Ynsa, M. D., Beltramo, J. L., Drogoul, C., Simonet, M., Benoit, L., Rat, P., Chauffert, B. (2006). "High intra-abdominal pressure enhances the penetration and antitumor effect of intraperitoneal cisplatin on experimental peritoneal carcinomatosis." Ann Surg**244**(1):106-12.
- Evrard, S. (2018). "[Autopsy of an expert consensus. To end hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in colorectal carcinomatosis]." Bull Cancer**105**(9):839-841.
- Facy, O., Al Samman, S., Magnin, G., Ghiringhelli, F., Ladoire, S., Chauffert, B., Rat, P., Ortega-Deballon, P. (2012). "High pressure enhances the effect of hyperthermia in intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin: an experimental study." Ann Surg**256**(6):1084-8.

Facy, O., Doussot, A., Zinzindohoue, F., Holl, S., Rat, P., Ortega Deballon, P. (2014). "Isolated hepatic perfusion: principles and results." *J Visc Surg***151** Suppl 1:S25-32

Fatokun, A. A., V. L. Dawson and T. M. Dawson (2014). "Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities." *Br J Pharmacol***171**(8): 2000-2016.

Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D. E., Mehlen, P. (2001). " The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation." *Proc Natl Acad Sci U S A***98**(6):3416-21.

Galluzzi, L., A. Buque, O. Kepp, L. Zitvogel and G. Kroemer (2017). "Immunogenic cell death in cancer and infectious disease." *Nat Rev Immunol***17**(2): 97-111.

Galluzzi, L., F. Pietrocola, J. M. Bravo-San Pedro, R. K. Amaravadi, E. H. Baehrecke, F. Cecconi, P. Codogno, J. Debnath, D. A. Gewirtz, V. Karantza, A. Kimmelman, S. Kumar, B. Levine, M. C. Maiuri, S. J. Martin, J. Penninger, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, H. U. Simon, A. Simonsen, A. M. Thorburn, G. Velasco, K. M. Ryan and G. Kroemer (2015). "Autophagy in malignant transformation and cancer progression." *EMBO J***34**(7): 856-880.

Galluzzi, L., I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. Garcia-Saez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jaattela, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. Lopez-Otin, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkenin, U. M. Moll, C. Munoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nunez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino and G. Kroemer (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death Differ***25**(3): 486-541.

Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E.

White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ**19**(1): 107-120.

Garg, A. D., D. V. Krysko, T. Verfaillie, A. Kaczmarek, G. B. Ferreira, T. Marysael, N. Rubio, M. Firczuk, C. Mathieu, A. J. Roebroek, W. Annaert, J. Golab, P. de Witte, P. Vandenabeele and P. Agostinis (2012). "A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death." EMBO J**31**(5): 1062-1079.

Geigl, J. B., A. C. Obenauf, T. Schwarzbraun and M. R. Speicher (2008). "Defining 'chromosomal instability'." Trends Genet**24**(2): 64-69.

Gesson-Paute, A., Ferron, G., Thomas, F., de Lara, E. C., Chatelut, E., Querleu, D. (2008). "Pharmacokinetics of oxaliplatin during open versus laparoscopically assisted heated intraoperative intraperitoneal chemotherapy (HIPEC): an experimental study." Ann Surg Oncol**15**(1):339-44.

Ghiringhelli, F. (2018). "[Novel strategy in oncoimmunology]." Bull Cancer.

Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J. L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N. M. McLaughlin, N. M. Haynes, M. J. Smyth, G. Kroemer and L. Zitvogel (2009). "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors." Nat Med**15**(10): 1170-1178.

Glockzin, G., P. von Breitenbuch, H. J. Schlitt and P. Piso (2013). "Treatment-related morbidity and toxicity of CRS and oxaliplatin-based HIPEC compared to a mitomycin and doxorubicin-based HIPEC protocol in patients with peritoneal carcinomatosis: a matched-pair analysis." J Surg Oncol**107**(6): 574-578.

Golden, E. B., D. Frances, I. Pellicciotta, S. Demaria, M. Helen Barcellos-Hoff and S. C. Formenti (2014). "Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death." Oncoimmunology**3**: e28518.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell**100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell**144**(5): 646-674.

Harmon, R. L. and P. H. Sugarbaker (2005). "Prognostic indicators in peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer." Int Semin Surg Oncol**2**(1): 3.

Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature**407**(6805):770-6.

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., Tschopp, J. (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol**1**(6):489-95.

Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., Swanson, P. E. (2009). "Cell Death." N Engl J Med**361**(16):1570-83.

- Howell, S. B., R. Safaei, C. A. Larson and M. J. Sailor (2010). "Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs." Mol Pharmacol**77**(6): 887-894.
- Huang, J. Y., Y. Y. Xu, Z. Sun, Z. Zhu, Y. X. Song, P. T. Guo, Y. You and H. M. Xu (2012). "Comparison different methods of intraoperative and intraperitoneal chemotherapy for patients with gastric cancer: a meta-analysis." Asian Pac J Cancer Prev**13**(9): 4379-4385.
- Izzo, V., Bravo-San Pedro, J. M., Sica, V., Kroemer, G., Galluzzi, L. (2016). "Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties." Trends Cell Biol**26**(9):655-667
- Jacquet, P., A. Averbach, A. D. Stephens, O. A. Stuart, D. Chang and P. H. Sugarbaker (1998). "Heated intraoperative intraperitoneal mitomycin C and early postoperative intraperitoneal 5-fluorouracil: pharmacokinetic studies." Oncology**55**(2): 130-138.
- Johnson, C. M., C. Wei, J. E. Ensor, D. J. Smolenski, C. I. Amos, B. Levin and D. A. Berry (2013). "Meta-analyses of colorectal cancer risk factors." Cancer Causes Control**24**(6): 1207-1222.
- Kaiser, W. J., Sridharan, H., Huang, C., Mandal, P., Upton, J. W., Gough, P. J., Sehon, C. A., Marquis, R. W., Bertin, J., Mocarski, E. S. (2013). "Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL." J Biol Chem**288**(43):31268-79.
- Kather, J. N., N. Halama and D. Jaeger (2018). "Genomics and emerging biomarkers for immunotherapy of colorectal cancer." Semin Cancer Biol.
- Kim, S. Y., X. Song, L. Zhang, D. L. Bartlett and Y. J. Lee (2014). "Role of Bcl-xL/Beclin-1 in interplay between apoptosis and autophagy in oxaliplatin and bortezomib-induced cell death." Biochem Pharmacol**88**(2): 178-188.
- Kimmelman, A. C. (2011). "The dynamic nature of autophagy in cancer." Genes Dev**25**(19): 1999-2010.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., Kirchhoff, S. (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." J Biol Chem**276**(23):20633-40
- Kudryavtseva, A. V., A. V. Lipatova, A. R. Zaretsky, A. A. Moskalev, M. S. Fedorova, A. S. Rasskazova, G. A. Shibukhova, A. V. Snezhkina, A. D. Kaprin, B. Y. Alekseev, A. A. Dmitriev and G. S. Krasnov (2016). "Important molecular genetic markers of colorectal cancer." Oncotarget**7**(33): 53959-53983.
- Lai, K., M. C. Killingsworth and C. S. Lee (2014). "The significance of autophagy in colorectal cancer pathogenesis and implications for therapy." J Clin Pathol**67**(10): 854-858.
- Lavrik, I., A. Golks and P. H. Krammer (2005). "Death receptor signaling." J Cell Sci**118**(Pt 2): 265-267.
- Loeb, L. A. (2001). "A mutator phenotype in cancer." Cancer Res**61**(8): 3230-3239.

- Los, G., M. J. van Vugt and H. M. Pinedo (1994). "Response of peritoneal solid tumours after intraperitoneal chemohyperthermia treatment with cisplatin or carboplatin." Br J Cancer**69**(2): 235-241.
- Los, D. A., Murata, N. (2004). "Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals." Biochim Biophys Acta**1666**(1-2):142-57.
- Lotze, M. T. and K. J. Tracey (2005). "High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal." Nat Rev Immunol**5**(4): 331-342.
- Lu, Z., J. Wang, M. G. Wientjes and J. L. Au (2010). "Intraperitoneal therapy for peritoneal cancer." Future Oncol**6**(10): 1625-1641.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell**94**(4):481-90.
- Luo, Y., Y. Chihara, K. Fujimoto, T. Sasahira, M. Kuwada, R. Fujiwara, K. Fujii, H. Ohmori and H. Kuniyasu (2013). "High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy." Eur J Cancer**49**(3): 741-751.
- Lynch, D. and A. Murphy (2016). "The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer." Ann Transl Med**4**(16): 305.
- Man, S. M., R. Karki and T. D. Kanneganti (2017). "Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases." Immunol Rev**277**(1): 61-75.
- Marinkovic, M., M. Sprung, M. Buljubasic and I. Novak (2018). "Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy." Oxid Med Cell Longev**2018**: 8023821.
- Markowitz, S. D. and M. M. Bertagnolli (2009). "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer." N Engl J Med**361**(25): 2449-2460.
- Marley, A. R. and H. Nan (2016). "Epidemiology of colorectal cancer." Int J Mol Epidemiol Genet**7**(3): 105-114.
- Martins, I., O. Kepp, F. Schlemmer, S. Adjemian, M. Tailler, S. Shen, M. Michaud, L. Menger, A. Gdoura, N. Tajeddine, A. Tesniere, L. Zitvogel and G. Kroemer (2011). "Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress." Oncogene**30**(10): 1147-1158.
- Martins, I., S. Q. Raza, L. Voisin, H. Dakhli, F. Law, D. De Jong, A. Allouch, M. Thoreau, C. Brenner, E. Deutsch and J. L. Perfettini (2017). "Entosis: The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death." Biomed J**40**(3): 133-140.
- Martins, I., Y. Wang, M. Michaud, Y. Ma, A. Q. Sukkurwala, S. Shen, O. Kepp, D. Metivier, L. Galluzzi, J. L. Perfettini, L. Zitvogel and G. Kroemer (2014). "Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death." Cell Death Differ**21**(1): 79-91.
- Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth and E. White (2007). "Role of autophagy in cancer." Nat Rev Cancer**7**(12): 961-967.

- Mokarram, P., M. Albokashy, M. Zarghooni, M. A. Moosavi, Z. Sepehri, Q. M. Chen, A. Hudecki, A. Sargazi, J. Alizadeh, A. R. Moghadam, M. Hashemi, H. Movassagh, T. Klonisch, A. A. Owji, M. J. Los and S. Ghavami (2017). "New frontiers in the treatment of colorectal cancer: Autophagy and the unfolded protein response as promising targets." Autophagy**13**(5): 781-819.
- Montico, B., A. Nigro, V. Casolaro and J. Dal Col (2018). "Immunogenic Apoptosis as a Novel Tool for Anticancer Vaccine Development." Int J Mol Sci**19**(2).
- Murono, K., K. Kawai, K. Hata, S. Emoto, M. Kaneko, K. Sasaki, T. Nishikawa, K. Otani, T. Tanaka and H. Nozawa (2018). "Regimens of Intraperitoneal Chemotherapy for Peritoneal Carcinomatosis from Colorectal Cancer." Anticancer Res**38**(1): 15-22.
- Ndagi, U., N. Mhlongo and M. E. Soliman (2017). "Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective." Drug Des Devel Ther**11**: 599-616.
- Negulescu, A. M., Mehlen, P. (2018). "Dependence receptors - the dark side awakens." FEBS J
- Nunes, T., Bernardazzi, C., de Souza, H. S. (2014). "Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium." Biomed Res Int2014:218493.
- Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J. L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccosanti, M. Piacentini, L. Zitvogel and G. Kroemer (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." Nat Med**13**(1): 54-61.
- Otto, S. E. (1995). "Advanced concepts in chemotherapy drug delivery: regional therapy." J Intraven Nurs**18**(4): 170-176.
- Overholtzer, M., A. A. Mailleux, G. Mouneimne, G. Normand, S. J. Schnitt, R. W. King, E. S. Cibas and J. S. Brugge (2007). "A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion." Cell**131**(5): 966-979.
- Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A. C. Bjorklund, D. C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D. B. Williams and G. Kroemer (2009). "Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death." EMBO J**28**(5): 578-590.
- Polycarpe, E., L. Arnould, E. Schmitt, L. Duvillard, E. Ferrant, N. Isambert, C. Duvillard, J. L. Beltramo, D. Chevet and B. Chauffert (2004). "Low urine osmolarity as a determinant of cisplatin-induced nephrotoxicity." Int J Cancer**111**(1): 131-137.
- Pross, M., H. Lippert, G. Nestler, R. Kuhn, H. Langer, R. Mantke and H. U. Schulz (2004). "Effect of low molecular weight heparin on intra-abdominal metastasis in a laparoscopic experimental study." Int J Colorectal Dis**19**(2): 143-146.
- Quasar Collaborative, G., R. Gray, J. Barnwell, C. McConkey, R. K. Hills, N. S. Williams and D. J. Kerr (2007). "Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study." Lancet**370**(9604): 2020-2029.
- Rancoule, C., J. B. Guy, A. Vallard, M. Ben Mrad, A. Rehailia and N. Magne (2017). "[50th anniversary of cisplatin]." Bull Cancer**104**(2): 167-176.

- Rebe, C. and F. Ghiringhelli (2015). "Cytotoxic effects of chemotherapy on cancer and immune cells: how can it be modulated to generate novel therapeutic strategies?" Future Oncol.
- Recio-Boiles, A. and B. Cagir (2018). Cancer, Colon. StatPearls. Treasure Island (FL).
- Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1997). "Caspases: intracellular signaling by proteolysis." Cell**14;91**(4):443-6.
- Sardi, A., W. Jimenez, C. Nieroda, M. Sittig, S. Shankar and V. Gushchin (2014). "Melphalan: a promising agent in patients undergoing cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy." Ann Surg Oncol**21**(3): 908-914.
- Scaffidi, P., T. Misteli and M. E. Bianchi (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." Nature**418**(6894): 191-195.
- Schiraldi, M., A. Raucci, L. M. Munoz, E. Livoti, B. Celona, E. Venereau, T. Apuzzo, F. De Marchis, M. Pedotti, A. Bachi, M. Thelen, L. Varani, M. Mellado, A. Proudfoot, M. E. Bianchi and M. Ugucioni (2012). "HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4." J Exp Med**209**(3): 551-563.
- Segui, B., Legembre, P. (2010). "Redistribution of CD95 into the lipid rafts to treat cancer cells?" Recent Pat Anticancer Drug Discov**5**(1):22-8.
- Semino, C., G. Angelini, A. Poggi and A. Rubartelli (2005). "NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1." Blood**106**(2): 609-616.
- Senovilla, L., F. Aranda, L. Galluzzi and G. Kroemer (2014). "Impact of myeloid cells on the efficacy of anticancer chemotherapy." Curr Opin Immunol**30**: 24-31.
- Serrano-Puebla, A. and P. Boya (2018). "Lysosomal membrane permeabilization as a cell death mechanism in cancer cells." Biochem Soc Trans**46**(2): 207-215.
- Shimizu, S., T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C. B. Thompson and Y. Tsujimoto (2004). "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes." Nat Cell Biol**6**(12): 1221-1228.
- Simon, K. (2016). "Colorectal cancer development and advances in screening." Clin Interv Aging**11**: 967-976.
- Sistigu, A., T. Yamazaki, E. Vacchelli, K. Chaba, D. P. Enot, J. Adam, I. Vitale, A. Goubar, E. E. Baracco, C. Remedios, L. Fend, D. Hannani, L. Aymeric, Y. Ma, M. Niso-Santano, O. Kepp, J. L. Schultze, T. Tuting, F. Belardelli, L. Bracci, V. La Sorsa, G. Ziccheddu, P. Sestili, F. Urbani, M. Delorenzi, M. Lacroix-Triki, V. Quidville, R. Conforti, J. P. Spano, L. Pusztai, V. Poirier-Colame, S. Delalogue, F. Penault-Llorca, S. Ladoire, L. Arnould, J. Cyrta, M. C. Dessoliers, A. Eggermont, M. E. Bianchi, M. Pittet, C. Engblom, C. Pfirschke, X. Preville, G. Uze, R. D. Schreiber, M. T. Chow, M. J. Smyth, E. Proietti, F. Andre, G. Kroemer and L. Zitvogel (2014). "Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy." Nat Med**20**(11): 1301-1309.

- Solass, W., R. Kerb, T. Murdter, U. Giger-Pabst, D. Strumberg, C. Tempfer, J. Zieren, M. Schwab and M. A. Reymond (2014). "Intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinomatosis using pressurized aerosol as an alternative to liquid solution: first evidence for efficacy." Ann Surg Oncol**21**(2): 553-559.
- Solassol, J., N. Boulle, T. Maudelonde and A. Mange (2005). "[Clinical proteomics: towards early detection of cancers]." Med Sci (Paris)**21**(8-9): 722-729.
- Song, M., W. S. Garrett and A. T. Chan (2015). "Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention." Gastroenterology**148**(6): 1244-1260 e1216.
- Soriano, J., I. Mora-Espi, M. E. Alea-Reyes, L. Perez-Garcia, L. Barrios, E. Ibanez and C. Nogues (2017). "Cell Death Mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral Human Cell Lines Triggered by Photodynamic Treatments: Apoptosis, Necrosis and Parthanatos." Sci Rep**7**: 41340.
- Stein, A. and G. Folprecht (2018). "Immunotherapy of Colon Cancer." Oncol Res Treat**41**(5): 282-285.
- Stewart, D. J. (2007). "Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin." Crit Rev Oncol Hematol**63**(1): 12-31.
- Stupack, D. G. (2013). "Caspase-8 as a therapeutic target in cancer." Cancer Lett**332**(2): 133-140.
- Sun, S., J. Cai, Q. Yang, S. Zhao and Z. Wang (2017). "The association between copper transporters and the prognosis of cancer patients undergoing chemotherapy: a meta-analysis of literatures and datasets." Oncotarget**8**(9): 16036-16051.
- Taniuchi, S., M. Miyake, K. Tsugawa, M. Oyadomari and S. Oyadomari (2016). "Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2alpha kinases." Sci Rep**6**: 32886.
- Terzi, C., N. C. Arslan and A. E. Canda (2014). "Peritoneal carcinomatosis of gastrointestinal tumors: where are we now?" World J Gastroenterol**20**(39): 14371-14380.
- Tesniere, A., F. Schlemmer, V. Boige, O. Kepp, I. Martins, F. Ghiringhelli, L. Aymeric, M. Michaud, L. Apetoh, L. Barault, J. Mendiboure, J. P. Pignon, V. Jooste, P. van Endert, M. Ducreux, L. Zitvogel, F. Piard and G. Kroemer (2010). "Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin." Oncogene**29**(4): 482-491.
- Upton, J. W., Kaiser, W. J., Mocarski, E. S. (2012). "DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA." Cell Host Microbe**11**(3):290-7
- van Zyl, B., D. Tang and N. A. Bowden (2018). "Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment." Endocr Relat Cancer**25**(5): R303-R318.
- Vercammen, D., Vandenabeele, P., Beyaert, R., Declercq, W., Fiers, W. (1997). "Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells." Cytokine**9**(11):801-8.

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., Vandenameele, P. (198). "Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways." J Exp Med**188**(5):919-30.

Vilar, E. and S. B. Gruber (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence." Nat Rev Clin Oncol**7**(3): 153-162.

Wheate, N. J., S. Walker, G. E. Craig and R. Oun (2010). "The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials." Dalton Trans**39**(35): 8113-8127.

Yamamoto, H. and K. Imai (2015). "Microsatellite instability: an update." Arch Toxicol**89**(6): 899-921.

Yang, Y., G. Jiang, P. Zhang and J. Fan (2015). "Programmed cell death and its role in inflammation." Mil Med Res**2**: 12.

Yu, H., P. Guo, X. Xie, Y. Wang and G. Chen (2017). "Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases." J Cell Mol Med**21**(4): 648-657.

Sites internet :

Association Française Formation Médicale continue en Hépatogastro-entérologie :
<http://www.fmcgastro.org/textes-postus/postu-2016-paris/indications-actuelles-de-la-chip-en-oncologie-digestive/>

http://www.jle.com.gate2.inist.fr/fr/revues/hpg/e-docs/carcinose_peritoneale_dorigine_colorectale_indications_therapeutiques_302705/article.phtml?tab=texte

ANNEXES

1. Formations complémentaires suivies au cours du cursus de thèse :

- Activité complémentaire Enseignements, doctorant contractuel, UFR SVTE CNU 64 (Biochimie : 64h) 2015-2016
- Formation Cancérologie (32h)
- Formation Immunologie des tumeurs (33h)
- Formation Règles de travail en L2 (3.5h)
- Formation Logiciel Flowlogic (7h)

2. Participation aux congrès ou conférences :

- Congrès Miltenyi Biotech Immuno-Oncology Days (2018)
- Congrès 8e journée d'immunologie et immunothérapie des cancers (2016)
- Conférence "De la recherche au brevet, des bases à la pratique" (2016)

3. Article :

- Hypotonic stress enhances colon cancer cell death induced by platinum derivatives and improves anti-tumor efficacy of intraperitoneal chemotherapy.

soumis Cancer Research

L. Demontoux et al 2018

Hypotonic stress enhances colon cancer cell death induced by platinum derivatives and improves anti-tumor efficacy of intraperitoneal chemotherapy

Lucie Demontoux^{1,2}, Valentin Derangère^{1,2,3}, Thomas Pilot^{1,2}, Chloé Thinselin¹, Angélique Chevriaux^{1,3}, Fanny Chalmin^{1,2}, Florence Bouyer², François Ghiringhelli^{1,2,3}, Cédric Rébé^{1,3,*}.

1. INSERM UMR1231, F-21000 Dijon, France.

2. Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France.

3. Centre Georges François Leclerc, F-21000, Dijon, France.

*. Corresponding author: Cédric Rébé, INSERM UMR1231, 7 bd Jeanne d'Arc, Dijon, 21079, and Centre GF Leclerc, 1 rue Pr Marion, Dijon 21079, France. Tel: +33 (0)3 80 39 33 53. Fax: +33 (0)3 80 39 33 34. E-mail: crebe@cgfl.fr.

Running Title: Hypotonic stress improves platinum derivatives cytotoxicity.

Key words: peritoneal carcinomatosis, cell death, immunogenic cell death, platinum derivatives, hypotonic stress.

Financial supports: This work was supported by the Ligue nationale contre le cancer. FG team is « Equipe labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer ». LD is a fellow of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Word count: 4991.

Number of figures: 5.

ABSTRACT

Colorectal cancer is a highly metastatic disease that could invade various distal organs via hematogenous dissemination. In addition tumor could locally invade the peritoneal cavity and leads to peritoneal carcinomatosis. This is a terminal condition with poor prognosis and only palliative treatments are proposed to some patients. These treatments are cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy which offered increased survival medians. However clinicians use different parameters and conditions of treatments without any consensus. Here we decided to evaluate the effect of osmolarity in the efficacy of this procedure to kill colon cancer cells. We first show that a short exposure of platinum derivatives in hypotonic conditions is more efficient to decrease cell viability of human and murine colon cancer cells *in vitro* as compared to isotonic conditions. This is related to a more important incorporation of platinum and the capacity of hypotonic stress to induce the copper transporter CTR1 oligomerization. Oxaliplatin in hypotonic conditions induces caspase-dependent cell death of colon cancer cells. Moreover hypotonic conditions also modulate the capacity of oxaliplatin and cisplatin (but not carboplatin) to induce immunogenic cell death (ICD). Finally in a murine peritoneal carcinomatosis model, oxaliplatin in hypotonic conditions is the only condition able to slow down the appearance of tumor nodules and to increase mice survival. Altogether our study show that clinicians should reconsider the importance of hypoosmolarity in intraperitoneal chemotherapy.

INTRODUCTION

Colorectal cancer is the third most commonly diagnosed cancer and the fourth most deadly cancer worldwide (1). Chemotherapy and surgery remain the main treatments of colorectal cancer. However, colorectal cancer frequently occurs with metastases in distal organs but also in the peritoneal cavity. Peritoneal carcinomatosis was for a long time regarded as a terminal condition with poor prognosis and a median survival of 6 months. Only palliative chemotherapeutic treatments were proposed to most patients. However new strategies of treatments were developed, such as cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) and offered increased survival medians (from 13 to 32 months). However this therapeutic approach is complicated, remains restricted to a few expert centers and is performed with heterogeneous study design (2, 3). Actually there are some variations in the chemotherapy regimen and in intraperitoneal drug delivery. Concerning chemotherapy, mitomycin C and oxaliplatin are the most common agents used with or without cisplatin (only with mitomycin C) or irinotecan. Some agents with the potential to increase HIPEC efficacy (such as bevacizumab which target vascular endothelial growth factor) or to dampen relative adverse effects (amifostine to prevent renal toxicity of oxaliplatin) were also tested (3). Many studies are being conducted to find the best way to deliver chemotherapy, such as the dosage, the temperature, the pressure and the timing of the procedure (4). Because some effects of reduced osmolarity were shown on platinum incorporation and toxicity on cancer cells (5), a clinical trial aimed at studying the effect of hypotonic solutions on HIPEC efficacy was conducted. They not only showed that hypotonic solutions didn't increase platinum systemic or tumoral concentrations but also they observed a high incidence of hemorrhage and thrombocytopenia (6). However hypoosmolarity was tested in combination with hyperthermia in this study. Because the

use of hypotonic intraperitoneal cisplatin treatment in patient with gastric cancer was well tolerated (7), we decided to evaluate the influence of hypotonic shock on platinum derivatives effects on colon cancer cell viability. We observe here that the hypotonic solution glucose 2.5% in association with platinum derivatives (oxaliplatin, cisplatin or carboplatin) decreases human and murine colon cancer cell viability in a time and dose-dependent manner. These effects are due to a more important incorporation of platinum and to an increased apoptosis rate. Moreover hypotonic shock also induces immunogenic cell death (ICD) features, i.e. calreticulin exposure, ATP and HMGB1 release with or without oxaliplatin or cisplatin. Finally oxaliplatin is more efficient at reducing the appearance of tumor nodules in hypotonic conditions in an *in vivo* peritoneal carcinomatosis model.

RESULTS

Hypotonic conditions increase platinum derivatives-mediated loss of cell viability

In order to evaluate the importance of CIP parameters, human HCT116 colon carcinoma cells were treated 30min with or without 400 μ M of oxaliplatin (corresponding to 150mg/L, the most used concentration in clinic) in optiMEM at 37°C (isotonic; 300mOsm – 37°C) or at 42°C (isotonic – 42°C) or in glucose 2.5% (hypotonic; 154mOsm – 37°C). The medium was then replaced with fresh RPMI + FBS and cell viability was evaluated 24h later (Figure 1A). Contrary to hyperthermia that failed to increase oxaliplatin cytotoxicity, hypotonic conditions increased oxaliplatin effects on cell viability (Figure 1B). Moreover these effects were also increased even with lowered time and concentrations conditions (Figure 1C and D). Hypotonic conditions also increased oxaliplatin effects on the viability of other cell lines with different mutation status such as SW480, HT29 (MSS) or HCT8 (MSI such as HCT116) cells (Figure 1E). Moreover these effects are long lasting effects, because even 96h or 15 days after treatments, hypotonic conditions still increase oxaliplatin effects on cell viability, suggesting that this treatment could induce complete eradication of cancer cells (Figure 1E and F). In order to know if hypotonic conditions effects were limited to oxaliplatin, we tested carboplatin and cisplatin and we observed that these platinum derivatives were also more effective at decreasing cell viability in hypotonic conditions (Figure 1G). Finally, the same results were observed on the murine colon cancer CT26 cells (Figure 1H). Altogether, these results show that hypotonic conditions increase the capacity of platinum derivatives to decrease cancer cell viability.

Hypotonic conditions improve CTR1 oligomerization and platinum cell incorporation

We first checked whether hypotonic conditions effects on oxaliptin-mediated cytotoxicity were correlated with an increased platinum accumulation in HCT116 cells. As shown in Figure 2A, hypotonic conditions increased the proportion of intra-cellular platinum after oxaliplatin treatments as compared with isotonic conditions. Moreover this accumulation of platinum was correlated with an increased oligomerization of CTR1 the membrane copper transporter responsible for platinum accumulation (8) as shown by non-denaturing western blot and immunofluorescence staining (Figure 2B and C). Finally, when copper was used as a competitor, the effects of hypotonic conditions on oxaliplatin were abrogated (Figure 2D). All these results suggest that the effects of hypotonic stress are mediated by a more important incorporation of oxaliplatin.

Hypotonic conditions improve oxaliplatin-mediated caspase-dependent cell death

In order to determine whether the observed decrease of cell viability induced by a treatment with oxaliplatin in hypotonic conditions was due to an increase of cell death we performed an annexin V/7-AAD staining on HCT116 cells. We observed an increase in the percentage of cells stained with annexin V alone or with both annexin V and 7-AAD (Figure 3A). Moreover the percentage of dead cells drastically decrease in the presence of the pan-caspase inhibitor, z-VAD.fmk. Finally, we observed more cleaved caspase-3, -7, -9 and cleaved PARP after 18 or 24h when the treatment of HCT116 cells with oxaliplatin was performed in hypotonic conditions as compared with isotonic conditions (Figure 3B). All these results suggest that hypotonic conditions improve the capacity of oxaliplatin to induce a caspase-dependent cell death, that most probably be apoptosis.

Hypotonic conditions modulate oxaliplatin and cisplatin-mediated ICD

Immunogenic cell death (ICD), which has recently been defined by the nomenclature committee of cell death, is another type of cell death that can occur simultaneously with apoptosis that is sufficient to activate an adaptive immune response specific for antigens expressed or released by dying cells (9). To consider the possibility that hypotonic conditions can increase or trigger platinum derivatives-mediated ICD, we investigated the appearance of specific ICD features in murine CT26 cells, i.e. calreticulin translocation from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane, ATP and HMGB1 release. First we showed that all the platinum derivatives tested in our conditions (30 min exposure in isotonic medium and replaced by fresh RPMI + FBS) were inefficient at inducing calreticulin exposure at the cell surface (Figure 4A). On the contrary, cisplatin and more importantly oxaliplatin were able to induce calreticulin exposure in hypotonic conditions, whereas carboplatin was not. One of the key mechanisms responsible for calreticulin exposure is the phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha (eIF2 α) (9). Here we showed that a short exposure of the cells to platinum derivatives in isotonic conditions was inefficient to trigger the phosphorylation of eIF2 α , whereas in hypotonic conditions, oxaliplatin and cisplatin were able to do it (Figure 4B).

Another feature of ICD is ATP release by dying cancer cells (9). We observed that the hypotonic condition alone was sufficient to increase some ATP release by CT26 cells, whereas a 30 min treatment with platinum derivatives was not (Figure 4C). However when oxaliplatin or cisplatin (but not carboplatin) were used in hypotonic conditions, we showed a higher level of extracellular ATP (3 or 6h after the treatment) as compared with hypotonic conditions alone (Figure 4C). ICD is also associated by HMGB1 translocation from the nucleus to the cytoplasm and finally to its release out of the cells

(9). We observed that the hypotonic condition alone was sufficient to induce HMGB1 release by CT26 cells, whereas a 30 min treatment with platinum derivatives was not (Figure 4D). However when platinum derivatives were used in hypotonic conditions, we didn't observe any additional HMGB1 in the cell supernatant, except for oxaliplatin 18h after the treatment (Figure 4D). In conclusion hypotonic conditions alone allow cells to release some ATP and HMGB1, induce oxaliplatin and cisplatin-mediated calreticulin exposure, improve oxaliplatin and cisplatin-mediated ATP release and ameliorate oxaliplatin-mediated HMGB1 release.

Hypotonic conditions improve oxaliplatin-mediated intraperitoneal chemotherapy in vivo

In order to validate our *in vitro* observations, we decided to use an *in vivo* peritoneal metastasis model. Balb/c mice were i.p. injected with CT26 cells and treated or not with oxaliplatin in isotonic or hypotonic conditions. We observed that mice treated with isotonic or hypotonic conditions quite rapidly died with a median of survival of 21 and 24 days respectively (Figure 5A). The treatment with oxaliplatin in isotonic conditions only slightly delay mice death (median survival of 26 days), whereas in hypotonic conditions it really improve the animal survival, until 35 days of survival median. Moreover we measured the PCI (Peritoneal Carninomatosis Index) at day 20 and found even if hypotonic or oxaliplatin conditions improve the PCI, the best effect was observed when mice were treated with oxaliplatin in hypotonic conditions (Figure 5B). Thus, the use of hypotonic solution in combination with oxaliplatin slows down the appearance of tumor nodules in the peritoneal cavity.

DISCUSSION

Data generated *in vitro* and in animal models demonstrate the importance of ICD. The importance of ICD in cancer treatment has been highlighted in several studies showing that cancer patients present mutations on genes coding for ICD stigmata receptors, such as *TLR4* (one of the receptors of HMGB1) or *P2X7* (the receptor of ATP) which can affect the response to treatment or have a significant negative prognostic impact on survival (10). Moreover the expression of calreticulin on tumor cells from patients is shown as a prognosis marker (11). However the relevance of cell death-induced anti-tumor immune response was rarely proved in patients (11). This can be explained either by the inability of chemotherapy to induce ICD or by their incapacity to reach efficient doses and/or time exposure of patient tumors. In this study, we decided to perform *in vitro* experiments with a short exposition of cancer cells to chemotherapy in a way to be closed to the clinic settings and more particularly to HIPEC. In these conditions we didn't observe any effect of oxaliplatin on ICD, contrary to previous works. Actually, Guido Kroemer's team shows that oxaliplatin is able to induce calreticulin exposure, ATP and HMGB1 release by cancer cells. Concerning cisplatin the release of ATP and the absence of calreticulin exposure are proved, while HMGB1 can be released or not maybe depending on the cell type and/or the concentration used (12-16). Little is known about the capacity of carboplatin to induce ICD. To our knowledge only one study shows no effect of carboplatin alone on ATP and HMGB1 release and calreticulin exposure and ionizing radiations are necessary to induce these phenomena (17). Nevertheless, we show here that even with a short exposure, oxaliplatin and cisplatin in hypotonic conditions are able to induce ICD in colon cancer cells. Further studies

should be done to evaluate if an hypotonic stress is able to trigger or to emphasize the capacity of other chemotherapeutic drugs to induce ICD.

One way to allow a chemotherapy to induce ICD is to combine it with molecules able to trigger ICD features. Kroemer's team used an automated epifluorescence microscopy-based platform to detect known biochemical hallmarks of ICD in human cancer cells. Using this platform, they found that cardiac glycosides, such as digoxin and digitoxin, both of which are used in clinical practice, were good inducers of ICD (18). Another example is the exposure of calreticulin, a hallmark of ICD, which is mediated partly by ER stress (in association with chemotherapy) and phosphorylation of eIF2 α . In order to achieve ICD, ER stress can be induced through different ways, for example, by favoring the accumulation of misfolded proteins, by inhibiting protein glycosylation or by deregulating redox and calcium homeostasis (19). In this context, *in vitro* and *in vivo* studies have shown the potential of ER stress inducers, such as thapsigargin and tunicamycin, to restore the immunogenicity of cisplatin-induced cell death (12). Here we also show that in the hypotonic conditions a short exposure of oxaliplatin or cisplatin are able to induce the phosphorylation of eIF2 α .

At the clinical level, the use of hypotonic stress is restricted to a few applications as it can only be applicated at the tumor site and not injected to the patients. Thus, it is mainly a tool for surgeons and more particularly for peritoneal metastasis treatments. Here with our peritoneal carcinomatosis model we show that oxaliplatin in hypotonic conditions really decrease the appearance of tumor nodules in the peritoneal cavity and really improve mice survival. Maybe these conditions, in the absence of hyperthermia as the combination with hypotonic solutions can induce high toxicity for the patient (6), should be considered by surgeons who practice intraperitoneal chemotherapy.

In conclusion this work provide new insight about the effect of hypotonic stress on colon cancer cell death *in vitro* and *in vivo*, by improving caspase-dependent cell death but also ICD and by ameliorating peritoneal carcinomatosis and mice survival.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Oxaliplatin was purchased from Sanofi Aventis, Cisplatin from Mylan and Carboplatin from Dakota. OptiMem was obtained from Life technologies and Glucose 2.5% by B.Braun. zVAD was purchased from Bachem, copper sulfate was purchased from Sigma-Aldrich.

Cell culture

The human colorectal carcinoma HCT116, colorectal adenocarcinoma HT29, HCT8 and SW480, and murine colon carcinoma CT26 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and were grown in RPMI 1640 with ultraglutamine (Lonza) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; Lonza) and with Pen/Strep Amphotericin B (PSA, Lonza) 1%, in an atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. Cells were mycoplasma free as tested every two weeks with the MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit" (LT-07318, Lonza). After 40 passages, new cells were thawed.

Treatment

Cells were seeded at 100 000 cells per well in 24 well dishes (Falcon). The next day, the supplemented RPMI medium is gently removed and the cells were treated for different times according to the experiment with an isotonic solution (OptiMem: 300 mosm/L) or hypotonic solution (2.5% glucose - G2.5%: 142 mosm/L) containing the different chemotherapy compounds at different concentrations for 30 minutes in an oven at 37 or 42 °C. The treatment solutions was removed and replaced with the

supplemented medium and placed at 37 °C for different times depending on the experiment.

Viability assay

Cells were seeded in 24 wells dishes (Falcon) at 100 000 cells/mL the day before treatment. After treatment, cells were washed with PBS and fixed with ethanol 100% for 30 minutes before crystal violet staining. Cristal violet was then resuspended in 33% acetic acid and OD was read at 590nm with a UVM340 spectrophotometer (ASYS).

Intracellular platinum dosage

Cells were implanted into 25cm² flask at 2.10⁶ cells/flask the day before treatment. After treatment, cells were treated with oxaliplatin under different osmolarity conditions, then harvested by trypsination. The platinum content of the cell pellets was then analyzed by atomic absorption spectrometry as previously described by the Welience platform (20).

Western blotting

Whole-cell lysates were prepared by lysing the cells in boiling buffer (1% SDS, 1 mM sodium vanadate, 10 mM Tris [pH 7.4]) in the presence of complete protease inhibitor mixture. The viscosity of the samples was reduced by sonication.

Whole-cell lysates or immunoprecipitation samples were mixed with loading buffer and separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and electroblotted to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). After incubation for 1 hour at RT with 5% nonfat milk in phosphate-buffered saline (PBS)–0.1% Tween-20, membranes were incubated overnight with the primary antibody diluted in PBS-milk-Tween, washed, incubated with the secondary antibody for 30 minutes at RT, and

washed again before analysis with a chemiluminescence detection kit (Amersham). The following Abs were used: anti-mouse β -actin (A1978) from Sigma-Aldrich, anti-human cleaved-caspase-3 (9664P), anti-human cleaved-caspase-7 (8438P) and anti-human cleaved-caspase-9 (9505P), anti-human cleaved-PARP (5625P), anti-mouse P-eIF2 α (3597S) and anti-mouse eIF2 α (5324S) from Cell signaling. Secondary Abs HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse and swine anti-rabbit immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch) were also used.

Immunofluorescence (IF)

Cells (150 000) were seeded in 12 well-dishes containing a cover glass (631-0150, VWR) which was pretreated for 10 minutes with Poly-L-Lysin (P4707, Sigma Aldrich). The following day, cells were treated as indicated. After 18 or 24 hours, cells were washed in PBS, fixed with 4% PFA at 4°C for 10 minutes and permeabilized using a PBS, 0.5% BSA, 0.1% Saponin (47036, Sigma Aldrich) buffer for 20 minutes at RT. Samples were incubated 2 hours at RT with primary antibodies or with Ig as a control. Cells were washed two times, and incubated with secondary Alexa488 conjugated anti-mouse or anti-rabbit for 30 minutes at RT. Cover glasses were mounted on a drop of Mounting Medium containing Dapi (Duo82040, Sigma Aldrich) for 15 minutes in the dark on a microscopy slide (045796, Dutscher). Slides were imaged using a CDD equipped upright microscope (Zeiss) and 63x, 1.4NA objective. Image analysis was performed using ImageJ software.

The following antibodies were used for IF: human anti-CTR1 (Novus biological), goat anti-mouse Alexa488 (1/1000, A11029, Invitrogen).

Cell death determination

For Annexin V/7-AAD labeling, cells were seeded in 24 well dishes as described above. The next day, a 2 hours pretreatment with the caspase inhibitor was realized (zVAD-fmk 50 μ M), then cells were washed with 1X PBS, and treated as indicated. The treatment solutions were removed and replaced with pretreatment solutions for 24 hours at 37°C. Cells were harvested and the AnnexinV (FITC)/7AAD (BD Biosciences) markings were made according to the supplier's recommendations. AnnexineV binding and 7AAD incorporation were detected by an LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using Flowjo software.

Calreticulin staining

Cells were seeded in 24 wells dishes (Falcon) at 100 000 cells/mL the day before treatment. After treatment, cells suspensions were centrifuged at 300g for 10 minutes at 4°C, then stained with DAPI solution (Nucblue) for 5 minutes at room temperature. After washing and centrifugation, the pellet was taken up in FSB (Flow Cytometry Solution Buffer) and incubated for 15 minutes at room temperature. The cells were centrifuged and the pellet stained in the primary antibody solution (anti-calreticulin or control IgG diluted to 4 μ g/ml without FSB-Abcam). After 1 hour incubation at room temperature in the dark, the cells were washed with FSB before being centrifuged at 300g for 5 minutes. The cell pellet was incubated for 10 minutes in 0.25X paraformaldehyde and then washed with FSB. After centrifugation, the cells were incubated for 45 minutes in the dark in an Alexa488 (Fischer Scientific) coupled secondary antibody solution diluted in FSB. Finally, the cells were washed with FSB, centrifuged, then taken up in FSB before being analyzed by flow cytometry (LSRII cytometer - BD Biosciences). The analysis was performed on negative cells for DAPI.

ATP supernatant assay

Cells were incubated for the indicated times with chemotherapy, then replaced in culture with medium without FVS. Cells suspensions were then centrifuged at 300g for 10 minutes at RT. Supernatants were transferred to a fresh tube. ATP measurement was done on supernatants using a luciferase/luciferine assay (G7570) from Promega according to the manufacturer's instructions with a Wallac 2 luminometer (PerkinElmer).

HMGB1 supernatant assay

Cells were seeded in 24 wells dishes (Falcon) at 100 000 cells/mL the day before treatment. After treatment the rate of HMGB1 in the supernatant were measured with the HMGB1 detection kit (6010, Chondrex) according to the manufacturer's instructions with a spectrophotometer (UVM340 ASYS).

Mice and *in vivo* experiments

All animals were bred and maintained according to both the FELASA and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (N° C 21 464 04 EA, University of Burgundy, France). Animals used were between 6 and 22 weeks of age. Female Balb/c mice (aged 6 to 8 weeks) were obtained from Charles River Laboratories. CT26 cells (25 000) were injected in 2mL of solution containing either optiMEM, glucose2.5%, optiMEM + 150mg/L oxaliplatin or glucose 2.5% + 150mg/L oxaliplatin. Animal survival was evaluated from the tumor cell injection until death. Animals were euthanized when turning moribund according to predefined criteria in order to avoid animal suffering. The Peritoneal Carcinomatosis Index (PCI) was evaluated as previously described (21)

Statistical analyses

In vitro results are shown as means \pm s.d., *in vivo* results are shown as means \pm s.e.m. and comparisons of datasets were performed using unpaired Student's *t* test (test group compared to control group). Statistical calculations were performed using GraphPad Prism 5. All *P* values were two tailed. Kaplan Meier test was also used for *in vivo* experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ligue nationale contre le cancer. FG team is « Equipe labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer ». LD is a fellow of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank the platform of Cytometry of Dijon.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.D., V.D., T.P., C.T., A.C., F.C. and F.B. performed experiments. L.D., V.D., C.R. analyzed the data. F.G. and C.R. provided scientific insight. C.R. and F.G. designed the study. C.R. wrote the manuscript. L.D., V.D. and F.G. read and corrected the manuscript.

REFERENCES

1. J. Ferlay *et al.*, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359-386 (2015).
2. D. Elias *et al.*, Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *J Clin Oncol* **27**, 681-685 (2009).
3. K. Murono *et al.*, Regimens of Intraperitoneal Chemotherapy for Peritoneal Carcinomatosis from Colorectal Cancer. *Anticancer Res* **38**, 15-22 (2018).
4. W. F. Morano, M. Khalili, D. S. Chi, W. B. Bowne, J. Esquivel, Clinical studies in CRS and HIPEC: Trials, tribulations, and future directions-A systematic review. *J Surg Oncol* **117**, 245-259 (2018).
5. E. Smith, A. P. Brock, The effect of reduced osmolarity on platinum drug toxicity. *Br J Cancer* **59**, 873-875 (1989).
6. D. Elias *et al.*, Human pharmacokinetic study of heated intraperitoneal oxaliplatin in increasingly hypotonic solutions after complete resection of peritoneal carcinomatosis. *Oncology* **63**, 346-352 (2002).
7. S. Tsujitani *et al.*, The administration of hypotonic intraperitoneal cisplatin during operation as a treatment for the peritoneal dissemination of gastric cancer. *Surgery* **131**, S98-104 (2002).
8. S. Sun, J. Cai, Q. Yang, S. Zhao, Z. Wang, The association between copper transporters and the prognosis of cancer patients undergoing chemotherapy: a meta-analysis of literatures and datasets. *Oncotarget* **8**, 16036-16051 (2017).
9. L. Galluzzi *et al.*, Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **25**, 486-541 (2018).
10. C. Rebe, F. Ghiringhelli, Cytotoxic effects of chemotherapy on cancer and immune cells: how can it be modulated to generate novel therapeutic strategies? *Future Oncol*, (2015).
11. B. Montico, A. Nigro, V. Casolaro, J. Dal Col, Immunogenic Apoptosis as a Novel Tool for Anticancer Vaccine Development. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
12. I. Martins *et al.*, Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* **30**, 1147-1158 (2011).
13. F. Aranda *et al.*, Immune-dependent antineoplastic effects of cisplatin plus pyridoxine in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **34**, 3053-3062 (2015).
14. I. Martins *et al.*, Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* **8**, 3723-3728 (2009).
15. I. Martins *et al.*, Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ* **21**, 79-91 (2014).
16. A. Tesniere *et al.*, Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29**, 482-491 (2010).
17. E. B. Golden *et al.*, Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology* **3**, e28518 (2014).
18. L. Menger *et al.*, Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Sci Transl Med* **4**, 143ra199 (2012).
19. O. Kepp *et al.*, eIF2 α phosphorylation as a biomarker of immunogenic cell death. *Semin Cancer Biol* **33**, 86-92 (2015).
20. E. Polycarpe *et al.*, Low urine osmolarity as a determinant of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Int J Cancer* **111**, 131-137 (2004).
21. A. Derrien *et al.*, Therapeutic Efficacy of Alpha-RIT Using a (213)Bi-Anti-hCD138 Antibody in a Mouse Model of Ovarian Peritoneal Carcinomatosis. *Front Med (Lausanne)* **2**, 88 (2015).

FIGURES

Figure 1

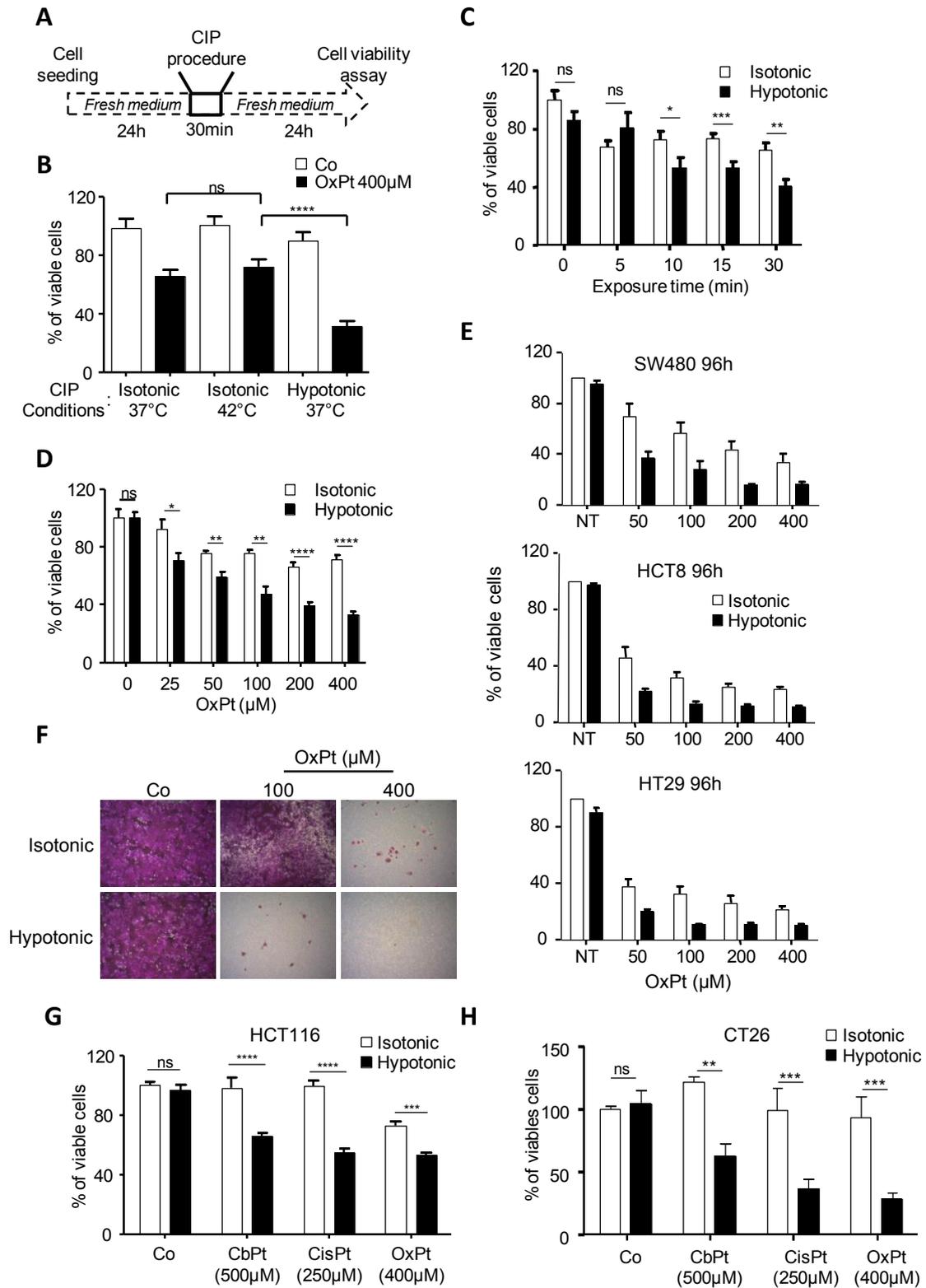


Fig. 1: Determination of optimal treatment conditions to decrease colon cancer cell viability. **A.** HCT116 cells were seeded in complete RPMI1640 the day before the experiment and treated for 30 min. with oxaliplatin in isotonic (optiMEM) or hypotonic (glucose 2.5%) conditions and then the medium was replaced by fresh complete RPMI1640 until viability test. **B.** HCT116 cells were treated as in A or at 42°C in isotonic conditions with or without 400µM of oxaliplatin (OxPt). **C and D.** HCT116 cells were treated as in A with different time of exposure (C) or oxaliplatin concentrations (D). **E.** SW480, HT29 and HCT8 cells were also treated as in A with different concentrations of oxaliplatin for 30 min. and the viability was determined 96h after treatment. **F.** HCT116 cells were treated as in A with 100 or 400µM of oxaliplatin and the viability was observed 15 days later. **G and H.** HCT116 (G) or CT26 (H) cells were treated as in A with indicated concentrations of carboplatin (CbPt), cisplatin (CisPt) or oxaliplatin (OxPt) and cell viability was determined 24h after. Data represents the mean ± s.d. of three independent experiments, except for panel F, one representative experiment of three. *, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001, ****, p < 0.0001, ns, not significant using two tailed t test.

Figure 2

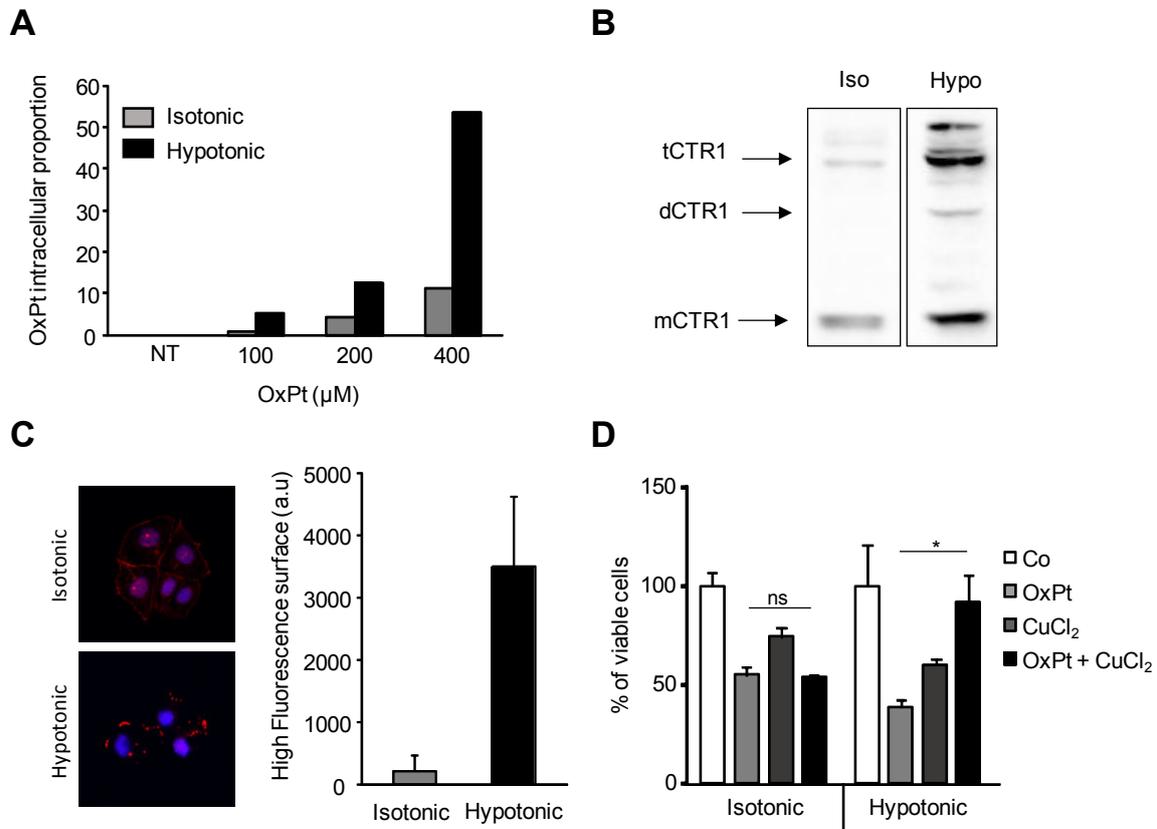


Fig. 2: Hypotonic effects on oxaliplatin-mediated cell death are due to an increased platinum incorporation. A. HCT116 cells were treated for 30 min in hypotonic or isotonic conditions with the indicated concentrations of oxaliplatin. Straightaway cells were collected and the intracellular content in platinum was determined by atomic absorption spectrometry. **B and C.** CTR1 oligomerization was determined by western blot in non-denaturing conditions (B) and by immunofluorescence (left panel: representative images; right panel: quantification of fluorescence intensity) (C) in HCT116 cells submitted to isotonic or hypotonic conditions. **D.** HCT116 cells were treated as in A with 400μM of oxaliplatin in the presence or not of copper chloride (CuCl₂). A, B and C: data are the mean or representative of two independent experiments ± s.d.. D: data are the mean of three independent experiments ± s.d.. *, p < 0.05, ns, not significant using two tailed t test.

Figure 3

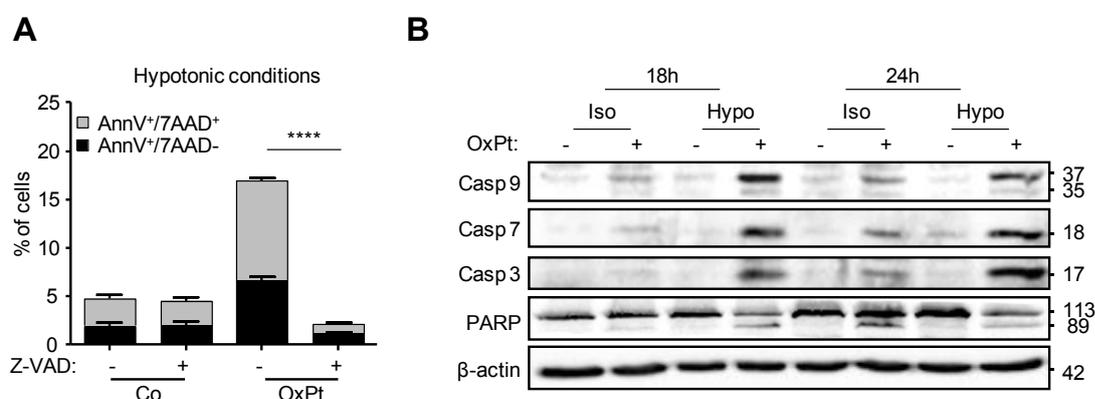


Fig. 3: Oxaliplatin induces caspase-dependent cell death in hypotonic conditions.

HCT116 cells were treated as in figure 1A. **A.** Cells were treated with or without 100 μ M of z-VAD.fmk. After 24h cells were stained with Annexin V and 7-AAD and analyzed by flow cytometry. **B.** After indicated times cells were lysed and the expression of activated caspases or PARP was analyzed by western blot. β -actin was used as a loading control. Numbers indicates molecular weights. Data are the mean or representative of three independent experiments \pm s.d.. ****, $p < 0.0001$ using two tailed t test.

Figure 4

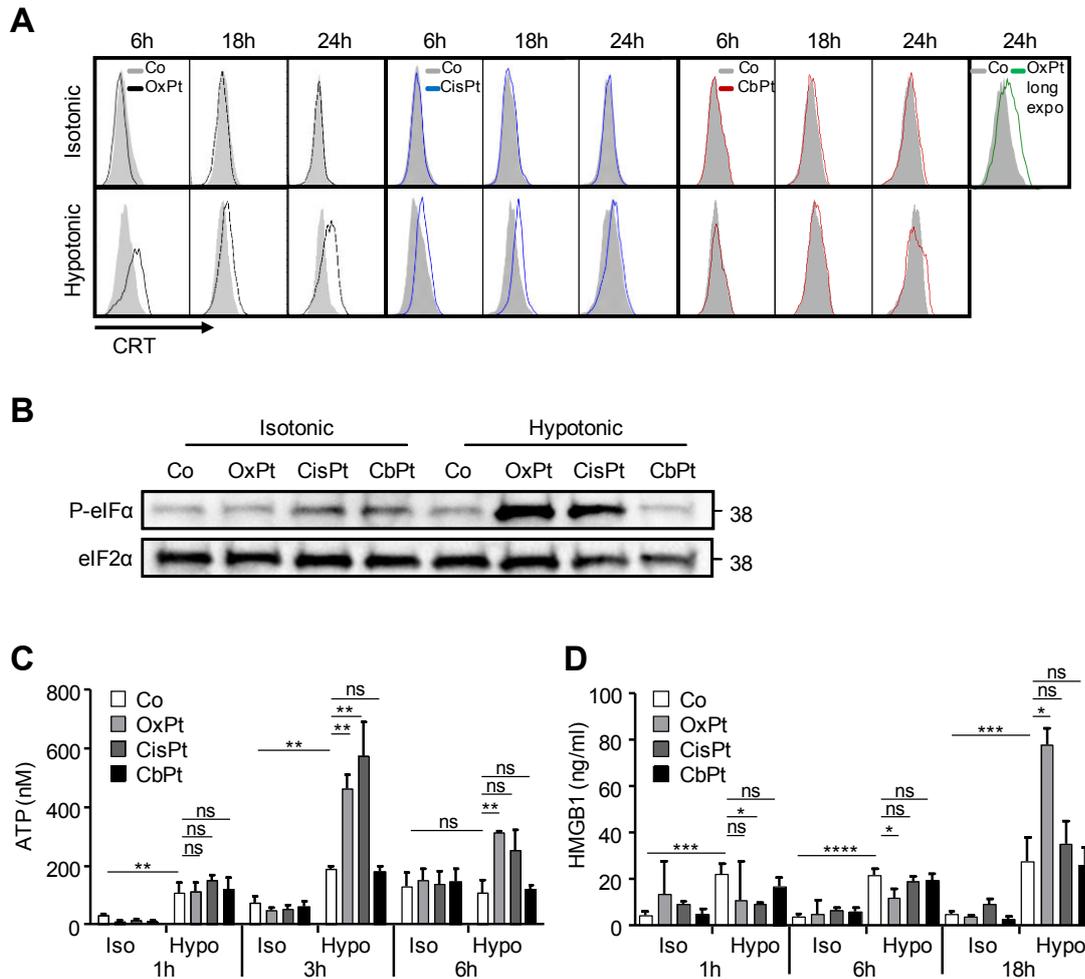


Fig. 4: Hypotonic conditions regulate platinum derivatives-mediated ICD. CT26 cells were treated for 30 min. in isotonic or hypotonic conditions with 400 μ M oxaliplatin (OxPt), 250 μ M cisplatin (CisPt) or 500 μ M carboplatin (CbPt) and ICD characteristics were analysed at indicated times after treatments. **A.** Calreticulin (CRT) expression at the cell surface was analysed by flow cytometry. A long exposure: 24h of 400 μ M of oxaliplatin was used as a positive control. **B.** eIF2 α phosphorylation was analyzed by western blot 6h after the treatments. Numbers indicates molecular weights. **C and D.** ATP (C) and HMGB1 (D) release in the supernatant were determined by bioluminescence or ELISA respectively. Data are the mean or representative of three independent experiments \pm s.d.. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$, n.s, not significant using two tailed t test.

Figure 5

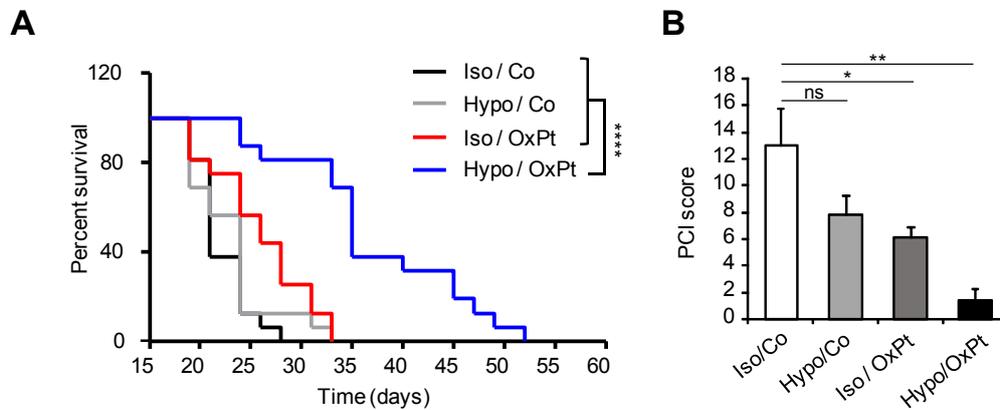


Fig. 5: Hypotonic conditions improves oxaliplatin effects in an *in vivo* peritoneal carcinomatosis model. Balb/c mice were i.p. injected with CT26 and treated with indicated conditions. **A.** Mice survival (N=16 animals per group) was represented with the Kaplan-Meier method. ****, $p < 0.0001$, using log-rank test. **B.** Peritoneal Carcinomatosis Index (PCI) was evaluated at day 20. Data are the mean \pm s.e.m. of 10 animals per group. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, n.s, not significant using two tailed t test.

Titre : Rôle de l'hypotonie dans la réponse à la chimiothérapie intra-péritonéale : étude des effets sur la mort des cellules cancéreuses et la mort immunogène induite.

Mots clés : oxaliplatine, hypotonie, chimiothérapie intrapéritonéale, cancer colorectal.

Résumé : La Chimiothérapie IntraPéritonéale (CIP) est utilisée couramment pour traiter le cancer colorectal métastatique. Cependant il n'existe pas de protocole standardisé.

Le but de ce projet a été de modéliser cette chimiothérapie *in vitro* et de comprendre le rôle de l'hypotonie dans ce modèle et son impact sur la mort des cellules cancéreuses.

Nous avons déterminé les conditions optimales de traitement sur les cellules cancéreuses coliques humaines HCT116 à savoir une exposition des cellules pendant 30 minutes à 400µM d'oxaliplatine en conditions hypotoniques (G2.5%) à 37°C. Ces résultats ont été validés sur différentes lignées cancéreuses coliques humaines et murine. Nous avons également montré que ces conditions de traitements étaient également capables d'augmenter la cytotoxicité d'autres dérivés du platine comme le cisplatine et le carboplatine.

La mort cellulaire induite par ce traitement en hypotonie est de type apoptotique, et peut s'expliquer par une augmentation de l'incorporation

intracellulaire d'oxaliplatine, en partie due à l'activation et à la trimérisation du transporteur du cuivre CTR1.

Le traitement par l'oxaliplatine et le cisplatine (mais pas par le carboplatine) en hypotonie entraîne également les stigmates de la mort immunogène, à savoir l'exposition de la calréticuline à la membrane, la libération d'ATP et le relargage d'HMGB1, suggérant que l'hypotonie permettrait d'entraîner la mort immunogène et une réponse du système immunitaire lors de cette modélisation de CIP.

Enfin, *in vivo* nous avons pu mettre en évidence que le traitement de métastases intrapéritonéales de souris Balb/c par une injection intrapéritonéale d'oxaliplatine en hypotonie permettait un ralentissement de l'apparition de nodules tumoraux et une augmentation de la survie des souris.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence dans ce travail que l'hypotonie est un des paramètres fondamentaux de la CIP et suggère que son utilisation pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la CIP et de prolonger la survie des patients.

Title : Role of hypotonia in the response to intraperitoneal chemotherapy : study of the effects on cancer cells and immunogenic cell death induced.

Keywords : oxaliplatin, hypotonia, intraperitoneal chemotherapy, colorectal cancer.

Abstract : IntraPeritoneal Chemotherapy (IPEC) is commonly used to treat colorectal cancer metastases. However there is no standardized protocol. The aim of this work was to model this chemotherapy *in vitro* and to understand the role of hypotonic conditions in this model and its impact on cell death.

We determined that the optimal treatment parameters on HCT116 human colon cancer cells, were an exposure of the cells for 30 minutes to 400µM of oxaliplatin under hypotonic conditions (G2.5%) at 37 °C. These results have been validated on various human and murine colic cancer cell lines. We have also shown that these treatment conditions are also able to increase the cytotoxicity of other platinum derivatives such as cisplatin and carboplatin.

The cell death induced by this treatment in hypotonia is apoptosis, and can be explained by an increase in the intracellular incorporation of oxaliplatin, partly due to the activation and trimerization of the CTR1

copper transporter.

Treatment with oxaliplatin and cisplatin (but not carboplatin) in hypotonia also leads to the stigmata of immunogenic death, e.i. exposure of calreticulin at the membrane, release of ATP and HMGB1 in the supernatant, suggesting that hypotonia would entail immunogenic death and an immune system response during this IPEC modeling.

Finally, we have been able to demonstrate *in vivo* that the treatment of intraperitoneal metastases of Balb/c mice by an intraperitoneal injection of oxaliplatin in hypotonia slowed down tumor nodules appearance and increased survival of the mice.

Thus, in this work we highlighted in this work that hypotonia is one of the fundamental parameters of IPEC which suggests that its use could make it possible to increase the efficacy of IPEC and maybe to prolong the survival of patients.