



HAL
open science

Nouvelles approches thérapeutiques pour le pseudomyxome péritonéal via des modèles animaux et l'utilisation d'agents anti-angiogéniques et antibiotiques

Cynthia Crocheray

► To cite this version:

Cynthia Crocheray. Nouvelles approches thérapeutiques pour le pseudomyxome péritonéal via des modèles animaux et l'utilisation d'agents anti-angiogéniques et antibiotiques. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-04039541

HAL Id: hal-04039541

<https://ephe.hal.science/hal-04039541>

Submitted on 21 Mar 2023

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

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



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE présenté par

Cynthia CROCHERAY

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**« Nouvelles approches thérapeutiques pour le pseudomyxome
péritonéal *via* des modèles animaux et l'utilisation d'agents anti-
angiogéniques et antibiotiques. »**

soutenu le 6 décembre 2022 devant le jury suivant :

Dr Diego GARCIA-WEBER – **Président du jury**

Pr Marc POCARD - **Tuteur scientifique**

Dr Flore RENAUD - **Tuteur pédagogique**

Dr Solène DOAT - **Rapporteur**

Dr Sylvain PROVOT – **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction du **Pr Marc POCARD**

Intitulé de la structure d'accueil : UMR 1275 INSERM Université de Paris CAP « Carcinose
Péritonéale et Paris Technologies »

Hôpital Lariboisière 41 bd de la chapelle 75010 Paris

Directeur: Pr Marc POCARD

Et du **Dr Flore RENAUD**

Intitulé de la structure d'accueil EPHE-PSL: UMR 9019 CNRS-Université Paris-Saclay-
EPHE « Intégrité du Génome et Cancers »

Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 VILLEJUIF

Directeur : Dr Murat SAPARBAEV

RESUME

Le pseudomyxome péritonéal (PMP), aussi appelé maladie gélatineuse du péritoine, est un cancer rare du péritoine. La tumeur primitive qui se développe dans la lumière de l'appendice serait à l'origine de ce cancer. Cette tumeur, en se développant, obstruerait l'appendice et entraînerait une accumulation de mucus, qui conduirait à la rupture de l'appendice, avec une libération de cellules tumorales et de mucus, et peut-être aussi de bactéries présentes naturellement dans l'appendice ? dans le péritoine des patients . Cette origine soulève alors l'hypothèse d'une composante bactérienne associée aux cellules tumorales. De plus, une vascularisation importante est retrouvée dans cette maladie. Ces deux composantes ont conduit notre unité à explorer l'effet des antibiotiques et des anti-angiogéniques sur le développement de la maladie, et plus précisément la combinaison de ces deux types de traitements.

Afin d'obtenir un modèle murin de pseudomyxome, nous avons effectué une greffe intrapéritonéale de prélèvement de patients dans l'abdomen de souris immunodéprimées nues (projet Apafis #34082). Trois modèles ont été obtenus : STLO et BOGH qui sont des modèles d'ascite gélatineuse issus de deux patients différents ; et STLOM qui est un modèle de PMP sous forme de masse gélatineuse solide issu du même patient que STLO. Nous avons testé différentes combinaisons d'anti-angiogéniques et d'antibiotiques : mélange de métronidazole et d'amoxicilline en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib ; mélange de Pénicilline et de Streptomycine en association avec le Bevacizumab, le Sorafenib ou l'Aflibercept. Le sang et la tumeur (et l'ascite) ont été récupérés à la fin de l'expérience pour des analyses biochimiques post-mortem. Le dosage du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) sérique et tumoral a été effectué par la méthode immuno-enzymatique ELISA et le dosage de l'Antigène carcino-embryonnaire (ACE) par électrochimiluminescence (ECLIA). Enfin, la recherche des bactéries a été réalisée par hybridation *in situ* (HIS) sur des coupes de tissus de patients inclus en paraffine à partir de sondes ciblant l'ARN 16S des bactéries, spécifiquement l'ARN 16S de *Helicobacter pylori* ou l'ARN codant pour la protéine MUC2 qui est la mucine présente en grande quantité dans les prélèvements de patients.

Le mélange métronidazole et amoxicilline en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib ont induit une diminution significative du développement de l'ascite sur le modèle STLO ($p=0,002$ et $p=0,029$ respectivement). Puis, la combinaison Pénicilline/Streptomycine en association avec l'Aflibercept ont induit une diminution significative du développement tumoral, de l'ascite et de l'angiogenèse sur les modèles de pseudomyxome STLOM et BOGH par rapport aux souris non traitées contrôles ($p<0,0001$). De plus, la concentration moyenne en ACE est 5 fois plus faible dans le sérum des souris traitées et les concentrations moyennes en VEGF sérique et tumorale sont significativement plus élevées chez les souris traitées par rapport aux souris contrôles. Dans une seconde partie de nos recherches, nous avons pu observer une importante présence bactérienne et de *H. pylori* par HIS sur des coupes de patients ayant un PMP, en association avec une importante expression de MUC2.

La combinaison d'antibiotiques et d'anti-angiogéniques semble être efficace pour inhiber la croissance du PMP *in vivo* chez la souris. Cette combinaison pourrait être utilisée en cas de chirurgie contre indiquée devant un état général altéré, une impossibilité de retirer l'ensemble de la tumeur macroscopique par chirurgie de cytoréduction ou une récurrence après une première chirurgie. Les observations des bactéries par HIS sont à confirmer par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ou séquençage à partir des prélèvements des patients, dans le but d'affiner encore le choix de l'antibiothérapie.

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier le Pr Marc POCARD, mon tuteur scientifique et directeur de l'unité INSERM U1275, qui m'a toujours encouragée à avancer dans ma carrière professionnelle et qui m'a permis de suivre cette formation. Je le remercie infiniment pour sa confiance envers moi depuis 10 ans.

Je tiens ensuite à remercier Mme Annie MUNIER, ingénieur au sein de la plateforme CISA cytométrie au centre de recherche Saint-Antoine, pour m'avoir parlé de cette formation que je ne connaissais pas et qui était la seule compatible avec ma vie de famille et une évolution professionnelle. Merci pour ta gentillesse, ton sourire et ta bonne humeur.

Puis, je remercie sincèrement tous mes collègues qui ont participé à ce projet, Amine, Imène, Elisabeth, Nawar, Pierre, et mes amies Iman et Karima qui ont toujours été présentes et qui m'ont toujours soutenues. Votre amitié est chère à mon cœur !!

Un énorme merci aussi à Rachid KACI et Aurélie CHENAL pour leur aide notamment sur la technique de *l'hybridation in situ*. Aurélie, tu es un ange, merci pour tout le temps que tu m'as accordé à regarder les lames au microscope.

Merci également à Shah, Massoud, Dalila ainsi que mes collègues des unités INSERM U1132 et U942 pour leur aide et leur gentillesse.

Je tiens à remercier également ma tutrice pédagogique, le Dr Flore RENAUD, pour son aide et son soutien tout au long de ces deux années et pour le temps passé à corriger mon mémoire.

Enfin, je remercie ma famille, mes parents, mes frères et sœurs, mon mari Lionel et mes enfants Nohlan et Maëlysa, pour leur soutien et leur amour sans faille, MERCI. Je vous aime tellement !

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	7
Table des illustrations.....	9
I/INTRODUCTION.....	12
1) Définition et physiopathologie du Pseudomyxome Péritonéal (PMP).....	12
2) Classification anatomo-pathologique du PMP.....	13
3) Traitement de choix du PMP.....	15
4) Hypervascularisation du PMP.....	18
5) Hypothèse : Des bactéries joueraient-elles un rôle dans le développement du PMP ?.....	22
II/OBJECTIFS DU PROJET.....	28
III/MATERIELS ET METHODES.....	29
1) Greffe ou injection intrapéritonéale pour le développement de différents modèles de PMP.....	29
2) Analyses des mécanismes impliqués dans l'évolution de la maladie par cytokine array et ELISA.....	30
a) Cytokine array.....	30
b) ELISA : dosage du VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.....	32
c) Dosage ACE (Antigène Carcinoembryonnaire).....	32
3) Culture primaire sans antibiotique et recherche de bactéries dans les tumeurs.....	33
4) Recherche de bactéries dans les tumeurs par ViewRNA ISH Tissue Assay.....	33
5) Analyses statistiques.....	35
IV/ RESULTATS.....	37
1) Les antibiotiques et les anti-angiogéniques sont-ils efficaces contre l'évolution du PMP?..	37

a) Evaluation de l'effet de deux anti-angiogéniques, le Bevacizumab et le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO d'ascite gélatineuse).....	39
b) Evaluation de l'effet du Bevacizumab et du Sorafenib en association avec un mélange d'antibiotiques sur l'évolution du PMP (modèle STLO d'ascite gélatineuse).....	41
c) Evaluation de l'effet de l'ATB1 et du Bevacizumab seuls ou en association sur l'évolution du PMP (modèle de « morceaux » de tumeur gélatineuse STLOM).....	44
d) Evaluation de l'effet d'un autre antibiotique, appelé ATB2 et du Sorafenib seuls ou en association sur l'évolution du PMP (modèle de « morceaux » de tumeur gélatineuse STLOM).....	48
e) Evaluation de l'effet de l'ATB2 en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib commencés plus tôt après la greffe sur l'évolution du PMP (modèle de « morceaux » de tumeur gélatineuse STLOM).....	50
f) Evaluation de l'effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle de « morceaux » de tumeur gélatineuse STLOM).....	52
g) Evaluation de l'effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle d'ascite gélatineuse BOGH).....	57
2) Quelles sont les cytokines qui ont un rôle dans le développement tumoral du PMP ?.....	61
3) Les bactéries ont-elles été identifiées après mise en culture par le service de bactériologie ou par HIS (viewRNA ISH Tissue Assay) ?.....	63
a) Identification de bactéries après mise en culture du modèle de PMP cultivé en présence ou absence d'antibiotiques.....	63
b) Identification des bactéries par HIS (ViewRNA ISH Tissue Assay).....	64
 V/ DISCUSSION/CONCLUSION.....	 74
VII/ PERSPECTIVES.....	78
 Bibliographie.....	 79
 Annexe n°1.....	 82
Annexe n°2.....	97
Annexe n°3.....	99
Annexe n°4.....	101

Annexe n°5.....105

LISTE DES ABREVIATIONS

ACE : carcinoembryonic antigen (Antigène carcinoembryonnaire)

ALAT : Alanine Amino-transférase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AP : Phosphatase alcaline

ARN : Acide RiboNucléique

ASAT : Aspartate Amino-transférase

ATB : Antibiotique

CA 125 et CA 19.9 : cancer antigène (Antigène tumoral)

CHIP : Chimiothérapie Hyperthermique Intrapéritonéale

CRC : Cancer colo-rectal

CRS : chirurgie de cytoréduction

CTRL : contrôle

DHOS : Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins

EGF : Epidermal growth factor

ECLIA : électrochimiluminescence

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

HGMCP : high-grade mucinous carcinoma peritonei ou carcinome mucineux péritonéal de haut grade

HGMCP-S : high-grade mucinous carcinoma peritonei with signet-ring cells ou carcinome mucineux péritonéal de haut grade avec cellules en bagues à chaton

HES : Hématoxyline-Eosine-Safran

HIS : Hybridation in *situ*

HRP : Horseradish Peroxydase

ICAM-1 : Molécule d'adhésion cellulaire intercellulaire-1

Il : Interleukine

INCa : Institut National du cancer

INSERM : Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale

LGMCP : low-grade mucinous carcinoma peritonei ou carcinome mucineux péritonéal de bas grade

LPS : lipopolysaccharide

M-CSF : facteur de stimulation des macrophages

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MUC : Mucine

NFS : Numération Formule Sanguine

PCI : Index de carcinose péritonéal

PCR : Polymerase chain Reaction

PDGF : Platelet-derived growth factor

PI3K : phosphatidyl inositol 3' kinase

PKB : Protein Kinase B

PlGF : Placental Growth Factor ou facteur de croissance du placenta

PMP : Pseudomyxome Péritonéal

RENAPE : Réseau National de prise en charge des Tumeurs Rares du Péritoine

PSOGI : Peritoneal Surface Oncology Group International

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TIMP-1 : Inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase matricielle 1

TNCB : Typed and Nonculturable Bacteria

TNF-alpha : Tumour Necrosis Factor alpha

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 ou récepteur 2 au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Pseudomyxome péritonéal de patient [1]

Figure 2 : Tumeur appendiculaire perforée avec extravasation de mucus [1]

Figure 3 : PMP de bas grade [2].

Figure 4 : PMP de haut grade.

Figure 5 : PMP de haut grade avec la présence de cellules en bagues à chaton.

Figure 6 : Calcul de l'index de carcinose péritonéal selon Sugarbaker (PCI).

Figure 7 : Chimiothérapie Hyperthermique IntraPéritonéale (CHIP) à ventre ouvert selon la technique « coliseum ».

Figure 8 : Analyse de Kaplan-Meier de la survie des souris nues après une greffe orthotopique d'un PMP en intrapéritonéal.

Figure 9 : Effet du Bevacizumab sur le poids des souris en fonction du temps après une chirurgie cytoréductive incomplète d'un PMP.

Figure 10 : Images représentatives de la néoangiogenèse dans le PMP après injection intra-aortique in vivo d'Isolectine B4 conjuguée à la FITC (fluorescence verte) chez des souris témoins non traitées (A, grossissement X10) ou traitées pendant 6 semaines au Bévacicumab (B, grossissement X10 ; C, grossissement X20) [3].

Figure 11 : Distribution des phylums bactériens dominants dans les tissus tumoraux et le mucus de 11 patients atteints de PMP [4].

Figure 12 : Bactéries symbiotiques du corps humain [5].

Figure 13 : Analyse de la densité bactérienne dans le mucus de patients ayant un PMP par FISH.

Figure 14 : Analyse qualitative de la localisation de la β -caténine sur des coupes de PMP.

Figure 15 : Répartition des différents anticorps de capture (A) correspondant aux cytokines (B) du kit « Mouse Cytokine Array Panel A ARY006, Bio-technie »

Figure 16 : Explication de la technologie ViewRNA ISH Tissue Assay.

Figure 17 : Schéma expérimental de la première expérience : Effet du Bevacizumab et du Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO)

Figure 18 : Graphes représentant l'effet du Bevacizumab et du Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO) greffés à des souris nues.

Figure 19 : Photo illustrative de l'ascite obtenu à la fin de l'expérience (J34) en fonction du groupe de traitement (CTRL, Bevacizumab ou Sorafenib).

Figure 20 : Schéma expérimental de la deuxième expérience : Effet de l'ATB1 (Mélange de Métronidazole et d'Amoxicilline) en association ou non avec le Bevacizumab ou le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO).

Figure 21 : Graphes représentant l'effet de l'ATB1 en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO) greffés à des souris nues.

Figure 22 : Photo illustrative de l'ascite obtenu à la fin de l'expérience (J25) en fonction du groupe de traitement (ATB1 en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib).

Figure 23 : Schéma expérimental de la troisième expérience : Effet de l'ATB1 et du Bevacizumab seuls ou en association sur l'évolution du PMP (modèle STLOM).

Figure 24 : Graphes représentant l'effet de l'ATB1 seul ou en association avec le Bevacizumab sur l'évolution du PMP (modèle STLOM) greffés à des souris nues.

Figure 25 : Photos illustratives de l'abdomen des souris contenant la tumeur et l'ascite en fonction du groupe de traitement (ATB1 seul ou en association avec le Bevacizumab).

Figure 26 : Schéma expérimental de la quatrième expérience : Effet de l'ATB2 et du Sorafenib seul ou en association sur l'évolution du PMP (modèle STLOM).

Figure 27 : Graphes représentant l'effet de l'ATB2 seul ou en association avec le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLOM) greffés à des souris nues.

Figure 28 : Schéma expérimental de la cinquième expérience : Effet de l'ATB2 en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLOM).

Figure 29 : Graphes représentant l'effet de l'ATB2 en association avec le Sorafenib ou le Bevacizumab sur l'évolution du PMP (modèle STLOM) greffés à des souris nues.

Figure 30 : Schéma expérimental de la sixième expérience : Effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle STLOM).

Figure 31 : Graphes représentant l'effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle STLOM) greffés à des souris nues.

Figure 32 : Nuages de points représentant les corrélations entre la concentration en ACE sérique (A), en VEGF sérique (B) ou tumoral (C) et le poids de la tumeur des souris CTRL et traitées par l'Aflibercept et l'ATB2 (Test Spearman).

Figure 33 : Schéma expérimental de la septième expérience : Effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle BOGH).

Figure 34 : Graphes représentant l'effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle BOGH) greffés à des souris nues.

Figure 35 : Nuages de points représentant les corrélations entre la concentration en ACE sérique (A), en VEGF sérique (B) ou tumoral (C) et le volume de l'ascite des souris CTRL et traitées par l'Aflibercept et l'ATB2 (Test Spearman).

Figure 36 : Graphiques représentant les cytokines qui sont exprimées dans les mélanges d'échantillons de sérum ou de tumeur/ascite des deux dernières expériences.

Figure 37 : Photos représentatives d'une amygdale avec présence de bactéries détectées par la coloration Brown - Brenn (B) ou par ViewRNA HIS Tissue Array avec la sonde RNA 16S qui ciblent toutes les bactéries (C) ; contrôle négatif (A) Objectif X40

Figure 38 : Photos représentatives d'une amygdale avec présence de bactéries détectées par la coloration Brown - Brenn (A) ou par ViewRNA HIS Tissue Array avec la sonde RNA 16S qui ciblent toutes les bactéries (B) Objectif X40

Figure 39 : Photos représentatives d'une coupe de PMP de haut grade avec présence de bactéries détectées par ViewRNA HIS Tissue Array avec la sonde RNA 16S qui ciblent toutes les bactéries (Objectif X40).

Figure 40 : Photos représentatives d'une coupe de patients ayant un PMP de haut grade (A) ou de bas grade (B) avec présence de MUC2 et de bactéries détectées par ViewRNA HIS Tissue Array avec les sondes MUC2 et RNA 16S qui ciblent toutes les bactéries respectivement (A : Objectif X40 ; B : Objectif X20).

Figure 41 : Photos représentatives d'une coupe de patients ayant un PMP de haut grade avec présence de MUC2 et de Helicobacter pylori détectée par ViewRNA HIS Tissue Array avec les sondes MUC2 et RNA 16S qui ciblent seulement H. pylori respectivement (Objectif X40).

I/ INTRODUCTION

1) Définition et physiopathologie du PMP

Le Pseudomyxome Péritonéale (PMP) est un cancer rare du péritoine appelé également maladie gélatineuse du péritoine développant une carcinose mucineuse (Figure 1).

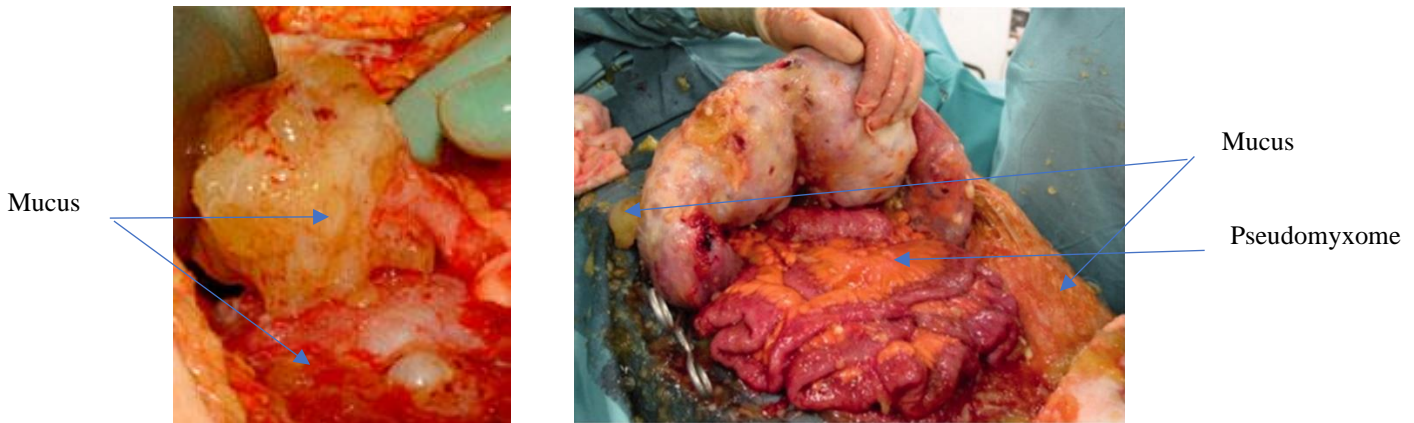


Figure 1 : Pseudomyxome péritonéal de patient [1]

Son incidence est estimée à 3,2 cas/an/1 000 000 d'habitants [6] et il touche 3 fois plus les femmes que les hommes [7]. L'origine est appendiculaire dans au moins 90% des cas : la physiopathologie du PMP fait suite à la présence d'un adénome se développant progressivement dans la lumière appendiculaire, sa croissance aboutissant à l'occlusion de la partie proximale de cette lumière. Celle-ci va conduire à la distension progressive de la partie distale de l'appendice liée à l'accumulation de mucus non seulement produit par l'épithélium normal mais également par l'adénome. La paroi appendiculaire va finir par se rompre : le mucus et les cellules tumorales seront alors libérés dans le péritoine (Figure 2). Le mucus est composé de deux apomucines spécifiques qui ont la propriété physicochimique d'un état de gel : MUC2 et MUC5AC [7]. Les auteurs ont montré que dans le cas du PMP, MUC2 remplace MUC5AC ; De ce fait, MUC2 peut être un marqueur de la maladie.

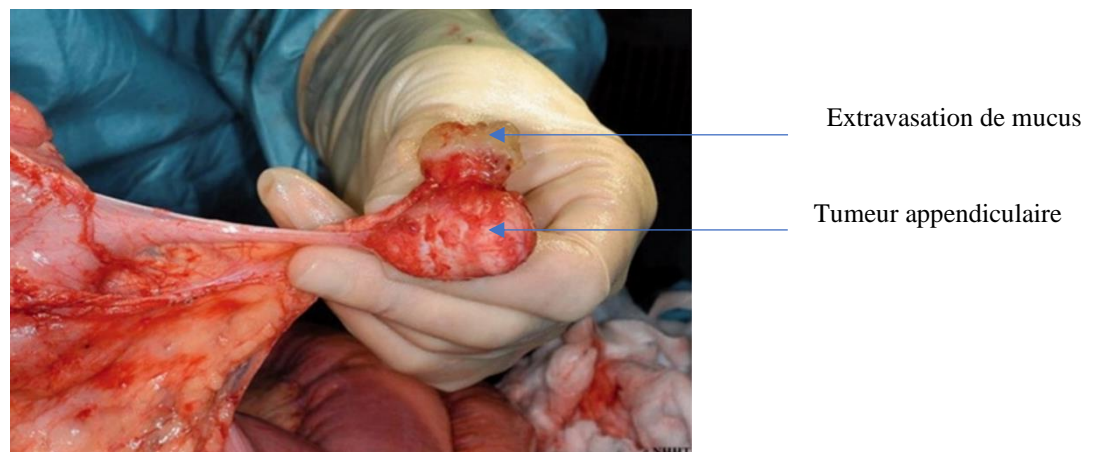


Figure 2 : Tumeur appendiculaire perforée avec extravasation de mucus [1]

Les autres causes de PMP peuvent être une tumeur ovarienne, du col de l'utérus ou encore un adénome colique ou pancréatique.

L'âge au moment du diagnostic varie de 20 à 80 ans. Plus la maladie est détectée jeune, plus ce sera un mauvais facteur pronostique (www.renape-online.fr et www.snfge.org). Certains patients atteints de tumeur mucineuse de l'appendice restent asymptomatiques jusqu'à ressentir une douleur ou une distension abdominale progressive, des symptômes obstructifs, une perte de poids ou une hernie liée au PMP (www.snfge.org). Le diagnostic, souvent porté tardivement, est suspecté sur les examens d'imagerie (scanner, IRM), sur une élévation des marqueurs tumoraux sériques (ACE, CA 125 et CA 19.9) et sur la présence de mucine dans la cavité péritonéale confirmée par l'analyse histologique des prélèvements péritonéaux. Enfin, Shetty, S. et al., en 2013, ont détecté des mutations *KRAS* dans 57,8% des cas, tous grades confondus [8]. Plus précisément, 89% des mutations ont été observées dans le codon 12 et les auteurs nous informent que cette mutation pourrait être liée à la production de mucine mais que ce n'est pas un facteur pronostic pour la survie des patients. Cependant, la surexpression de p53 mutée corrélée à un PMP de haut grade et au sexe féminin serait responsable d'une diminution significative de la survie des patients.

La mortalité des patients résulte d'une propagation de la mucine qui augmente et envahit le péritoine ; ce qui conduit à une obstruction mécanique des organes abdominaux, des compartiments thoraciques et vasculaires [7]. La survenue d'un processus métastatique est plus rare, souvent spécifique des formes de haut grade et touche alors le foie, les poumons et le cerveau.

2) Classification anatomo-pathologique du PMP

Le PMP appartient au groupe des maladies rares du péritoine, pour lequel, l'Institut National du cancer (INCa) et la Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins (DHOS) ont mis en place un réseau de prise en charge des patients, RENAPE (Réseau National de prise en charge des Tumeurs Rares du Péritoine). Ce réseau regroupe 35 centres experts, de compétences et structures spécialisées. Ce réseau a permis de constituer un registre des tumeurs rares du péritoine, rétrospectif et prospectif des données cliniques, biologiques, et anatomopathologiques en collaboration avec le groupe MESOPATH (réseau regroupant les pathologistes spécialisés dans le mésothéliome) et RENAPATH (regroupe les anatomopathologistes référents des centres rattachés au réseau RENAPE). Une telle organisation permet d'orienter les patients vers des équipes spécialisées pour une prise en charge thérapeutique optimale.

La classification histologique a pendant de nombreuses années été controversée. En 2012, un congrès international s'est tenu à Berlin par les experts du PSOGI (Peritoneal Surface Oncology Group International) afin d'établir un consensus pour la classification pathologique des grades du PMP [9]. Ainsi, il a été défini trois principaux grades (<https://www.snfge.org>):

- LGMCP (low-grade mucinous carcinoma peritonei) ou carcinome mucineux péritonéal de bas grade qui correspond à des dépôts mucineux avec des cellules tumorales de faible densité (<20%), des atypies de bas grade sans invasion infiltrative ni destructrice (Figure 3).

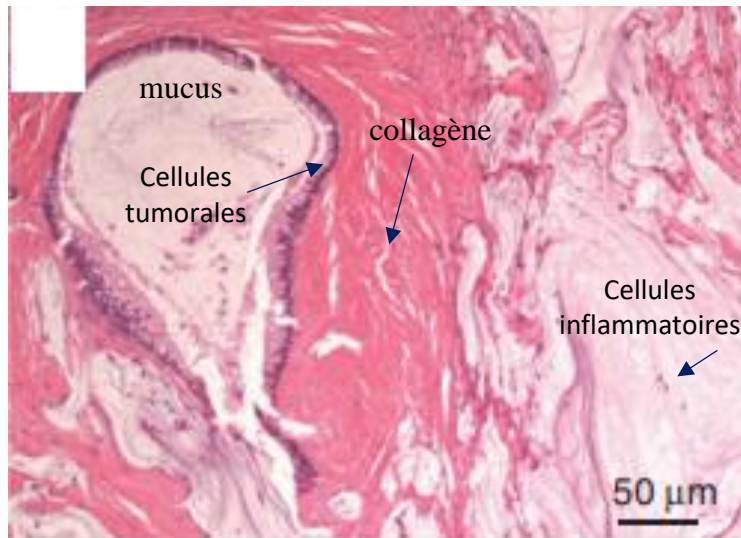


Figure 3 : PMP de bas grade [2]. La coupe de tissu a été colorée à l'hématoxyline - éosine et montre des bandes de cellules tumorales sans mitose autour du mucus, la présence abondante de mucus et de collagène mais aussi des cellules inflammatoires dispersées.

- HGMCP (high-grade mucinous carcinoma peritonei) ou carcinome mucineux péritonéal de haut grade qui correspond à des dépôts mucineux avec des cellules tumorales de densité plus importante (>20%), des atypies de haut grade avec ou sans invasion infiltrative ni destructrice notamment dans les ganglions lymphatiques (Figure 4).

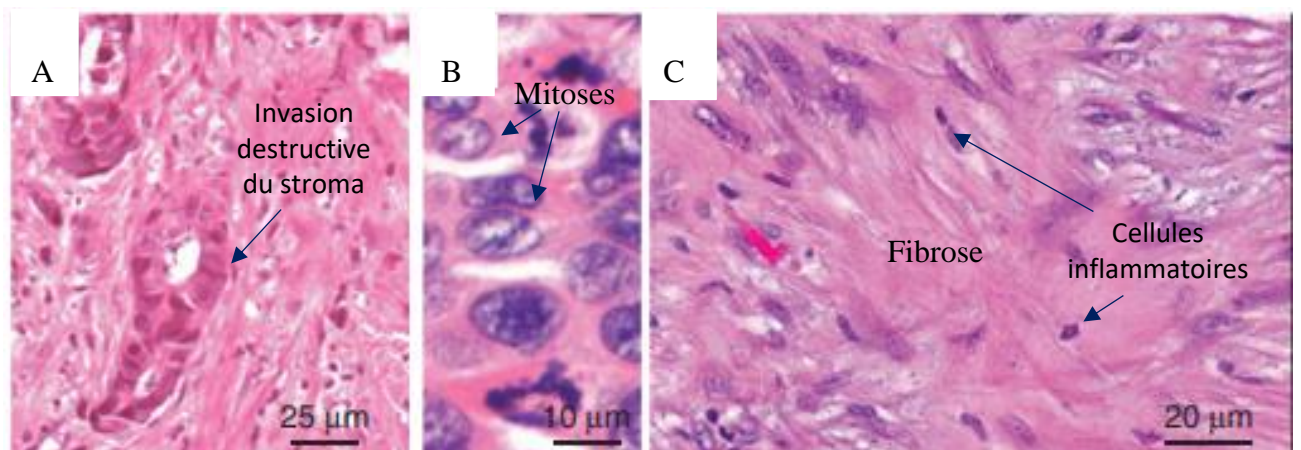


Figure 4 : PMP de haut grade. La coupe de tissu a été colorée à l'hématoxyline-éosine et montre une invasion destructive du stroma (A), des atypies cytologiques de haut grade avec des mitoses (B) et des cellules inflammatoires infiltrées dans le stroma avec présence de fibrose (C) [2].

- HGMCP-S ou carcinome mucineux péritonéal de haut grade avec cellules en bagues à chaton qui correspond aux mêmes caractéristiques que le HGMCP avec la présence de

bagues en chaton (signet ring cells), dont leur présence représente un facteur pronostique péjoratif (Figure 5).

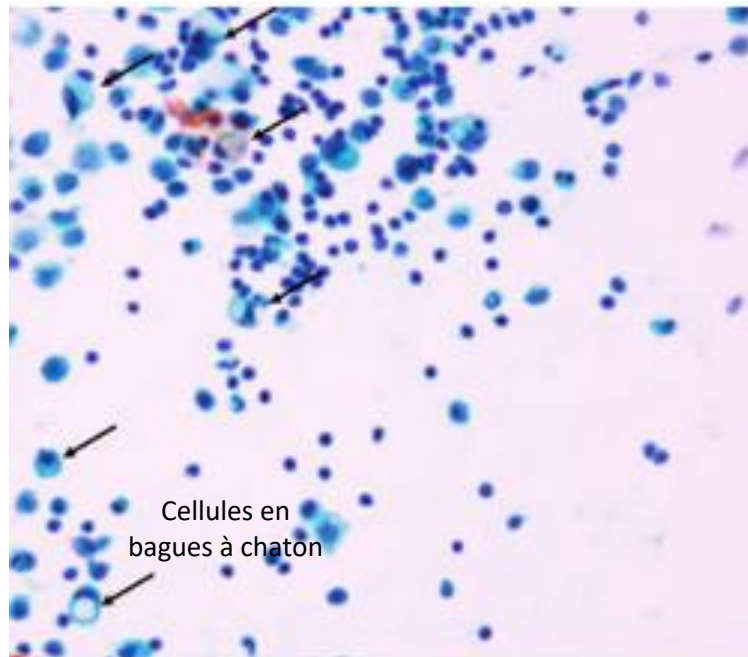


Figure 5 : PMP de haut grade avec la présence de cellules en bagues à chaton. La coupe de tissu a été colorée par la coloration de Papanicolaou qui permet de réaliser l'étude morphologique des cellules. Les cellules en bagues à chaton sont caractérisées par la présence d'une vacuole de mucus intracytoplasmique et d'un noyau concentré localement en périphérie. Elles sont responsables notamment du pronostic péjoratif des patients [10].

L'aspect morphologique et l'étendue de la maladie sont des facteurs pronostiques du PMP d'origine appendiculaire conditionnant la stratégie thérapeutique.

3) Traitement de choix du PMP

La réponse à la chimiothérapie systémique est limitée. Le seul traitement de choix associé à une meilleure survie des patients est une chirurgie de cytoréduction (CRS) suivie d'une chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale (CHIP) (Figure 7) [11] (<http://peritoneum-paris.fr> et « *Traitement chirurgical à visée curative des carcinoses péritonéales* » écrit par le Dr Amandine PINTO et le Pr Diane GOERE en 2021).

Le concept du traitement curatif du pseudomyxome péritonéale est de traiter la maladie visible (macroscopique) par la chirurgie, puis la maladie résiduelle invisible (microscopique) par un bain de CHIP. Avant le début de la chirurgie, une sonde gastrique et un sondage urinaire sont mis en place de manière systématique. L'intervention se déroule toujours par laparotomie (c'est-à-dire « à ventre ouvert ») et l'incision est de grande taille, située sur la ligne médiane, partant de la pointe du sternum jusqu'au pubis.

Lors de l'exploration chirurgicale, le chirurgien quantifie l'étendue de la carcinose péritonéale selon un score ou index de carcinose péritonéal de Sugarbaker (PCI) variant de 0 à 39 (13 régions se voient attribuer une note comprise entre 0 et 3) (Figure 6).

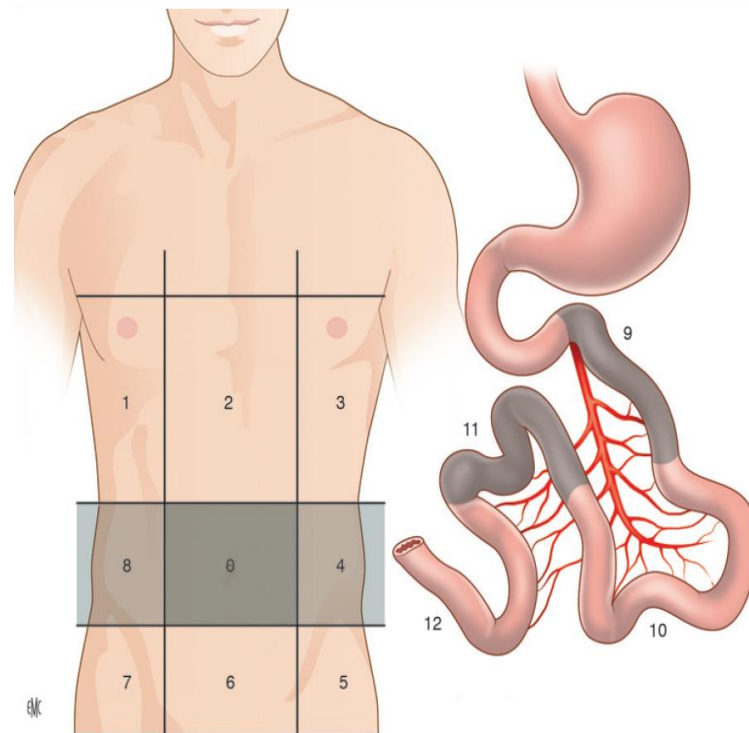


Figure 6 : Calcul de l'index de carcinose péritonéal selon Sugarbaker (PCI). Un score est attribué à chacune des 13 régions en fonction de la taille des nodules péritonéaux : 0 si absence de tumeur ; 1 si nodule tumoral inférieur à 0,5 cm ; 2 si taille comprise entre 0,5 et 5 cm ; et 3 si taille supérieure à 5 cm ou atteinte de la totalité (« Traitement chirurgical à visée curative des carcinoses péritonéales » écrit par le Dr Amandine PINTO et le Pr Diane GOERE en 2021).

C'est seulement après cette étape qu'il est décidé si oui ou non l'intervention chirurgicale peut être réalisée. Une fois qu'il a fait le bilan de cette dernière, il débute l'ablation de la maladie macroscopique et des organes atteints par le PMP et réalise des péritonectomies pour ôter les parties de péritoines touchées.

Si le tube digestif est atteint, des résections d'estomac, de côlon, d'intestin grêle ou de rectum peuvent être nécessaires. Dans ce cas-là, le chirurgien est amené à réaliser une résection suivie d'une anastomose (remise en continuité). Si plusieurs gestes de ce type sont effectués, il peut alors confectionner une iléostomie provisoire (poche provisoire pour le recueil des selles sur l'abdomen). La dérivation des selles va ainsi protéger les sutures en aval.

La cytoréduction chirurgicale complète est indispensable avant de réaliser la CHIP car le bain de chimiothérapie ne peut traiter qu'une maladie résiduelle infra-millimétrique ou millimétrique (nodule inférieur à 2 mm). Par conséquent, si lors de la chirurgie, le chirurgien constate qu'il ne peut pas retirer toute la maladie macroscopique, la CHIP ne sera pas réalisée. C'est donc seulement au cours de l'intervention que le chirurgien voit s'il peut ou non retirer toute la maladie visible, puis réaliser la CHIP.

La CHIP associe les effets d'une chimiothérapie locale, permettant d'utiliser des concentrations au moins 25 fois supérieures à celles atteintes en systémique, à ceux de l'hyperthermie. Cette dernière, comprise entre 42 et 43°C permet l'augmentation de la pénétration des produits dans les tissus et potentialise la cytotoxicité de la chimiothérapie. Cette synergie est notamment démontrée pour le cisplatine, l'oxaliplatine et la mitomycine C. Elle doit être réalisée immédiatement après la chirurgie, avant que les cellules tumorales résiduelles ne soient piégées dans les adhérences postopératoires, réalisant ainsi un véritable sanctuaire pour ces cellules. La CHIP à ventre ouvert permet de baigner la totalité des surfaces de l'abdomen et dure entre 30 et 90 minutes (Figure 7). Elle peut également être effectuée à ventre fermé, cela dépend des chirurgiens et des sites opératoires. À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus international quant à la technique de réalisation de la CHIP. Aucune technique d'administration de CHIP n'a fait preuve de sa supériorité sur une autre en termes de survie, de morbi-mortalité ou de sécurité au bloc opératoire et le consensus international d'experts n'a pas été en mesure d'émettre de recommandations sur ce point.



Figure 7 : Chimiothérapie Hyperthermique IntraPéritonéale (CHIP) à ventre ouvert selon la technique « coliseum ». La peau est mise en traction vers le haut afin de créer un réservoir dans lequel les tubulures sont stratégiquement positionnées pour permettre l'instillation et la recirculation du bain de CHIP. Quatre tubulures sont nécessaires : deux tubulures d'entrée (une dans l'hypochondre droit et la deuxième reste en main de l'opérateur) et deux tubulures de sorties (une dans le pelvis et l'autre dans l'hypochondre gauche). La cavité péritonéale est ensuite remplie du perfusât de CHIP déjà réchauffé et le chronomètre est lancé une fois la température cible atteinte.

Le taux de survie à 3-, 5- et 10 ans est de 77,8%, 79,5% and 55,9% respectivement malgré ce traitement agressif [1, 7]. Malheureusement pour les patients ayant un PMP de haut grade, malgré le traitement adéquate, le pronostic reste non favorable car la maladie évolue très rapidement, avec une médiane de survie entre 24 mois et 5 ans de 14% [11].

Cependant, les taux de mortalité et de morbidité péri opératoires sont importants car c'est un traitement très lourd pour les patients (12% et 30% respectivement) [7] [12]. Du fait de la santé de certains patients, âgés et atteints de comorbidités, la chirurgie ne peut pas toujours être pratiquée, de la même façon que si le PMP est trop étendu. En effet, le temps opératoire total pour une CRS complète et une CHIP est d'environ 10 heures [1].

Il y a aussi des effets secondaires importants comme des fistules anastomotiques qui peuvent survenir entre le 4-5^{ème} jour post-chirurgie, des saignements, une occlusion intestinale, ou une infection. Il peut également y avoir des risques inhérents à la chimiothérapie comme une insuffisance rénale transitoire (lié au cisplatine) ou une hémorragie retardée (lié à l'oxaliplatine). Les risques généraux comme une phlébite ou une embolie pulmonaire sont plus rares en raison de la prévention systématique qui est réalisée par un traitement anticoagulant préventif et l'utilisation de contentions veineuses (bas de contention).

Près de la moitié des cas de PMP ne peuvent pas être guéris par CRS-CHIP, et ces patients n'ont aucune option de traitement efficace.

C'est pour cela que nous sommes à la recherche de nouvelles approches thérapeutiques, afin de pouvoir traiter les patients qui ne peuvent recevoir le traitement de choix décrit précédemment (CRS + CHIP). De plus, la rareté du PMP chez l'homme rend difficile l'évaluation des caractéristiques biologiques de la maladie et des nouvelles stratégies thérapeutiques.

4) Hypervascularisation du PMP

L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Le facteur soluble principal qui induit l'angiogenèse est le Vascular Endothelial Growth Factor ou VEGF.

C'est un processus physiologique normal, que l'on retrouve notamment lors du développement embryonnaire ; mais il peut être pathologique, étant primordial dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases.

Les activités du VEGF ne se limitent pas au système vasculaire ; Le VEGF joue un rôle dans les fonctions physiologiques normales telles que la formation osseuse, l'hématopoïèse, la cicatrisation et le développement [13].

Le VEGF va se lier avec un autre VEGF pour former un dimère, qui va se lier à un des deux récepteurs tyrosine kinase : VEGFR1 (Flt-1) ou VEGFR2 (KDR/Flk-1). Ces derniers vont former une homodimérisation et cela va induire une activation des récepteurs par autophosphorylation. Cette activation va conduire à l'activation des voies de signalisation comme la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ou encore la voie PI3K (phosphatidyl inositol 3' kinase) /PKB (Protein Kinase B) nécessaire à l'angiogenèse comme la perméabilité vasculaire, la migration, la prolifération et la survie des cellules endothéliales [13]. L'expression du *VEGF* est induite par hypoxie ou par certaines cytokines comme les Interleukines (Il-1, l'Il-6 et l'Il-8), le TGF- β (Transforming Growth Factor β) ou encore le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) ou par certains facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) [14].

Il a été montré que le pseudomyxome est un tissu très vascularisé avec une importante positivité des marqueurs de cellules endothéliales CD31 et CD105 détectés par immunohistochimie sur des prélèvements de patients [15]. De plus, dans notre laboratoire, le

Dr Anthony Dohan a mis en évidence la présence de vaisseaux qui montrent une angiogenèse tumorale par la mesure de l'artère mésentérique supérieure par échographie doppler d'un flux sanguin qui irrigue le pseudomyxome dans un modèle murin [3]. La présence de ces vaisseaux a conduit l'unité à explorer l'effet d'anti-angiogéniques sur l'évolution du PMP. Le laboratoire a démontré qu'un traitement anti-angiogénique (Bevacizumab) pouvait prolonger la survie chez la souris nude porteuse d'un PMP (Figure 8). C'est un anticorps anti-VEGF. En se liant au VEGF, il inhibe l'angiogenèse et l'évolution tumorale.

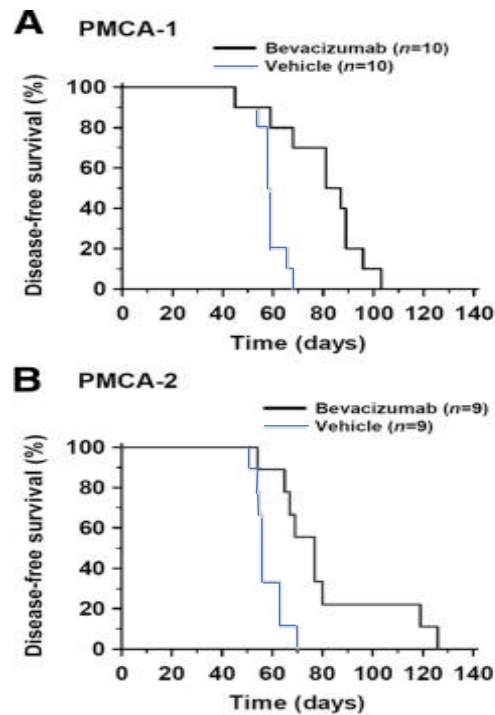


Figure 8 : Analyse de Kaplan-Meier de la survie des souris nudes traitées par le Bevacizumab après une greffe orthotopique d'un PMP en intrapéritonéal. Deux modèles de PMP de haut grade ont été testés : PMCA-1 (A) et PMCA-2 (B). Les animaux ont reçu une injection deux fois par semaine de Bevacizumab (5mg/kg) ou du véhicule (souris témoins) et ont été mis à mort dès l'atteinte de 40g. Les souris traitées par le Bevacizumab avaient un temps de survie significativement plus long que les souris des groupes témoins des deux modèles (P < 0,001) [3].

Le laboratoire a également démontré qu'en cas de résection incomplète du PMP, c'est-à-dire qu'il reste encore du tissu tumoral dans le péritoine des souris, le Bevacizumab diminue la croissance de la tumeur (Figure 9).

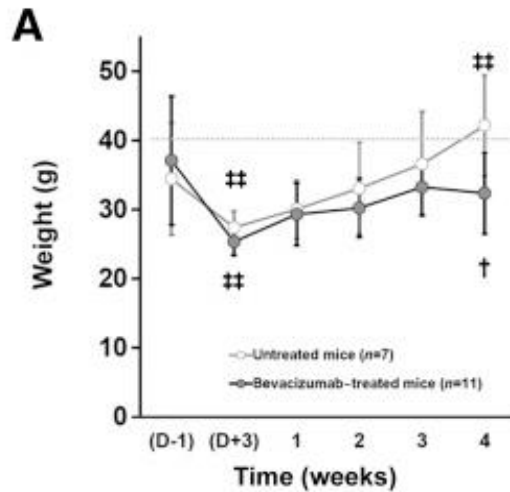


Figure 9 : Effet du Bevacizumab sur le poids des souris en fonction du temps après une chirurgie cytoréductrice incomplète d'un PMP. La chirurgie de cytoréduction (incomplète) a été réalisée lorsque le poids des souris avait atteint 35g puis les animaux ont reçu une injection deux fois par semaine de Bevacizumab ou du véhicule pendant 4 semaines. Les souris ont perdu un peu de poids suite à la chirurgie mais au bout de 4 semaines, le poids des animaux non traités est significativement supérieur à celui des animaux traités par le Bevacizumab qui montre un ralentissement du développement tumoral [3].

Enfin, le laboratoire a montré dans un modèle *in vivo* après 6 semaines de traitement par le Bevacizumab que les vaisseaux tumoraux étaient normalisés, droits et organisés alors que dans le groupe de souris contrôle, les vaisseaux étaient plus nombreux, irréguliers et tortueux (Figure 10).

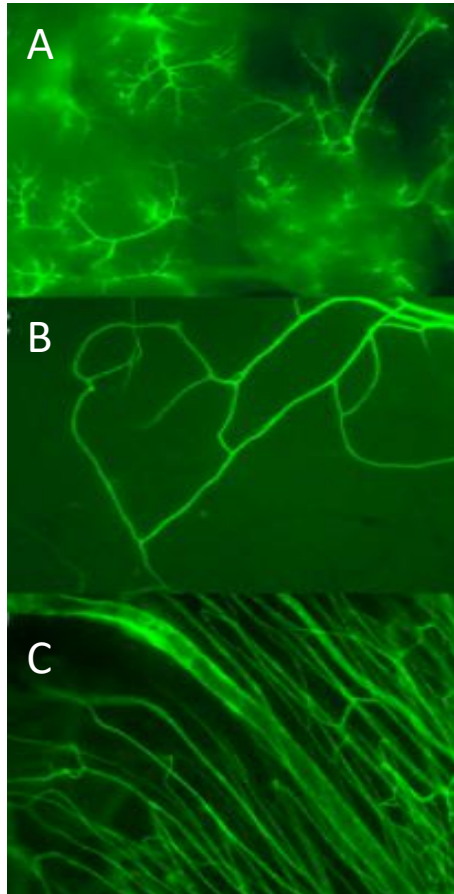


Figure 10 : Images représentatives de la néoangiogenèse dans le PMP après injection intra-aortique in vivo d'Isolectine B4 conjuguée à la FITC (fluorescence verte) chez des souris témoins non traitées (A, grossissement X10) ou traitées pendant 6 semaines au Bévacicumab (B, grossissement X10 ; C, grossissement X20) [3].

En raison de ces résultats, les chirurgiens ont proposé aux oncologues de donner aux patients atteints de PMP, et qui ne pouvaient pas avoir une chirurgie de cytoréduction complète, le traitement par Bevacizumab. Cependant, il s'est avéré qu'il y avait des effets secondaires importants comme la perforation spontanée de l'intestin grêle ou encore plus souvent la difficulté de cicatrisation des plaies, avec la réouverture d'anciennes cicatrices abdominales et l'écoulement de gélatine au travers de ces cicatrices. Le traitement par cet agent anti-angiogénique a alors dû être interrompu. Il existe 4 autres agents anti-angiogéniques intéressants utilisés pour la plupart en association avec des chimiothérapies cytotoxiques dans le cancer colique [16] :

- le Sorafenib : inhibiteur de protéines tyrosine kinases, utilisé dans le traitement du carcinome hépatocellulaire
- le Ramucirumab : inhibiteur spécifique du VEGFR2 (récepteur du VEGF de type 2)
- le Regorafenib : inhibiteur de tyrosine kinases
- l'Aflibercept : protéine de fusion recombinante composée des fragments des domaines extracellulaires des récepteurs de type 1 et 2 du VEGF humain fusionnés au fragment

Fc de l'IgG1 humaine. Cette protéine agit comme un leurre avec une plus grande affinité que les récepteurs naturels pour le VEGF et le PlGF.

Les profils de tolérance à ces médicaments pouvant être différents, il nous a semblé intéressant de tester ces autres anti-angiogéniques sur des modèles murins de PMP afin d'évaluer l'efficacité possible de ces traitements sur l'évolution du PMP.

5) Hypothèse : Des bactéries joueraient-elles un rôle dans le développement du PMP ?

De façon associée, l'origine du PMP par perforation de l'appendice soulève l'hypothèse d'une composante bactérienne associée aux cellules tumorales. Plus précisément, il y aurait un déversement du microbiote intestinal dans la cavité péritonéale, environnement normalement stérile et fermé. De ce fait, on peut s'interroger sur le fait que ces bactéries pourraient affecter la prolifération tumorale [11].

Le microbiote intestinal est propre à chaque individu : il est unique sur le plan qualitatif et quantitatif. Pendant les premières années de vie, la composition du microbiote intestinal va évoluer qualitativement et quantitativement, sous l'influence de la diversification alimentaire, de la génétique, du niveau d'hygiène, des traitements médicaux reçus et de l'environnement (notamment les pesticides). Cette composition reste ensuite assez stable, même si cette stabilité semble variable d'une personne à l'autre.

La fluctuation des hormones sexuelles – testostérone et œstrogènes – pourra malgré tout avoir un impact sur la composition du microbiote intestinal, tout comme certains événements : des maladies, des traitements médicaux, des modifications de l'hygiène de vie ou de l'alimentation peuvent en effet modifier le microbiote de façon plus ou moins durable. Par exemple, un traitement antibiotique réduit la qualité et la quantité du microbiote sur plusieurs jours à plusieurs semaines (www.inserm.fr). L'inverse est également vrai : La réduction de la diversité du microbiome intestinal résultant de la dysbiose peut diminuer l'activité de la β -glucuronidase qui entraîne une diminution de la déconjugaison des œstrogènes et des phytoœstrogènes dans leurs formes circulantes et actives. La diminution subséquente des œstrogènes circulants modifie les activations des récepteurs des œstrogènes qui peuvent conduire aux pathologies hypoœstrogènes comme l'obésité et les maladies cardiovasculaires. Les pathologies hyperœstrogènes peuvent également être entraînées par l'abondance accrue de bactéries productrices de β -glucuronidase, ce qui conduit à des niveaux élevés d'œstrogènes circulants pouvant conduire à des maladies telles que l'endométriose et le cancer [17].

Le rôle des bactéries dans la carcinogenèse est connu : La bactérie la plus connue est *Helicobacter pylori*, qui est fortement associée à l'adénocarcinome gastrique en cas d'infections chroniques. Partant de l'hypothèse qu'il y aurait un déversement du microbiote intestinal (bactéries de l'appendice rompue) et le probable rôle de certaines bactéries dans la carcinogenèse, il est raisonnable de se poser la question de leur contribution à la progression du pseudomyxome [11].

Des chercheurs ont identifié la présence de bactéries dans des prélèvements de patients qui ont un PMP de bas grade (6 patients) ou de haut grade (10 patients) par Hybridation *in situ* (HIS) en utilisant des sondes spécifiques qui vont s'hybrider à l'ARNr 16S, séquences conservées de 19973 types de bactéries non cultivables (TNCB), l'ARNr 16S d' *Helicobacter pylori* ou encore l'ARN codant pour la protéine MUC 2 ou MUC5AC [7]. Les auteurs ont identifié la densité bactérienne et l'expression de MUC2 comme étant significativement plus élevées dans les prélèvements de PMP de haut grade. De plus, MUC2 était exprimé dans l'épithélium dysplasique et associé aux cellules inflammatoires : MUC2 serait alors significativement corrélé à la densité bactérienne et donc à l'agressivité de la maladie [7]. Enfin, une autre étude a montré que les bactéries avaient la capacité d'induire la surexpression de MUC2 et de MUC5AC, plus précisément par le LPS (lipopolysaccharide) [18].

Plus précisément, Gilbreath, J et al. en 2013 ont mis en évidence les différents phylums de bactéries présents dans les prélèvements de 11 patients de PMP. Ils ont identifié comme phylum dominant les Protéobactéries, que ce soit dans les tissus tumoraux ou dans le mucus (Figure 11) [4]. Ces bactéries sont généralement anaérobies et gram -. Elles regroupent notamment les souches *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia* ou encore *Legionella*.

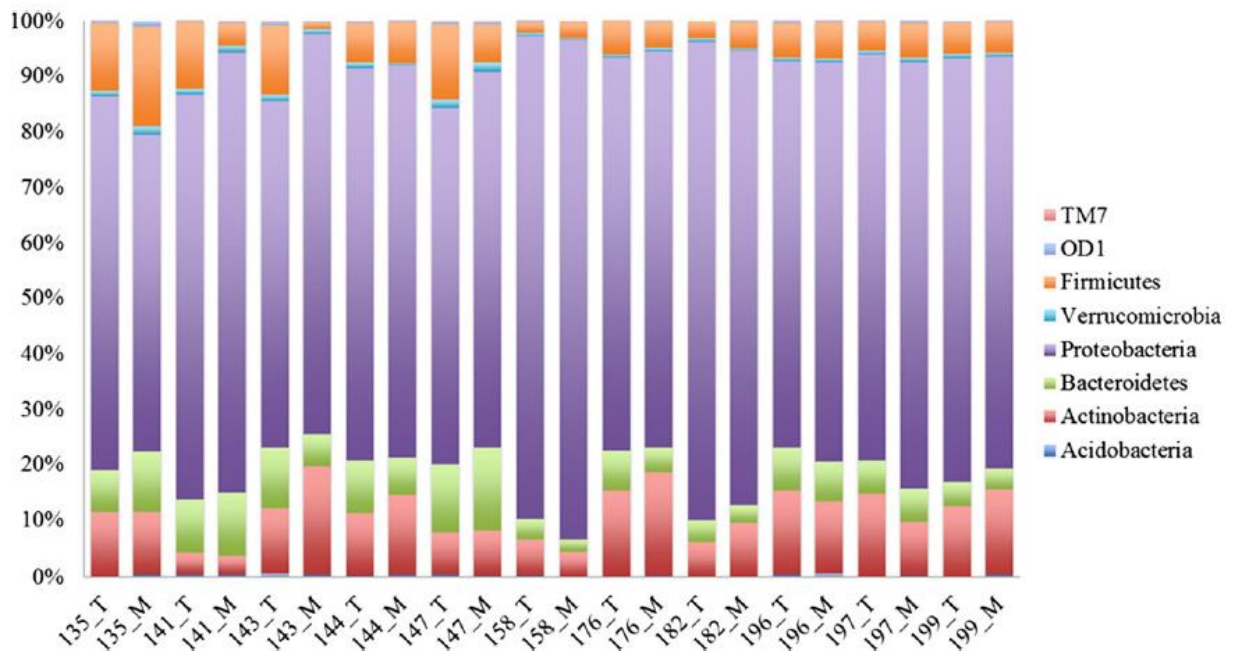


Figure 11 : Distribution des phylums bactériens dominants dans les tissus tumoraux et le mucus de 11 patients atteints de PMP [4].

Cependant, dans le côlon, les phylums les plus représentés sont les Firmicutes (Gram +) et les Bactéroidetes (Gram -) (Figure 12), qui constituent plus de 90% de la population totale des bactéries, que l'on retrouve de façon minoritaire dans les prélèvements de PMP. Il y a donc une dysbiose, c'est-à-dire un déséquilibre du microbiote intestinal. Dans la littérature, il a été montré qu'un déséquilibre entre les Firmicutes et les Bactéroidetes pourrait induire une diminution de l'intégrité de la barrière épithéliale de l'intestin, une diminution des jonctions cellules-cellules et une augmentation de la perméabilité qui permettrait des translocations bactériennes [17]. Aussi, dans une étude chez les sujets souffrant d'un cancer colorectal [19], les auteurs ont établi une carte de la dysbiose associée au cancer colorectal en s'intéressant aux espèces bactériennes

colonisant les tumeurs *versus* celles retrouvées dans les zones de muqueuses saines adjacentes. Ils ont ainsi montré que les zones du côlon touchées par les tumeurs présentaient moins de Firmicutes et plus de Bactéroidetes que les zones saines et représentaient une niche pour les Actinobacteries. Il a également été montré l'implication de toxines bactériennes dans la survenue du cancer colorectal. Par exemple, la génotoxicité de souches d'*Escherichia coli* produisant la colibactine, une toxine capable d'induire des cassures double-brin de l'ADN et une instabilité génétique au sein de cellules épithéliales intestinales en culture a été largement démontrée. La colibactine a été montrée comme promotrice de tumeurs colorectales [19].

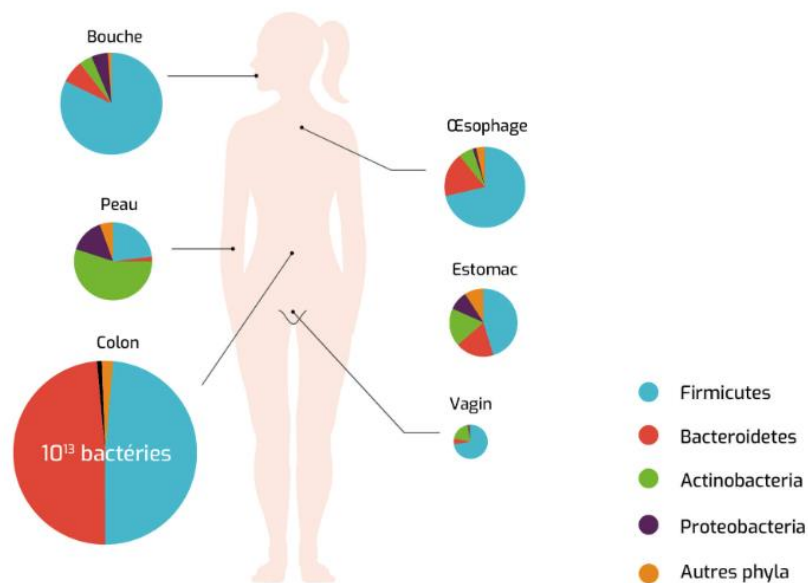


Figure 12 : Bactéries symbiotiques du corps humain [5].

Nous pouvons émettre l'hypothèse que la flore bactérienne des femmes soit composée d'une proportion plus importante de Protéobactéries par rapport aux hommes, notamment lié aux oestrogènes, ce qui expliquerait que l'incidence du PMP soit 3 fois plus importante chez les femmes.

Semino Mora et al. dans son article de 2013 et Scott Merrell en 2018 ont identifié un possible effet d'un traitement antibiotique contre *H. Pylori* [2] [20]. Il s'agit d'une trithérapie composée de 30mg de lansoprazole, 1g d'amoxicilline et 500mg de clarithromycine 2 fois par jour pendant 14jrs. Une semaine après la fin du traitement, les patients ont eu la chirurgie (CRS – CHIP). Des prélèvements de PMP ont été effectués pendant la CRS [2]. Ce traitement s'accompagnait de la diminution des bactéries dans les tumeurs (Figure 13) et aussi de la diminution de la β -caténine nucléaire et cytoplasmique (Figure 14).

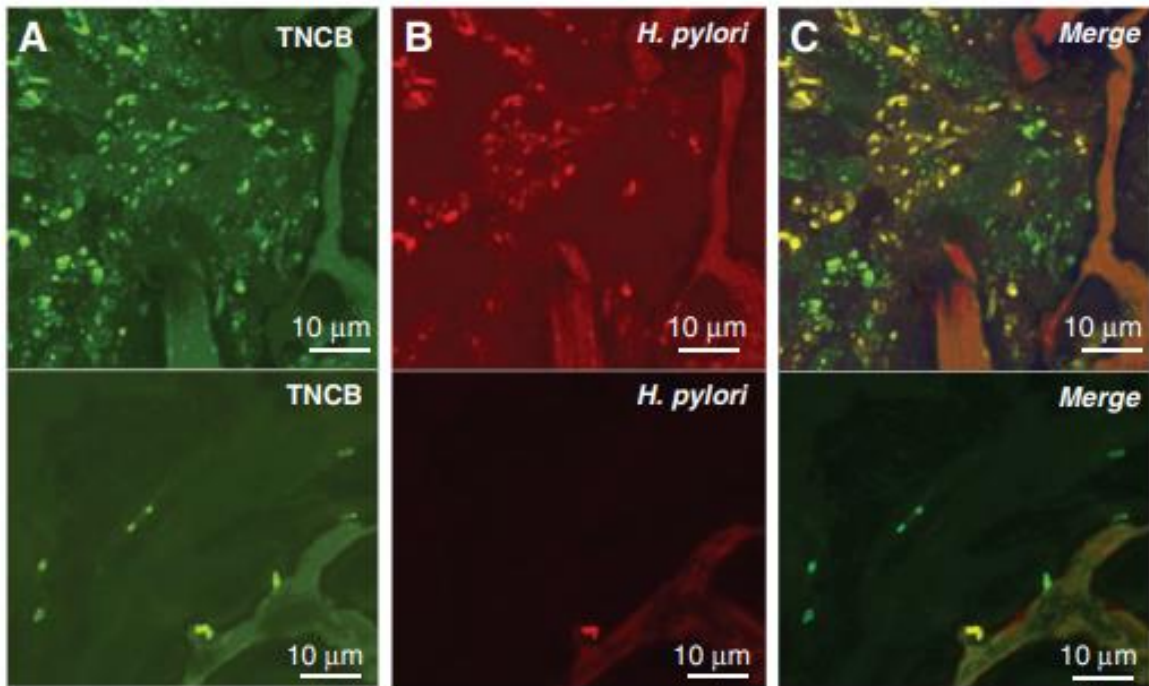


Figure 13 : Analyse de la densité bactérienne dans le mucus de patients ayant un PMP par FISH. A : Toutes les bactéries (TNCB) en vert ; B : Spécifiquement H.pylori en rouge ; C : Merge : TNCB qui correspondent à H. pylori apparaissent jaune alors que les bactéries non-H.pylori restent vertes. Une importante réduction du nombre de bactéries est observée chez les patients qui ont un PMP et qui ont suivi la trithérapie (A-C en bas) comparé aux patients qui ont un PMP et qui n'ont pas suivi le traitement (A-C en haut) [2].

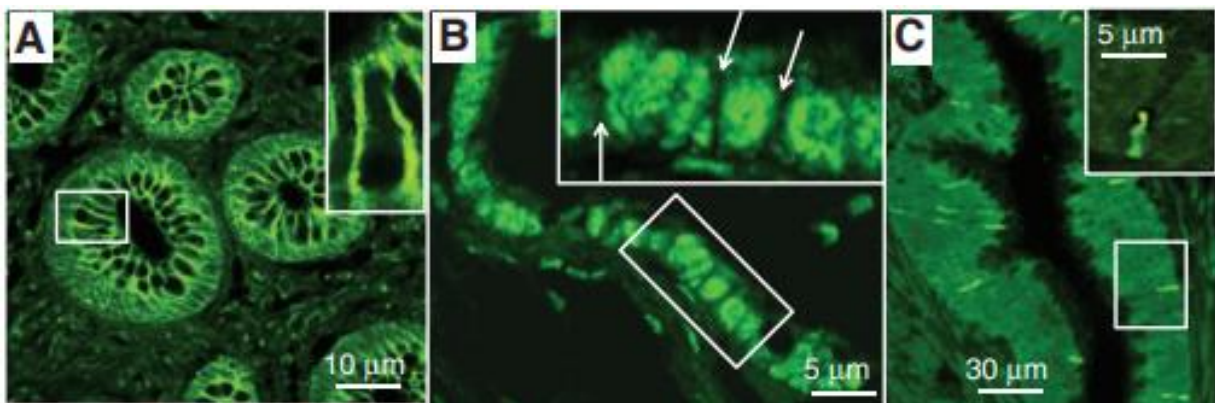


Figure 14 : Analyse qualitative de la localisation de la β -caténine sur des coupes de PMP. A : des échantillons contrôles (appendice non inflammé, non perforé) (localisation membranaire) ; B : des échantillons de patients ayant un PMP de haut grade (localisation cytoplasmique et nucléaire) ou C : des échantillons de patients ayant suivi le traitement par les antibiotiques (Augmentation du niveau membranaire et diminution du niveau cytoplasmique et nucléaire de β -caténine) [2].

Ils ont observé un possible effet significatif de la trithérapie car elle pourrait permettre d'augmenter la survie des patients qui ont un PMP de haut grade en diminuant la densité des bactéries mais aussi en diminuant le niveau de β -caténine cytoplasmique et en rétablissant la localisation membranaire. Une petite note par rapport à la figure 12 : Il y aurait d'autres bactéries présentes que *H. pylori*, ce qui signifie que ce n'est pas forcément cette bactérie qui est la seule responsable du développement de la maladie car la trithérapie peut également toucher d'autres espèces. Ces études sont comparatives mais rétrospectives et non randomisées et ne permettent pas d'affirmer le bénéfice pour les patients. Ces résultats n'ont d'ailleurs jamais été publiés par un autre groupe de recherche que ce groupe américain et n'ont pas induit de changement de pratique dans les traitements des patients qui ne reçoivent aujourd'hui aucune antibiothérapie dans les différents groupes internationaux.

La β -caténine est normalement localisée au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales normalement polarisées et permet une interaction clé entre les protéines du cytosquelette et celles des jonctions cellules-cellules [20]. Ces interactions sont nécessaires à la polarité des cellules, à leur adhésion cellule-cellule et à la régulation du cycle cellulaire. Dans la carcinogenèse, cette protéine est relocalisée dans le cytoplasme et le noyau. La perte de la β -caténine membranaire conduit à la diminution des interactions cellules-cellules, à leur prolifération et à leur migration. Dans le noyau, la β -caténine va ainsi activer la voie wnt/ β -caténine qui est une des voies de signalisation de la carcinogenèse. Il a été montré que les bactéries induisent une inflammation (on a vu précédemment que MUC2 était associé aux cellules inflammatoires et aux bactéries présentes), qui active la voie Wnt/ β -caténine [2] [21].

La renormalisation de la distribution de la β -caténine chez les patients de haut grade après un traitement antibiotique semble indiquer la contribution potentielle des bactéries au processus de la maladie du PMP [11]. Ainsi, les antibiotiques permettraient de diminuer la charge microbienne associée au PMP et ainsi entraîner une diminution de MUC2 et de la β -caténine cytoplasmique et nucléaire et potentiellement augmenter la survie des patients en diminuant l'agressivité de la maladie [2].

De plus, des bactéries pourraient avoir un rôle dans la résistance à la chimiothérapie [20]. Ainsi, en cas de traitement antibiotique, la quantité de bactéries serait diminuée et cela pourrait augmenter l'efficacité de la CHIP.

Ces résultats sont prometteurs pour l'utilisation d'un nouveau traitement pour les patients atteints d'un PMP de haut grade sans envahissement des ganglions lymphatiques. En effet, une note est portée pour les patients atteints d'un PMP de haut grade avec envahissement des ganglions lymphatiques où le traitement antibiotique n'augmente pas la survie des patients. Il est potentiellement déjà trop tard, la maladie est trop avancée. En effet, la survie à 5ans est de seulement 11% si les ganglions sont envahis alors qu'elle est de 76% s'ils ne sont pas envahis, en cas de PMP de haut grade [11].

Le phylum prédominant dans le PMP, les Protéobacteries, est minoritaire dans le microbiote intestinal normal de l'Homme: En effet les phylums prédominants sont les Firmicutes et les Bactéroidetes (Figures 11 et 12).

C'est intéressant car c'est ce qui est également retrouvé chez les patients atteints de mucoviscidose [22]. Dans l'article, les auteurs ont analysé les bactéries présentes dans le tractus respiratoire (microbiote) de patients très jeunes (bébé de 9 mois) à plus âgés (adultes de 72 ans). Les auteurs ont pu mettre en évidence une grande diversité des bactéries chez les patients jeunes, qui diminue progressivement chez les sujets âgés, avec une prédominance notamment des Protéobactéries et une surexpression de *MUC2*, apomucine exprimé normalement faiblement dans les voies respiratoires, qui seraient corrélé à l'agressivité de la maladie.

Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que le même mécanisme associé aux mêmes bactéries et à la sécrétion de *MUC2* serait responsable de l'agressivité de la maladie dans le PMP et dans la fibrose kystique [11].

II/ OBJECTIFS DU PROJET

Il semble évident que des bactéries jouent un rôle dans le développement du PMP. L'utilisation d'antibiotiques pourrait permettre une meilleure survie des patients qui ont un PMP de haut grade. De façon associée, l'angiogenèse semble également avoir un rôle important dans le développement du PMP.

Ainsi, l'objectif de mon projet de recherche a été d'évaluer l'efficacité d'agents anti-angiogéniques et antibiotiques sur l'évolution du pseudomyxome péritonéale dans un modèle *in vivo* de PMP.

Nous analyserons dans une première partie l'effet du traitement sur la quantité de tumeur ou d'ascite développées, le poids des souris en fonction du temps et l'expression de cytokines ou facteurs de croissance par des dosages biochimiques effectués à partir des prélèvements d'ascite, de tumeur ou de sérum des souris. Le choix des antibiotiques sera réalisé en fonction du type de bactérie potentiellement détecté dans nos prélèvements et les anti-angiogéniques seront ceux disponibles dans le laboratoire : Le Bevacizumab, le Sorafenib et l'Aflibercept.

La seconde partie sera destinée à la recherche des bactéries par HIS ou simplement par mise en culture des prélèvements en bactériologie afin de caractériser les microbiomes associés aux bactéries.

III/ MATERIELS ET METHODES

1) Greffe ou injection intrapéritonéale pour le développement de différents modèles de PMP

L'unité INSERM U1275 fait partie du consortium européen « PMP4cure », ce qui a permis l'obtention du financement NORD en 2012 pour aider à la création de modèles animaux de PMP. Cela a nécessité une coordination avec les services de chirurgie des hôpitaux parisiens pour obtenir des échantillons chirurgicaux optimaux et d'anatomopathologie pour valider les modèles. Afin de créer des modèles *in vivo* de PMP, les prélèvements, obtenus grâce au consentement éclairé des patients, sont greffés en intrapéritonéal à des souris immunodéprimées. Aussi, comme c'est le cas pour 2 de nos modèles, l'obtention de PMP peut s'obtenir par injection de l'ascite gélatineuse en intrapéritonéale [23]. Il est nécessaire d'utiliser des souris immunodéprimées pour qu'il n'y ait pas de rejet de la greffe. Le projet a également reçu l'autorisation du Ministère de la Recherche et de l'Innovation (Projet APAFIS #34082 (Annexe 1). Le laboratoire réalise ces greffes au sein d'une animalerie agréée (n° d'agrément D75-1003) et j'ai suivi la formation à l'expérimentation animale niveau II ainsi que l'initiation à la chirurgie, pour avoir une complète autonomie à l'animalerie et les compétences requises.

Afin de pouvoir évaluer l'efficacité des traitements, il faut avant tout développer des modèles de PMP. Pour cela, les prélèvements issus de patients seront transplantés ou bien l'ascite injectée dans la cavité péritonéale des souris nues afin de reproduire la maladie chez l'animal. La procédure d'implantation des prélèvements de PMP s'effectue sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane à 3%), la souris allongée sur le dos sur un tapis chauffant. Après désinfection cutanée à l'ovidone-iodine, sans contention, une incision abdominale médiane d'environ 1 cm est pratiquée sur l'abdomen de la souris. Un (pour l'évaluation des traitements) ou deux fragments (pour le passage) de tumeurs (3x3x3 mm) humaines ou réséquées d'une souris sont déposés dans les gouttières des flancs droit et gauche. L'incision sera refermée par 2 points de vicryl et l'incision cutanée par deux à trois agrafes métalliques. La durée de la procédure est de 5-10 minutes. Les animaux sont ensuite réveillés dans une cage chauffée par une lampe. En ce qui concerne l'ascite, cette dernière est injectée en intrapéritonéale à raison de 0,2ml à l'aide d'une aiguille 18G. Les modèles sont appelés de la façon suivante : les deux premières lettres du prénom puis les deux premières lettres du nom du patient. Le « M » en 5^{ème} lettre pourra être ajouté pour faire la différence entre un modèle « ascite » et un modèle « morceaux » issu de la même tumeur.

Après le développement de 3 passages sur la souris (un passage correspond à prendre un petit bout de tumeur ou un peu d'ascite qui s'est développé dans l'abdomen d'une souris pour l'implanter dans le péritoine d'une autre souris pour que la tumeur ou l'ascite se développe à nouveau), nous pourrons tester les différents agents thérapeutiques. Effet, le Dr Anthony DOHAN a montré qu'après plusieurs passages, la xénogreffe garde les mêmes caractéristiques histopathologiques avec la tumeur d'origine humaine [3]. En effet, l'histologie, grâce à la coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) des coupes, et le grade, bas ou haut, sont conservés avec la présence des atypies cytologiques et la proportion de mucus.

Nous utiliserons 10 souris par groupe et l'effet des traitements sera évalué après un nombre de jours post-greffe définis au préalable macroscopiquement sur le volume/poids de la tumeur ou de l'ascite. Le schéma expérimental de chaque expérience sera présenté avant chaque résultat.

2) Analyses des mécanismes impliqués dans l'évolution de la maladie par cytokine array et ELISA

a) Cytokine array

Les cytokines et les chimiokines sont des molécules de signalisation extracellulaires qui permettent une communication entre les cellules et ont des rôles importants dans de nombreux processus biologiques tels que la croissance cellulaire, la différenciation, l'expression des gènes, la migration, l'immunité et l'inflammation. Souvent l'action d'une cytokine est régulée par la présence ou l'absence d'autres cytokines.

Le cytokine array est basé sur le principe suivant :

Des anticorps de capture soigneusement sélectionnés ont été « fixés » en double sur la membrane de nitrocellulose. Les échantillons, lysats tissulaires ou cellulaires ou encore les sérums ou plasmas, sont dilués et mélangés à un cocktail d'anticorps de détection biotinylés. Ce mélange est ensuite incubé avec la membrane contenant les anticorps de capture et vont se lier à ces derniers. Après un lavage pour enlever les complexes non liés, la Streptavidin-HRP puis les substrats de la Péroxydase sont ajoutés. Enfin, la chimiluminescence produite est proportionnelle à la quantité de cytokine liée.

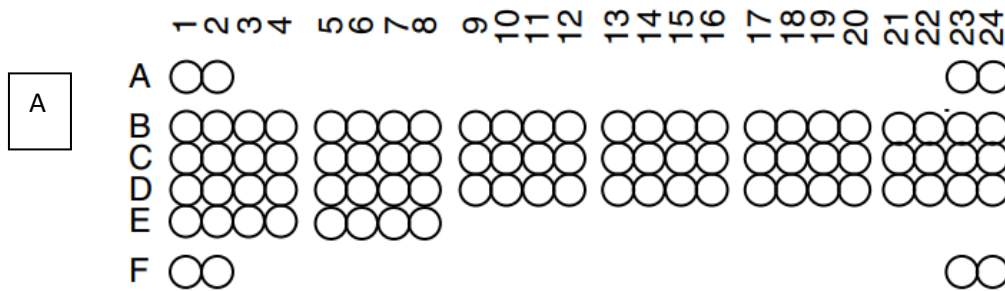
Le kit « Mouse Cytokine Array Panel A » (référence ARY006, Bio-technne) est un outil rapide, sensible et économique pour la détection simultanée et l'analyse de l'expression relative de 40 cytokines murines. Le but du cytokine array est de cibler les cytokines qui ont un rôle dans le processus biologique ici du PMP sans effectuer de nombreux tests immunologiques (Figure 15). Nous avons utilisé un kit de cytokines murines même si la tumeur greffée est humaine car les cytokines libérées seront murines (Annexe 2 pour visualiser le protocole).

20µl de chaque lysat de PMP ou sérum issus des souris contrôles ou traitées par le mélange Pénicilline/Streptomycine en association avec l'Aflibercept ont été mélangés afin d'obtenir les 4 mélanges suivants car nous pouvons tester que 4 échantillons dans le kit (il y a 4 membranes):

- Sérums CTRL
- Sérums traités
- Tumeurs (lysats tissulaires) CTRL
- Tumeurs traitées

Le dosage des protéines a été effectué dans chaque mélange et les mêmes quantités de protéines de sérums et de tumeurs ont été déposées sur les membranes.

A la fin de l'expérience, la révélation des membranes par chimiluminescence a été effectuée par l'imager Azure Biosystems et l'analyse des spots détectés par le logiciel azurespot.



Refer to the table below for the Mouse Cytokine Array coordinates.

Coordinate	Target/Control	Alternate Nomenclature
A1, A2	Reference Spot	—
A23, A24	Reference Spot	—
B1, B2	BLC	CXCL13/BCA-1
B3, B4	C5/CSa	Complement Component 5a
B5, B6	G-CSF	—
B7, B8	GM-CSF	—
B9, B10	I-309	CCL1/TCA-3
B11, B12	Eotaxin	CCL11
B13, B14	ICAM-1	CD54
B15, B16	IFN- γ	—
B17, B18	IL-1 α	IL-1F1
B19, B20	IL-1 β	IL-1F2
B21, B22	IL-1ra	IL-1F3
B23, B24	IL-2	—
C1, C2	IL-3	—
C3, C4	IL-4	—
C5, C6	IL-5	—
C7, C8	IL-6	—
C9, C10	IL-7	—
C11, C12	IL-10	—
C13, C14	IL-13	—
C15, C16	IL-12 p70	—
C17, C18	IL-16	—
C19, C20	IL-17	—
C21, C22	IL-23	—
C23, C24	IL-27	—

B

Coordinate	Target/Control	Alternate Nomenclature
D1, D2	IP-10	CXCL10/CRG-2
D3, D4	I-TAC	CXCL11
D5, D6	KC	CXCL1
D7, D8	M-CSF	—
D9, D10	JE	CCL2/MCP-1
D11, D12	MCP-5	CCL12
D13, D14	MIG	CXCL9
D15, D16	MIP-1 α	CCL3
D17, D18	MIP-1 β	CCL4
D19, D20	MIP-2	CXCL2
D21, D22	RANTES	CCL5
D23, D24	SDF-1	CXCL12
E1, E2	TARC	CCL17
E3, E4	TIMP-1	—
E5, E6	TNF- α	—
E7, E8	TREM-1	—
F1, F2	Reference Spot	—
F23, F24	PBS (Negative Control)	Control (-)

Figure 15 : Répartition des différents anticorps de capture (A) correspondant aux cytokines (B) du kit « Mouse Cytokine Array Panel A ARY006, Bio-techne »

b) ELISA : dosage du VEGF

L'ELISA (= Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique de dosage immunologique qui permet de quantifier les concentrations de diverses molécules présentes notamment dans les liquides biologiques (sérum, plasma) ou encore lysats cellulaires et tissulaires. Elle est très utilisée notamment pour le dosage des cytokines, des facteurs de croissances et de certaines hormones. Cette technique dispose d'une grande fiabilité et d'une grande reproductibilité car elle repose sur le principe de fixation spécifique d'un antigène à son anticorps.

Le principe de l'ELISA consiste à piéger, entre un « anticorps de capture » et un « anticorps de détection », les antigènes d'intérêt.

Ces deux anticorps sont généralement spécifiques de l'antigène d'intérêt. L'anticorps de détection est dans la plupart des cas biotinylé. Cette caractéristique lui permet de se fixer à un complexe enzymatique (une peroxydase, ici la Streptavidine-HRP). La détermination des concentrations en antigène se fait en ajoutant un chromogène pour la lecture (généralement sur microplaques) de densités optiques.

Cette technique permet une mesure fiable et reproductible de molécules présentes à très faibles concentrations (du nanogramme au picogramme/ml) dans le plasma, le sérum, ou les surnageants de culture cellulaire.

Le premier facteur impliqué dans l'angiogenèse est le VEGF qui est exprimé par différents types cellulaires : les cellules endothéliales, les plaquettes, les macrophages ou encore les cellules tumorales. Il est également retrouvé dans le sérum et le plasma.

Le VEGF a un rôle clé dans l'angiogenèse et le cancer, c'est une cible thérapeutique intéressante. C'est pour cette raison que nous avons souhaité doser la concentration en VEGF dans le sérum des souris mais aussi dans le lysat tumoral de PMP afin d'évaluer l'effet des traitements sur le niveau de VEGF et donc sur l'angiogenèse.

Nous avons utilisé le kit Quantikine ELISA Mouse VEGF Immunoassay, référence MMV00, Biotechne. Les échantillons (sérum et tumeur) ont été dilués au 1/5^{ème} dans le tampon et les résultats obtenus ont été exprimés en pg/ml par µg de protéines.

A la fin de l'expérience, la densité optique a été déterminée par un lecteur de microplaque à 450nm, avec une correction de référence à 540 ou 570nm (Annexe 3 pour visualiser le protocole).

c) Dosage ACE

Le dosage de l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) peut être lié à une tumeur cancéreuse si son taux est élevé dans le sang. Il est utilisé chez les patients en routine comme aide au diagnostic mais aussi au suivi des traitements, combiné notamment au taux de CA 19.9 et CA 125. Ces marqueurs cancéreux sont élevés dans le sang des patients atteints d'un cancer digestif (côlon, pancréas, ...). Nous avons souhaité observer si ce marqueur était exprimé dans le sang de nos souris greffées d'un PMP et traitées par un anti-angiogénique et/ou un antibiotique.

Le dosage a été effectué dans le service de biochimie de l'hôpital Saint Louis avec l'aide de Mme Marie-Hélène SCHLAGETER (biologiste du service de Biologie cellulaire) et Mme Khadidja BOUTBIBE (Ingénieure Biologie moléculaire).

Les échantillons ont été dilués au 1/5ème (25µl de sérum + 100µl de tampon universel du kit Elecsys CEA, référence 07027079190, COBAS (ROCHE), dans des cupules de transfert qui ont été mises dans des tubes à hémolyse afin d'être analysés par l'automate COBAS (Annexe 4 pour la fiche technique).

Les résultats du dosage sont déterminés par Electrochimiluminescence « ECLIA » et donnés en ng/ml.

L'ECLIA est la nouvelle technologie de détection très sensible et rapide de ROCHE pour les tests immunologiques Elecsys.

Le principe est le suivant : L'électrochimiluminescence ou chimiluminescence électrogénérée est un phénomène d'émission de lumière déclenché par une réaction électrochimique initiale. Cette réaction de transfert d'électrons se produisant directement à la surface d'une électrode induit une cascade de réactions chimiques. Une espèce appelée « coréactif » va porter le luminophore à l'état excité. Lors du retour à l'état fondamental, le luminophore émet un photon à une longueur d'onde caractéristique. L'intensité lumineuse résultante constitue le signal analytique qui est directement proportionnel au nombre de luminophores présents (www.techniques-ingenieur.fr). Ces luminophores sont facilement conjugués aux anticorps pour les tests immunologiques et permet ainsi le dosage de nombreuses protéines pour le diagnostic des patients.

3) Cultures primaires sans antibiotiques et recherche des bactéries dans les tumeurs

Lorsque les modèles seront mis en culture, nous mettrons d'un côté des cultures contenant un antibiotique (Pénicilline/Streptomycine) puis d'un autre côté des cultures sans antibiotiques afin d'observer s'il y a des bactéries qui prolifèrent et d'analyser le milieu de culture par le service de bactériologie et identifier les germes présents.

4) Recherche de bactéries dans les tumeurs par ViewRNA ISH Tissue Assay

L'utilisation de cette nouvelle technologie d'hybridation *in situ* sur des coupes de tissus de patients inclus en paraffine a pour but d'identifier la présence de bactéries afin de valider premièrement notre hypothèse et également nous aider dans le choix des antibiotiques, si cela est possible.

Le kit « ViewRNA ISH tissue Assay » de In Vitrogen (référence 19931) est utilisé pour l'identification d'un ou deux ARNs cibles à partir de coupes de tissus fixées dans le formol et inclus en paraffine. L'HIS traditionnelle est limitée avec une faible sensibilité. Le kit « ViewRNA ISH Tissue Assay » est une nouvelle technologie basée sur une amplification du

signal hautement spécifique. C'est une technique robuste pour la détection d'un ou deux ARNs à la fois sur une même coupe avec une sensibilité d'une seule copie : C'est-à-dire qu'un point de marquage détecté correspond à une copie d'ARN cible. Dans le cas d'une détection de deux ARNs cibles, ce kit sera utilisé en association avec un autre kit : « ViewRNA ISH Tissue Assay, blue module » (référence 19932)(Figure 16).

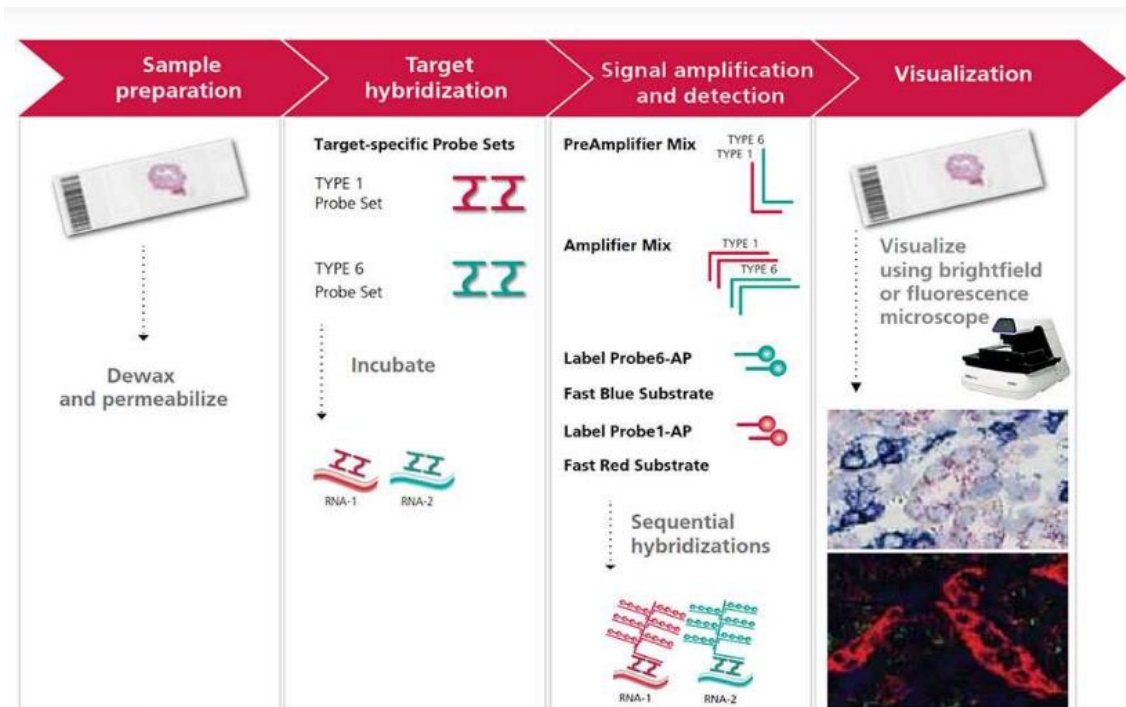


Figure 16 : Explication de la technologie ViewRNA ISH Tissue Assay. Le test tissulaire ViewRNA ISH, basé sur la technologie d'amplification du signal de l'ADN ramifié, peut être utilisé pour identifier deux cibles d'ARN simultanément dans des cellules individuelles.

Cette technique repose sur le principe suivant :

À l'étape 1, l'échantillon est déparaffiné, fixé, perméabilisé. Il suit une étape de prétraitement et est digéré par une protéase pour permettre l'accessibilité de la cible.

À l'étape 2, les sondes spécifiques à la cible s'hybrident à chaque ARN cible. Plus précisément, les jeux de sonde sont bispécifiques : Ils sont d'un côté spécifique de l'ARN cible ; et de l'autre côté spécifique de l'« arbre », imagé par un « L » à l'étape 3 nécessaire à l'amplification du signal. Ce « L » pourra s'hybrider, sur le petit côté du « L », seulement s'il y a la présence des deux sondes alignées, dont la longueur est d'environ 60 nucléotides. De plus, ces « doubles sondes » vont s'hybrider tout le long de l'ARN cible : il y a différents jeux de sonde. De ce fait, cette technique est hautement spécifique.

À l'étape 3, l'amplification du signal est réalisée à l'aide de la technologie de l'ADN ramifié via une série d'étapes d'hybridation séquentielle. Premièrement, les molécules de préamplificateur, correspondant à des séquences d'ADN répétées, vont s'hybrider à leur paire respective d'oligonucléotide sur le petit côté du « L ». Le long côté du « L » contient 20 séquences répétées d'ADN. Puis, 20 molécules d'amplificateur, qui contiennent chacune aussi

20 séquences répétées d'ADN, vont s'hybrider à leur préamplificateur respectif. Ensuite, 20 oligonucléotides de la sonde d'étiquette spécifiques (Type 1 ou Type 6), conjugués à la phosphatase alcaline (AP) (Label Probe-6-AP et Label Probe-1-AP), sont hybridés séquentiellement à leurs molécules d'amplification correspondantes (à chaque séquence répétée). Un « arbre » d'amplification du signal entièrement assemblé possède donc 400 sites de liaison Label Probe (un total de 8 000 pour chaque molécule d'ARN). Le Fast Red et le Fast Blue sont alors utilisés comme substrat de l'AP, un maximum de deux cibles d'ARN peuvent donc être détectées. C'est une technique aussi hautement sensible.

À l'étape 4, les ARNm cibles sont visualisés et détectés à l'aide d'un microscope optique standard (Cf. Annexe 5 pour visualiser le protocole).

Dans le cadre de mon projet, nous avons testé 2 sondes de type 1 qui donneront en cas de détection de l'ARN cible une coloration des points rose-rouge et 1 sonde de type 6 qui donnera une coloration des points bleue:

- Sonde ARN 16S bactéries qui va cibler l'ensemble des bactéries : Type 1
- Sonde ARN 16S spécifique de *Helicobacter pylori* : Type 1
- Sonde MUC2 : Type 6

Nous avons choisi de cibler l'ARN 16S car cet ARNr contient des régions très conservées chez toutes les bactéries et 9 régions variables qui vont nous permettre d'identifier une bactérie spécifique (*H. pylori*) ou bien l'ensemble des bactéries.

Cette technique a été effectuée sur plusieurs coupes de patients de haut grade ainsi que des coupes d'amygdales ou d'appendice comme contrôle positifs des bactéries (probe ARN 16S).

5) Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative et sera représentée sur les graphiques de la façon suivante :

Aucune information	Non significatif
* _____	$0,01 < p < 0,05$
** _____	$0,001 < p < 0,01$
*** _____	$0,0001 < p < 0,001$
**** _____	$< 0,0001$

Tableau 1 : Représentation des analyses statistiques.

Le test de Mann Whitney est utilisé lors de la comparaison de deux groupes (CTRL versus traité) alors que le test de Kruskal Wallis est utilisé à partir de 3 groupes analysés. Ce sont des tests qui vont analyser une différence significative par rapport à une seule variable, le type de traitement. Le Two-Way Anova est utilisé lorsqu'il y a deux variables, comme le temps et le traitement. Enfin, le test de Spearman permet d'observer une corrélation entre deux variables, comme le taux de VEGF ou d'ACE et le poids de la tumeur ou d'ascite. Toutes les analyses statistiques de cette étude sont effectuées en utilisant le programme GraphPad Prism 9.

IV/ RESULTATS

Nous avons réussi à faire développer les 3 modèles de PMP suivants chez la souris nude :

- Modèle STLO : Patient de sexe masculin ayant un PMP de haut grade (patient qui avait un envahissement du foie et qui a subi une CHIP après le prélèvement de la tumeur) sous forme d'ascite gélatineuse
- Modèle STLOM : Patient de sexe masculin ayant un PMP de haut grade (même patient que le modèle STLO qui avait un envahissement du foie et qui a subi une CHIP après le prélèvement de la tumeur) sous forme de « morceaux » de tumeur
- Modèle BOGH : Patient de sexe masculin ayant un PMP de haut grade sous forme d'ascite gélatineuse

Les expériences présentées ci-dessous ont été effectuées à partir de ces 3 modèles.

Les

1) Les antibiotiques et les anti-angiogéniques sont-ils efficaces contre l'évolution du PMP ?

Afin de répondre à cette question, nous avons avant tout développé les trois modèles précédemment cités chez la souris nude, souris immunodéprimée afin qu'il n'y ait pas de rejet de greffe. Après plusieurs passages, nous avons pu greffer la tumeur ou injecter l'ascite à plusieurs souris (10 par groupe) et nous les avons traitées avec les différents traitements qui sont décrits ci-dessous (Tableau 1) :

Nom du traitement	Type de traitement	Rôle
Bevacizumab	Anti-angiogénique	Anticorps monoclonal anti-VEGF. Il va inhiber la liaison du VEGF à ses récepteurs.
Sorafenib	Anti-angiogénique	Inhibiteur de protéines tyrosine kinases.
Aflibercept	Anti-angiogénique	Protéine de fusion recombinante composée des fragments des domaines extracellulaires des récepteurs de type 1 et 2 du VEGF humain fusionnés au fragment Fc de l'IgG1 humaine. Cette protéine agit comme un leurre avec une plus grande affinité que les récepteurs naturels pour le VEGF et le PlGF.
Métronidazole + Amoxicilline (ATB1)	Mélange d'antibiotiques	Le métronidazole est un antibiotique antiparasitaire de la famille des nitro-5-imidazolés. Il va inhiber la synthèse des acides nucléiques. L'Amoxicilline est un antibiotique de la famille des pénicillines (bêta-lactamines) mais à spectre large. Elle va inhiber la synthèse des protéines de paroi des bactéries. Ils sont utilisés car la souche <i>H. pylori</i> est sensible à ces antibiotiques.
Pénicilline/Streptomycine (ATB2)	Mélange d'antibiotiques	La Pénicilline G et la Streptomycine sont des antibiotiques bactéricides de la famille des bêta-lactamines et des aminosides respectivement. Ils vont inhiber la synthèse des protéines et plus précisément celles de paroi pour la Pénicilline.

Tableau 2 : Description des différents anti-angiogéniques et antibiotiques évalués sur les souris nudes au cours des expériences du projet.

A la fin de l'expérience, nombre de jours déterminés en fonction du développement tumoral chez les souris CTRL dont leur poids sera au maximum de 33g, tous les animaux seront

mis à mort le même jour. Le développement tumoral sera visible macroscopiquement par une augmentation du diamètre abdominal. Le poids des souris a été fixé à 33g afin que les expériences soient réalisées dans des conditions éthiques pour la souris où l'animal peut se déplacer et se nourrir sans difficulté. Le sang ainsi que la tumeur ou l'ascite seront prélevés et ces derniers seront pesés. Voici ci-après les différentes expériences réalisées :

a) Evaluation de l'effet de deux anti-angiogéniques, le Bevacizumab et le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO d'ascite gélatineuse)

La première expérience a été réalisée sur le modèle de PMP STLO qui est induit suite à l'injection d'ascite gélatineuse. Nous avons souhaité évaluer l'effet des deux anti-angiogéniques disponibles au laboratoire, le Bevacizumab et le Sorafenib, sur le développement de ce PMP.

Ci-dessous le schéma expérimental (Figure 17) :

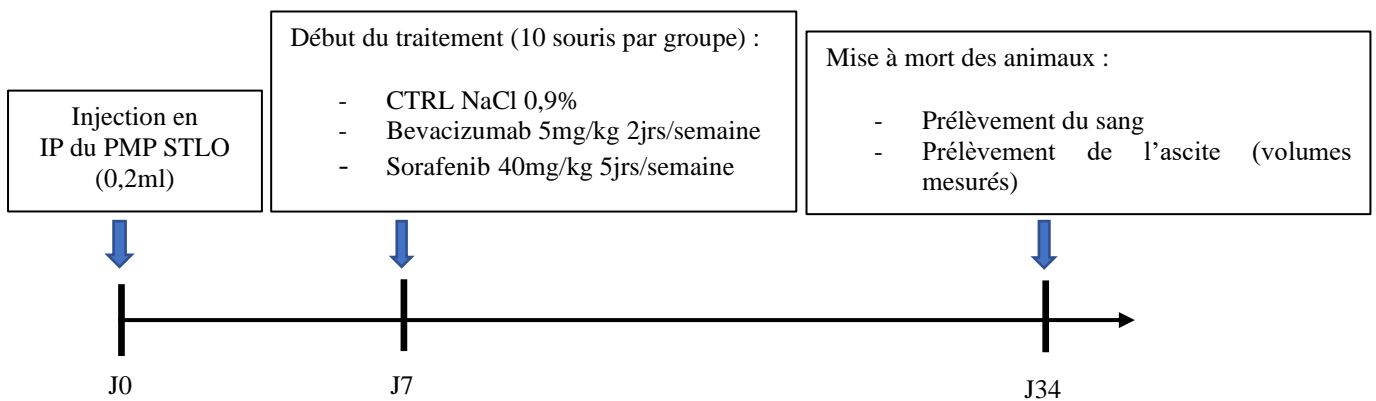


Figure 17 : Schéma expérimental de la première expérience : Effet du Bevacizumab et du Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO).

Le suivi du poids des souris traitées ou contrôles en fonction du temps ainsi que la mesure du volume de l'ascite et le dosage de l'ACE sérique nous a permis d'obtenir les graphiques ci-dessous (Figure 18) :

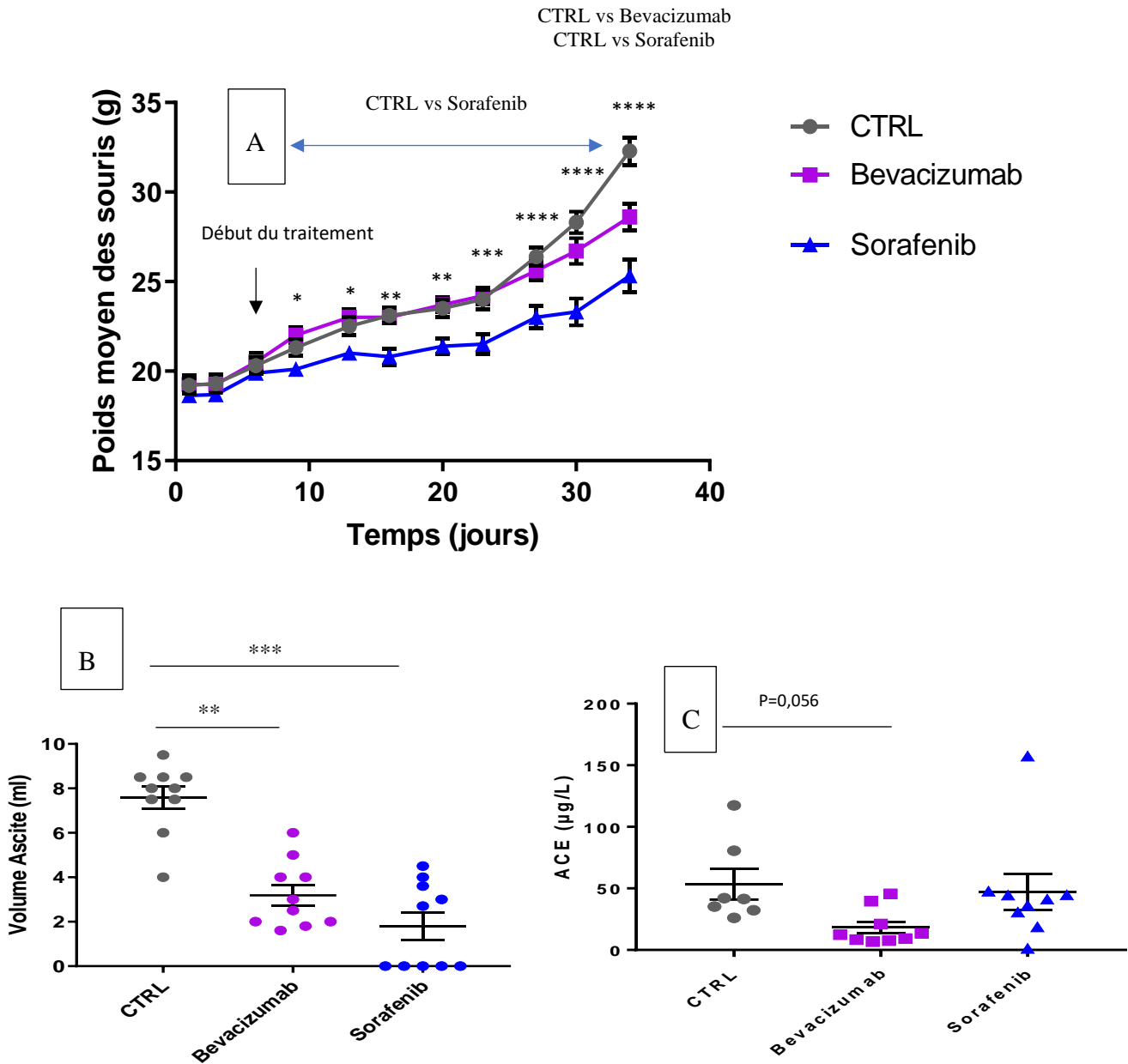


Figure 18 : Graphes représentant l'effet du Bevacizumab et du Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO) greffés à des souris nues. A) Courbes représentant le poids des souris greffées par le modèle STLO traitées par Bevacizumab ou Sorafenib en fonction du temps (Test Anova). B) nuage de points représentant les volumes d'ascite mesurés par souris ou C) la concentration en ACE sérique des souris greffées par le modèle STLO traitées par le Bevacizumab ou le Sorafenib à la fin de l'expérience (test Kruskal Wallis).

Nous pouvons observer premièrement sur la figure 18A qu'il y a une différence significative entre le poids des souris du groupe CTRL et le poids des souris traitées par le Bevacizumab ou le Sorafenib ; cette différence est plus importante pour les souris traitées par le Sorafenib. Le traitement induit donc un effet sur le poids des souris, lié au développement du PMP dans la cavité péritonéale où le volume d'ascite est significativement plus important pour les souris CTRL par rapport aux souris traitées. Les résultats obtenus sur la figure 18B montrent

un effet des anti-angiogéniques Bevacizumab et Sorafenib sur une diminution significative de la formation d'ascite dans l'abdomen des souris traitées par ces deux traitements. De plus, l'ascite obtenue dans le groupe traité par le Bevacizumab n'est pas hémorragique (Figure 19B) et elle l'est moins dans le groupe traité par le Sorafenib (Figure 19C) par rapport aux ascites CTRL (Figure 19A).

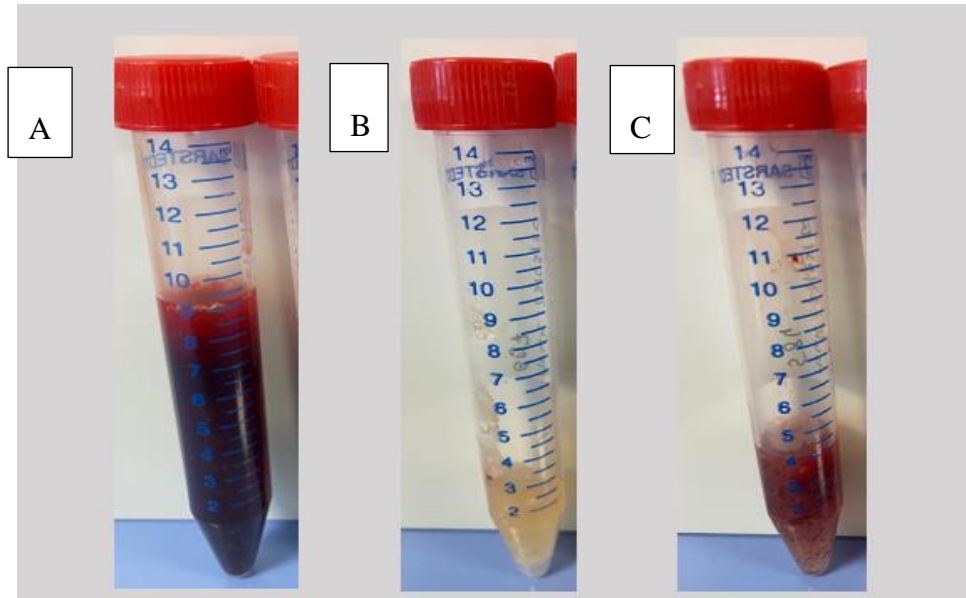


Figure 19 : Photo illustrative de l'ascite obtenu à la fin de l'expérience (J34) en fonction du groupe de traitement (CTRL, Bevacizumab ou Sorafenib). A : CTRL : Ascite abondante hémorragique ; B : après traitement par le Bevacizumab : ascite en faible quantité non hémorragique ; C : après traitement par le Sorafenib : Ascite en faible quantité moins hémorragique que pour le CTRL.

Enfin, nous pouvons observer sur la figure 18C dans le groupe Bevacizumab que la concentration en ACE sérique semble diminuée par rapport aux groupes CTRL et Sorafenib. L'ACE étant un marqueur tumoral, ces résultats semblent indiquer une efficacité du Bevacizumab.

Nous pouvons conclure concernant la première expérience que les deux anti-angiogéniques testés diminuent significativement le développement d'ascite tumorale de PMP dans l'abdomen des souris greffées par le modèle STLO avec un effet plus important du Sorafenib. Néanmoins, le Bevacizumab semble diminuer la concentration sérique en ACE et l'ascite obtenue n'est pas hémorragique : L'angiogenèse semble vraiment inhibée. Le Sorafenib a un effet plus important sur le développement de l'ascite alors que le Bevacizumab semble être plus efficace sur l'angiogenèse. Nous avons alors décidé de garder ces deux anti-angiogéniques pour les prochaines expériences.

b) Evaluation de l'effet du Bevacizumab et du Sorafenib en association avec un mélange d'antibiotiques sur l'évolution du PMP (modèle STLO d'ascite gélatineuse)

La deuxième expérience a été réalisée à nouveau sur le modèle STLO, modèle de PMP induit par l'injection d'ascite gélatineuse. Nous avons souhaité évaluer l'efficacité des anti-

angiogéniques utilisés ci-dessus en association avec un mélange d'antibiotiques, le métronidazole et l'amoxicilline. Ce mélange sera appelé ATB1. Cette bithérapie d'antibiotiques a été sélectionnée à partir de l'hypothèse que la souche bactérienne recherchée soit *Helicobacter pylori*. Nous n'avons pas pu utiliser la trithérapie citée dans la littérature (Lanzoprazole, Amoxicilline et Clarithromycine [2] [20]) car l'utilisation de certains médicaments étaient compliquée sur la souris. Cependant, le bactériologiste avec qui nous étions en contact nous avaient affirmé que l'Amoxicilline et le Métronidazole seraient efficaces sur 90-95% des *Helicobacter pylori*.

Ci-dessous le schéma expérimental (Figure 20):

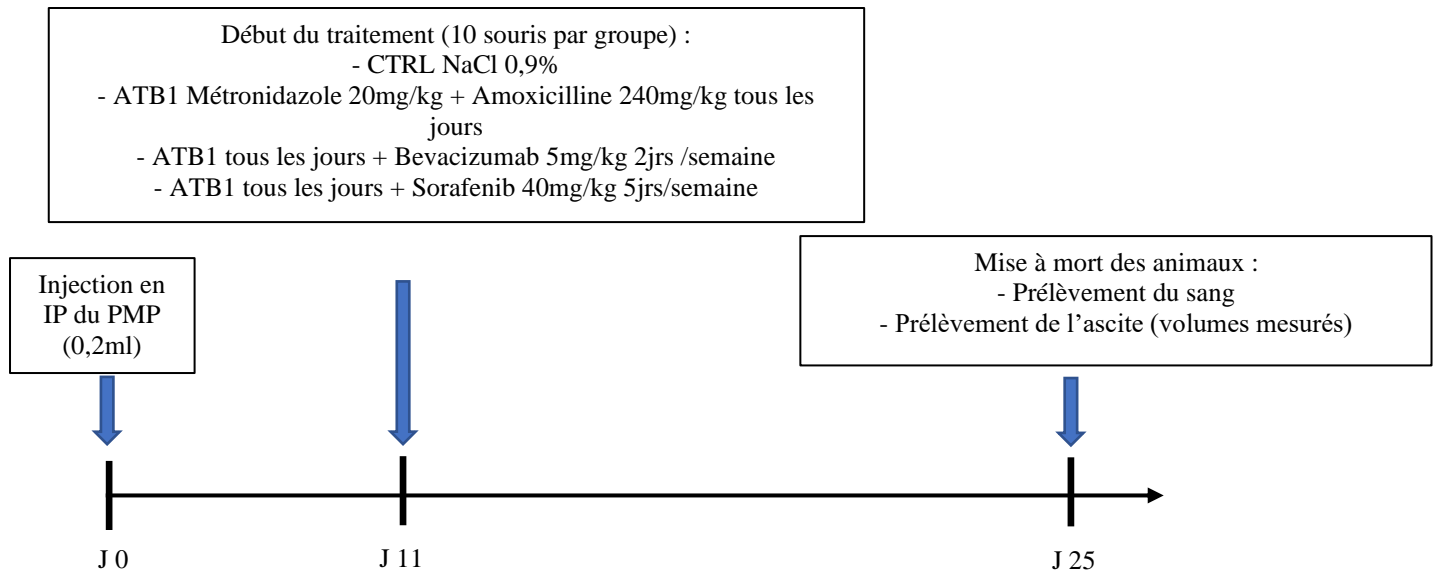


Figure 20 : Schéma expérimental de la deuxième expérience : Effet de l'ATB1 (Mélange de Métronidazole et d'Amoxicilline) en association ou non avec le Bevacizumab ou le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO).

Le suivi du poids des souris traitées ou contrôles en fonction du temps ainsi que la mesure du volume de l'ascite nous a permis d'obtenir les graphiques ci-dessous (Figure 21):

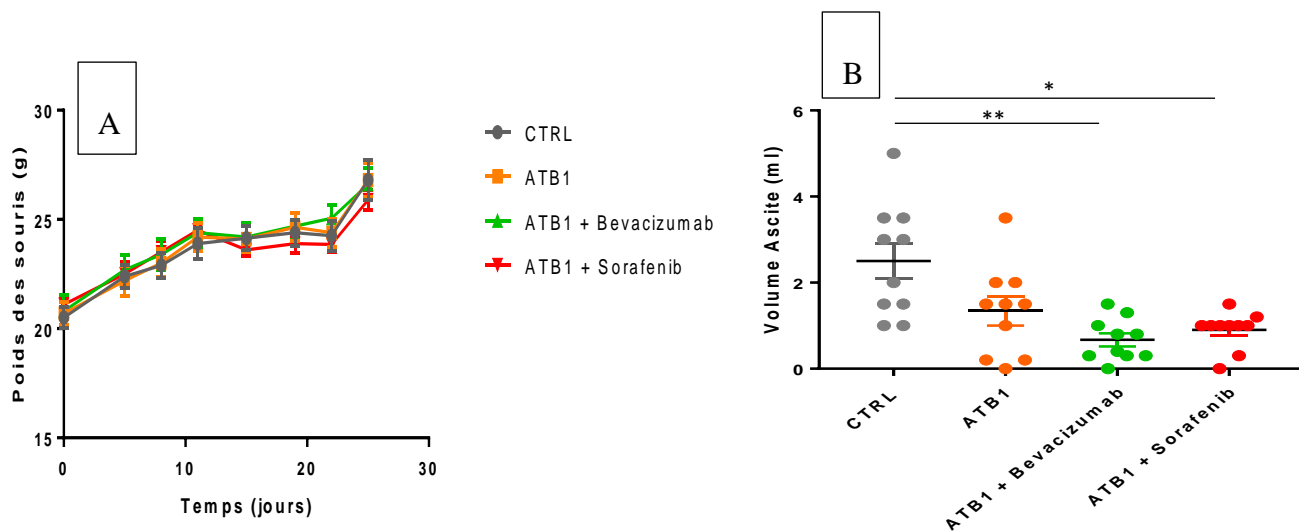


Figure 21 : Graphes représentant l'effet de l'ATB1 en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLO) greffés à des souris nudes. A) Courbes représentant le poids des souris greffées par le modèle STLO en fonction du temps (test Anova). B) Nuage de points représentant les volumes d'ascite mesurés par souris greffées par le modèle STLO traitées par l'ATB1 associé ou non au Bevacizumab ou au Sorafenib à la fin de l'expérience (Test Kruskal Wallis).

Nous pouvons observer sur la figure 21A qu'il n'y a pas de différence significative entre le poids des souris quel que soit le traitement testé. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le temps de traitement était plus court, il a duré seulement 14 jours, temps de traitement défini pour la thérapie contre *H. pylori*, alors qu'il avait duré 27 jours dans la première expérience. En effet, le volume d'ascite moyen obtenu à la fin de l'expérience dans le groupe CTRL est de 2,5ml alors qu'il était de 8ml dans la première expérience.

Nous pouvons ensuite observer sur la figure 20B une diminution des volumes d'ascite obtenu dans le groupe de souris traitées par l'ATB1. Ce traitement semble induire un effet sur l'évolution du PMP mais il n'y a pas de différence significative. Cependant, nous pouvons observer une différence significative entre les volumes d'ascite obtenus par les groupes de souris traitées par les associations « ATB1 + Bevacizumab » et « ATB1 + Sorafenib » par rapport au groupe de souris contrôles, ce qui montre un effet de ces combinaisons sur le développement du PMP. En effet, l'ascite obtenue dans le groupe CTRL (Figure 22A) est également hémorragique ; dans le groupe traité par l'ATB1 seul (Figure 22B), nous observons deux fractions, une hémorragique et une autre non hémorragique. Nous retrouvons les mêmes observations que précédemment pour les groupes traités par « Bevacizumab + ATB1 » et par « Sorafenib + ATB1 » où l'ascite n'est pas hémorragique (Figure 22C) et moins que le CTRL (Figure 22D), respectivement. Une petite remarque cependant, nous avons observé que les souris traitées par « ATB1 et Bevacizumab » étaient plus sujettes à faire des hémorragies lors de la laparotomie à la mise à mort des souris. Cet anti-angiogénique fragilise peut-être les autres vaisseaux en empêchant la formation de nouveaux.

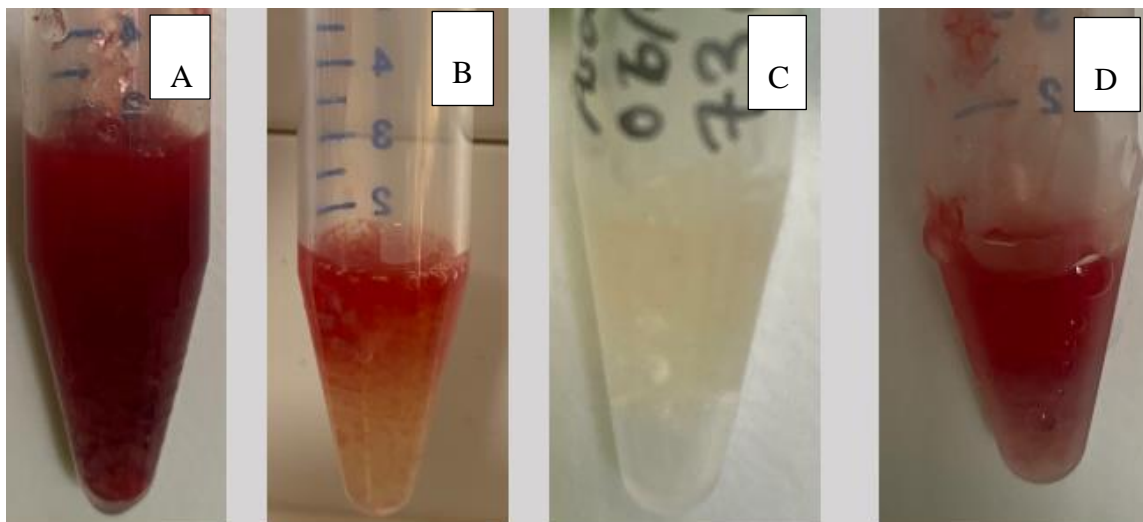


Figure 22 : Photo illustrative de l'ascite obtenu à la fin de l'expérience (J25) en fonction du groupe de traitement (ATB1 en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib). (A : CTRL : Ascite hémorragique ; B : après traitement par l'ATB1 : ascite en deux fractions, une hémorragique et une autre non hémorragique ; C : Après traitement par ATB1 et Bevacizumab : ascite non hémorragique ; D : après traitement par ATB1 et Sorafenib : Ascite moins hémorragique que pour le CTRL).

Nous pouvons alors conclure concernant la deuxième expérience que les deux combinaisons « ATB1 + Bevacizumab » ou « ATB1 + Sorafenib » diminuent de façon significative la formation d'ascite dans le modèle STLO de PMP et comme dans la 1^{ère} expérience, la combinaison « ATB1 + Bevacizumab » semble inhiber l'angiogenèse car les ascites obtenues sont à nouveau non hémorragiques (Figure 22). Il semble enfin y avoir un effet sur l'hémorragie des ascites des souris traitées par l'ATB1 seul, même s'il n'y a pas de différence significative concernant le volume d'ascite. Nous ne pouvons cependant pas conclure sur un effet synergique de l'association « ATB1 + Bevacizumab » car le temps de traitement était différent avec la première expérience.

c) Evaluation de l'effet de l'ATB1 et du Bevacizumab seuls ou en association sur l'évolution du PMP (modèle de « morceaux » de tumeur gélatineuse STLOM)

Suite aux résultats obtenus précédemment et afin d'observer une possible synergie de ces deux traitements, nous avons souhaité comparer l'effet du Bevacizumab et de l'ATB1 seuls ou en association mais sur le modèle STLOM, modèle de tumeur gélatineuse STLOM greffé aux souris. Ce modèle est issu du même patient que le modèle STLO ; nous observons à la fin de l'expérience un mélange de masse gélatineuse tumorale et d'ascite alors que dans le modèle STLO c'est seulement de l'ascite. Ce modèle se développe en 5 à 6 semaines comparé au modèle d'ascite qui se développe en 3 semaines environ : C'est pour cela que le traitement a commencé plus tard.

Ci-dessous le schéma expérimental (Figure 23) :

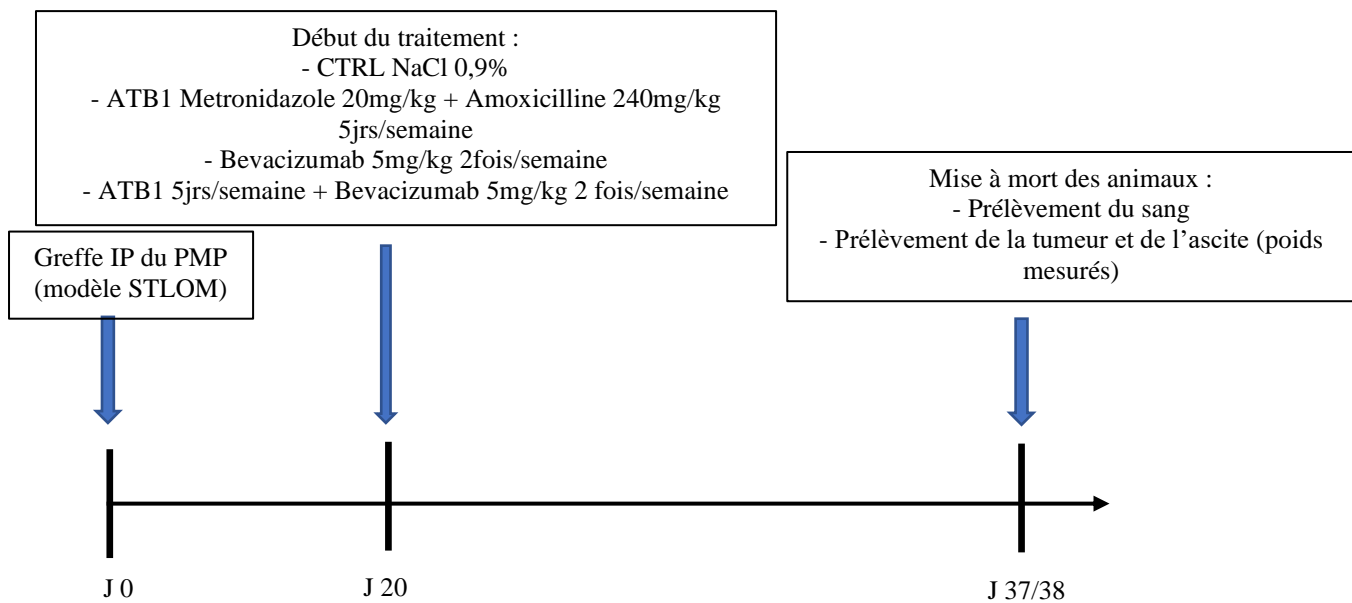


Figure 23 : Schéma expérimental de la troisième expérience : Effet de l'ATB1 et du Bevacizumab seuls ou en association sur l'évolution du PMP (modèle STLOM).

Le suivi du poids des souris traitées ou contrôles en fonction du temps ainsi que la mesure du poids de la tumeur et de l'ascite et les dosages du VEGF et de l'ACE nous ont permis d'obtenir les graphiques ci-dessous (Figure 24).

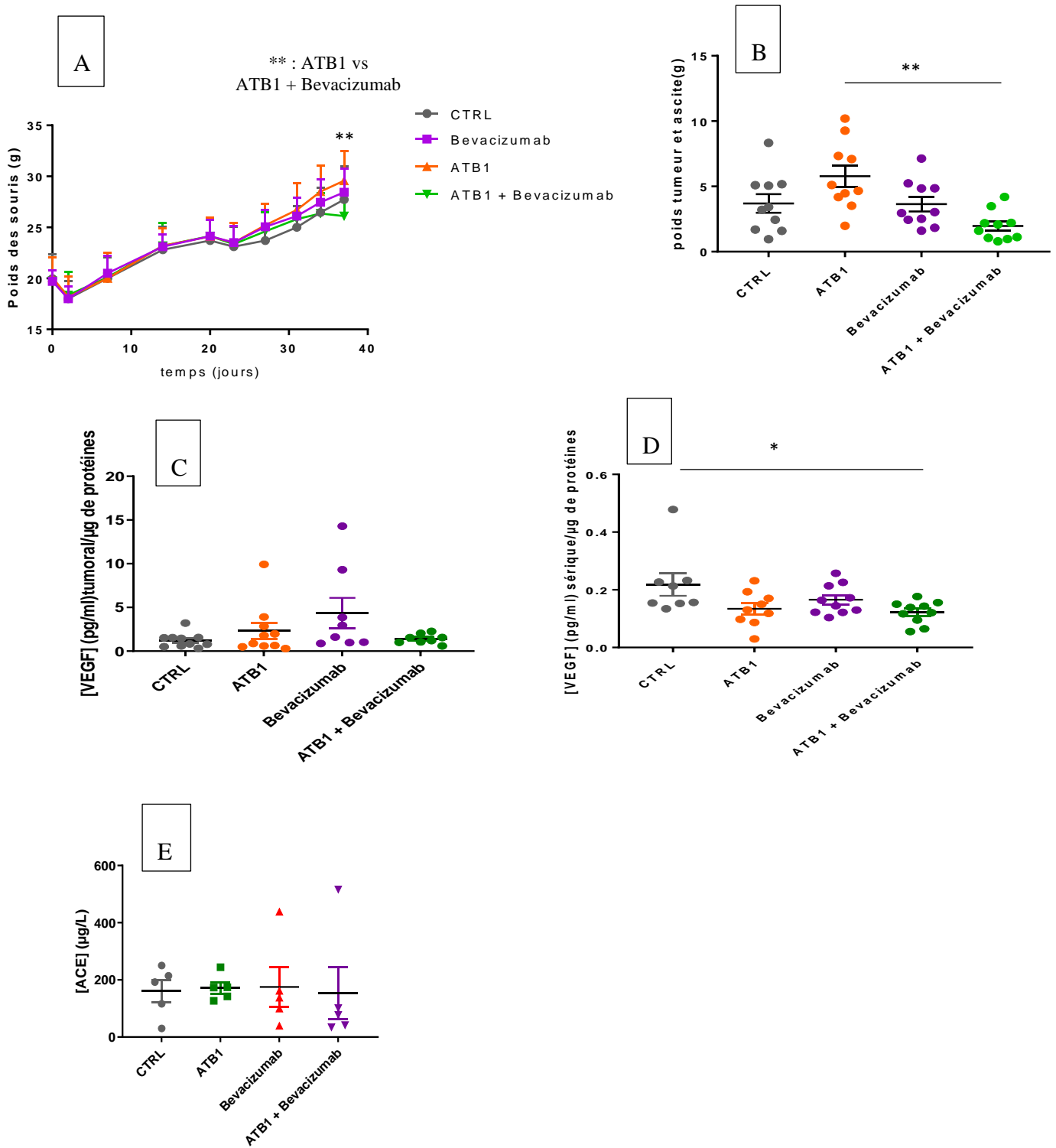


Figure 24 : Graphes représentant l'effet de l'ATB1 seul ou en association avec le Bevacizumab sur l'évolution du PMP (modèle STLOM) greffés à des souris nudes. A) Courbes représentant le poids des souris greffées par le modèle STLOM en fonction du temps (Test Anova). B) Nuage de points représentant les poids des tumeurs et d'ascite, la concentration en VEGF tumoral (C) ou sérique (D) et la concentration d'ACE sérique (E) mesurées par souris greffées par le modèle STLOM traitées par l'ATB1 ou le Bevacizumab seuls ou en association à la fin de l'expérience (Test de Kruskal Wallis).

Nous pouvons observer une différence significative entre les souris traitées par l'ATB1 et celles traitées par l'association « ATB1 + Bevacizumab » par rapport au poids des souris et le poids de la tumeur et l'ascite à J37 (fin de l'expérience) (Figures 24A et 24B). Nous n'observons pas de différence significative par rapport au groupe CTRL. Néanmoins, les nuages de points montrent une variabilité importante au sein même du groupe CTRL premièrement (Figure 24B). Il est alors difficile d'analyser l'effet d'un traitement si dans le groupe CTRL toutes les souris n'ont pas développé de tumeur de façon homogène. Cependant, nous observons que le niveau de VEGF sérique est significativement plus faible dans le groupe traité par la combinaison « ATB1 + Bevacizumab » par rapport au groupe CTRL. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre les différents groupes par rapport à l'ACE sérique (Figure 24E) ni par rapport au VEGF tumoral (Figure 24C). Ce modèle semble très hétérogène. Cependant, concernant les souris traitées par l' « ATB1 + Bevacizumab », les nuages de points sont très rapprochés, ce qui semble montrer un effet des traitements.

Nous avons pu observer une ressemblance encore une fois avec les précédentes expériences par rapport au type d'ascite obtenue. En effet, chez les souris CTRL (Figure 25A) elle était majoritairement hémorragique, semblable cependant à celle observée chez les souris traitées par l'ATB1 seul (Figure 25B). Pour les souris traitées par le Bevacizumab (Figure 25C), nous retrouvons des ascites hémorragiques comme non hémorragiques et enfin pour les souris traitées par la combinaison (Figure 25D), nous observons une quantité d'ascite moins importante et non hémorragique. Nous pouvons supposer qu'il y ait un effet synergique de ces deux traitements : Le mélange d'antibiotiques (Métronidazole + Amoxicilline) et l'anti-angiogénique Bevacizumab.

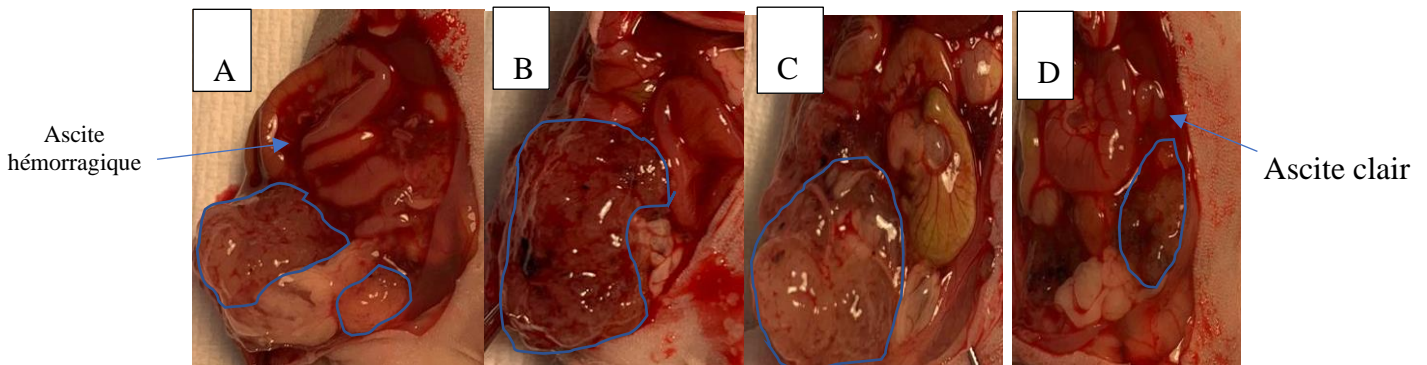


Figure 25 :Photos illustratives de l'abdomen des souris contenant la tumeur et l'ascite en fonction du groupe de traitement (ATB1 seul ou en association avec le Bevacizumab). Les tumeurs sont entourées en bleues. A : CTRL : Ascite hémorragique ; B : après traitement par l'ATB1 : ascite hémorragique ; C : Après traitement par le Bevacizumab : ascite hémorragique et non hémorragique ; D : après traitement par ATB1 et Bevacizumab : Ascite non hémorragique en quantité moins importante.

De ce fait, nous pouvons conclure que le groupe « ATB1 + Bevacizumab » semble induire une diminution du poids tumoral et une diminution de la concentration en VEGF sérique des souris.

d) Evaluation de l'effet d'un autre antibiotique, appelé ATB2 et du Sorafenib seuls ou en association sur l'évolution du PMP (modèle de « morceaux » de tumeur gélatineuse STLOM)

En parallèle aux expériences *in vivo*, nous avons testé de mettre en culture le modèle STLO et STLOM sans antibiotiques. Le surnageant a été envoyé au service de bactériologie de l'hôpital Lariboisière. Le bactériologiste, M. Hervé JACQUIER, a réussi à identifier les germes suivants : Escherichia Coli, Enterococcus faecalis et Pseudomonas luteola, qui sont toutes les 3 des souches appartenant au phylum des Protéobactéries. Il nous a également informé de la sensibilité de ces germes aux bêta-lactamines et aux aminosides. C'est pour cela que nous avons souhaité tester une autre combinaison de traitement. Vu que nous disposions facilement du mélange d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine, nous avons décidé de tester ce mélange sur le modèle STLOM : l'ATB2 (Mélange de Pénicilline 10Ui/ml/ Streptomycine 10µg/ml) seul ou en association avec le Sorafenib.

Ci-dessous le schéma expérimental (Figure 26) :

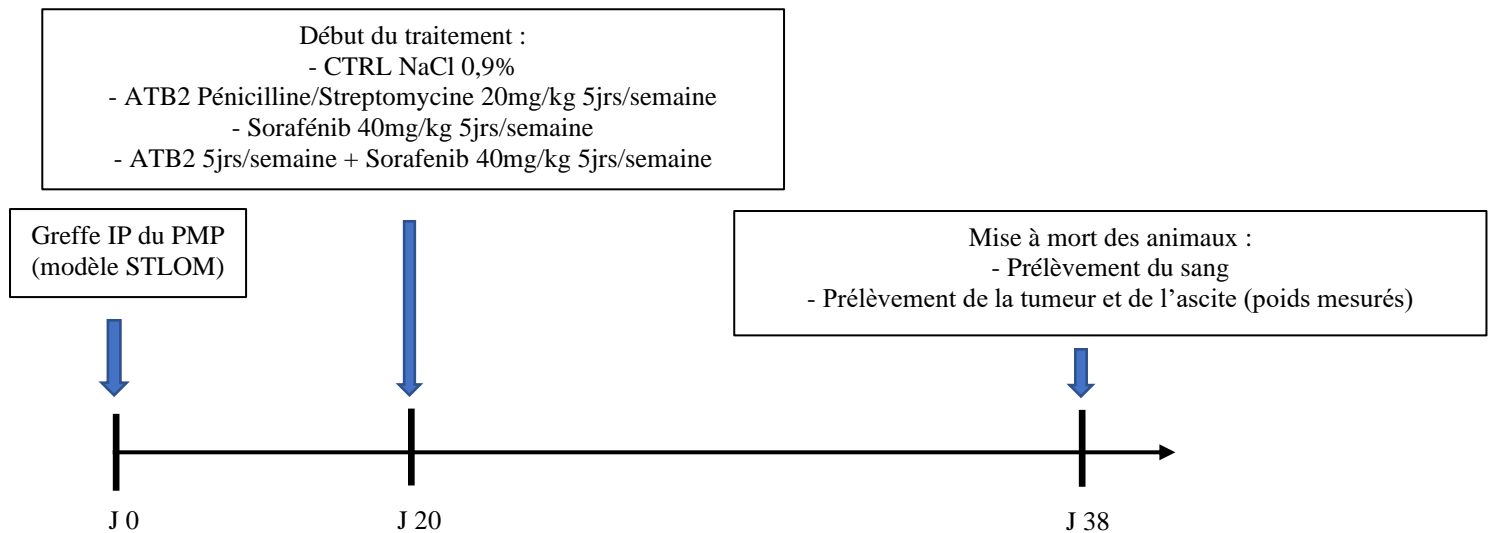


Figure 26 : Schéma expérimental de la quatrième expérience : Effet de l'ATB2 et du Sorafenib seul ou en association sur l'évolution du PMP (modèle STLOM).

Le suivi du poids des souris traitées ou contrôles en fonction du temps, la mesure du poids de la tumeur et de l'ascite ainsi que les dosages du VEGF sérique et tumoral nous ont permis d'obtenir les graphiques ci-dessous (Figure 27) :

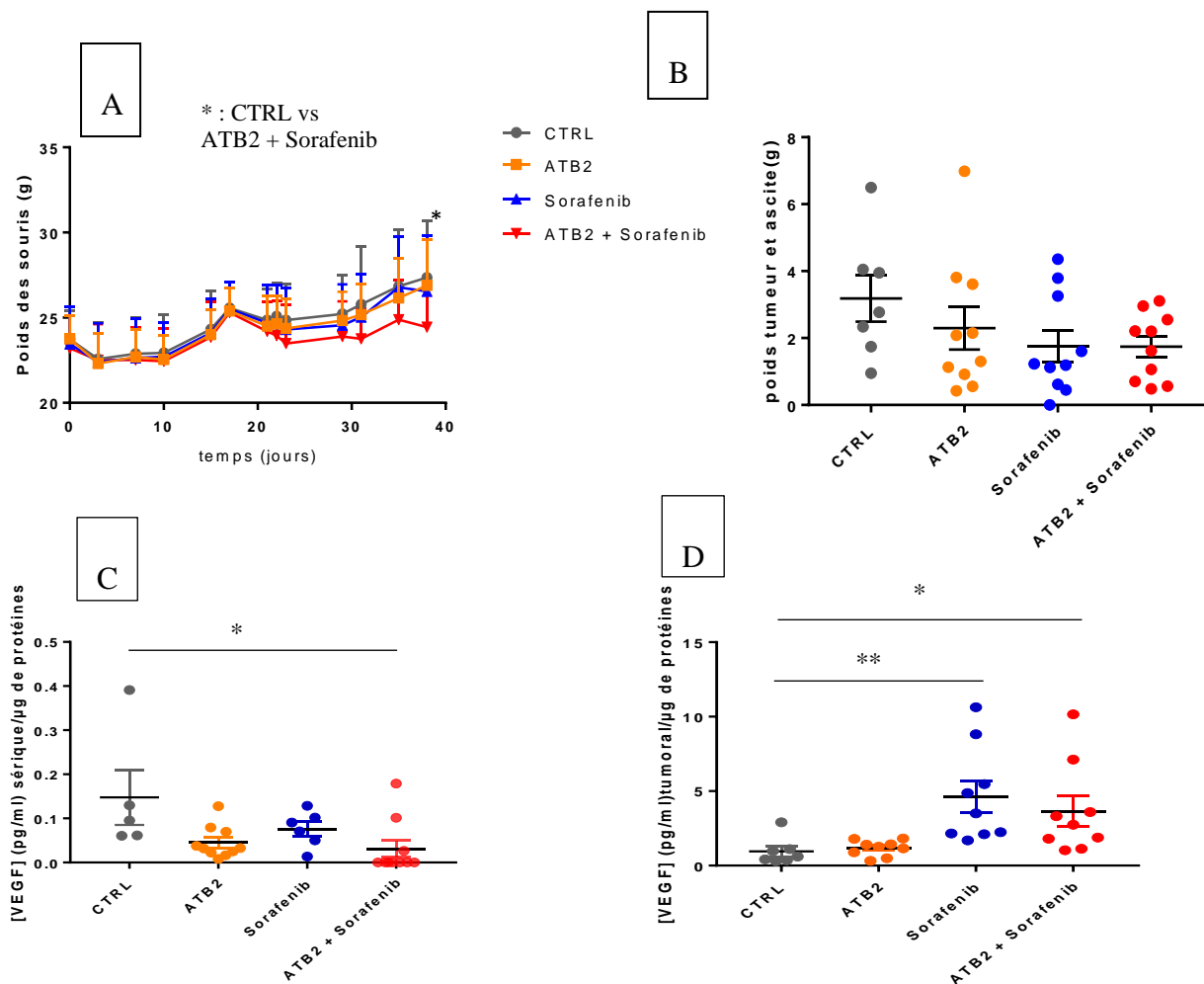


Figure 27 : Graphes représentant l'effet de l'ATB2 seul ou en association avec le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLOM) greffés à des souris nues. A) Courbes représentant le poids des souris greffées par le modèle STLOM en fonction du temps (Test Anova). B) Nuage de points représentant les poids des tumeurs et d'ascite ; C) la concentration sérique en VEGF et D) la concentration tumorale en VEGF mesurées par souris greffées par le modèle STLOM traitées par l'ATB2 ou le Sorafenib seuls ou en association à la fin de l'expérience (Test Kruskal Wallis).

Nous pouvons observer que le poids des souris traitées par la combinaison est significativement plus faible par rapport au poids des souris CTRL à J38 (Figure 27A). Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les différents groupes de traitement par rapport au groupe CTRL concernant le poids de la tumeur et de l'ascite obtenu à la fin de l'expérience (Figure 27B). Plus précisément, nous pouvons observer une hétérogénéité (nuage de points étendu) dans chacun des groupes, même les groupes de traitement. Afin d'expliquer cette hétérogénéité, nous pouvons émettre l'hypothèse que le traitement a commencé trop tard.

Nous avons tout de même effectué un dosage du VEGF dans le sérum et la tumeur des souris. Nous observons que la concentration en VEGF sérique est significativement plus faible dans le groupe « ATB2 + Sorafenib » par rapport au groupe CTRL (Figure 27C). Cependant, elle est significativement plus élevée dans la tumeur dans les groupes traités par la combinaison et par le Sorafenib seul par rapport au groupe CTRL (Figure 27D).

Néanmoins, au regard de ces trois dernières expériences, nous pouvons émettre l'hypothèse que la combinaison anti-angiogénique et antibiotique semble induire un effet inhibiteur sur l'évolution du PMP.

e) Evaluation de l'effet de l'ATB2 en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib commencés plus tôt après la greffe sur l'évolution du PMP (modèle de « morceaux » de tumeur gélatineuse STLOM)

Suite aux derniers résultats où nous nous sommes retrouvés face à des résultats hétérogènes dans le groupe CTRL mais aussi dans les autres groupes de traitement, nous avons décidé d'effectuer la cinquième expérience de la façon suivante. Nous avons commencé le traitement plus tôt et nous avons testé seulement l'effet des combinaisons « ATB2 + Bevacizumab » et « ATB2 + Sorafenib » par rapport au groupe CTRL sur l'évolution du PMP.

Ci-dessous le schéma expérimental (Figure 28) :

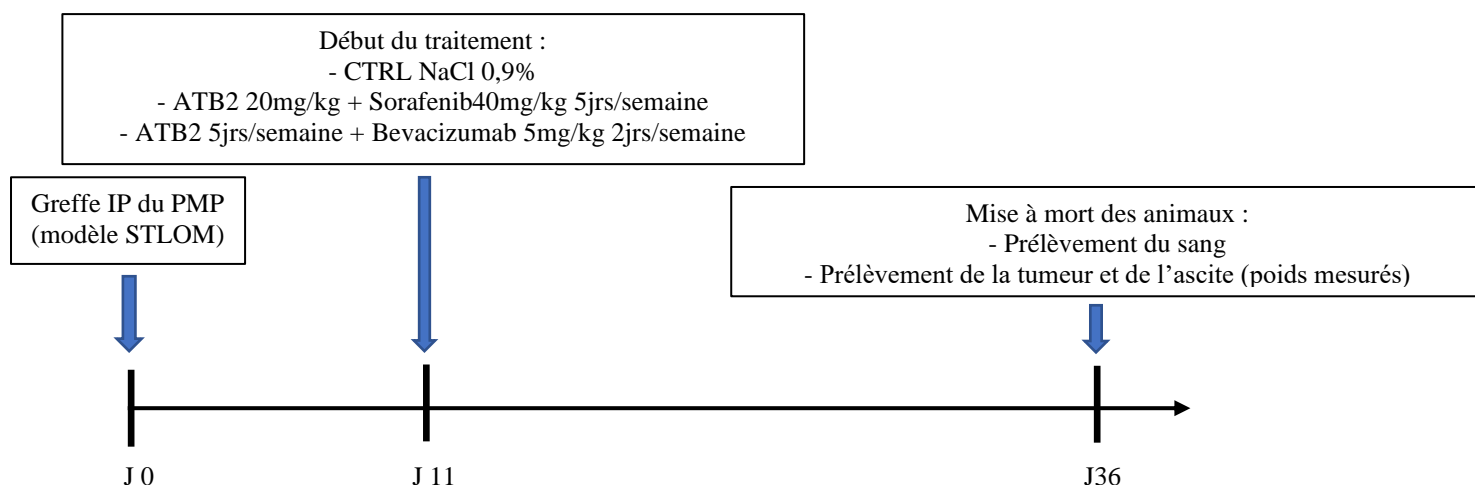


Figure 28: Schéma expérimental de la cinquième expérience : Effet de l'ATB2 en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib sur l'évolution du PMP (modèle STLOM).

Le suivi du poids des souris traitées ou contrôles en fonction du temps, la mesure du poids de la tumeur et de l'ascite ainsi que les dosages du VEGF sérique et tumoral nous ont permis d'obtenir les graphiques ci-dessous (Figure 29) :

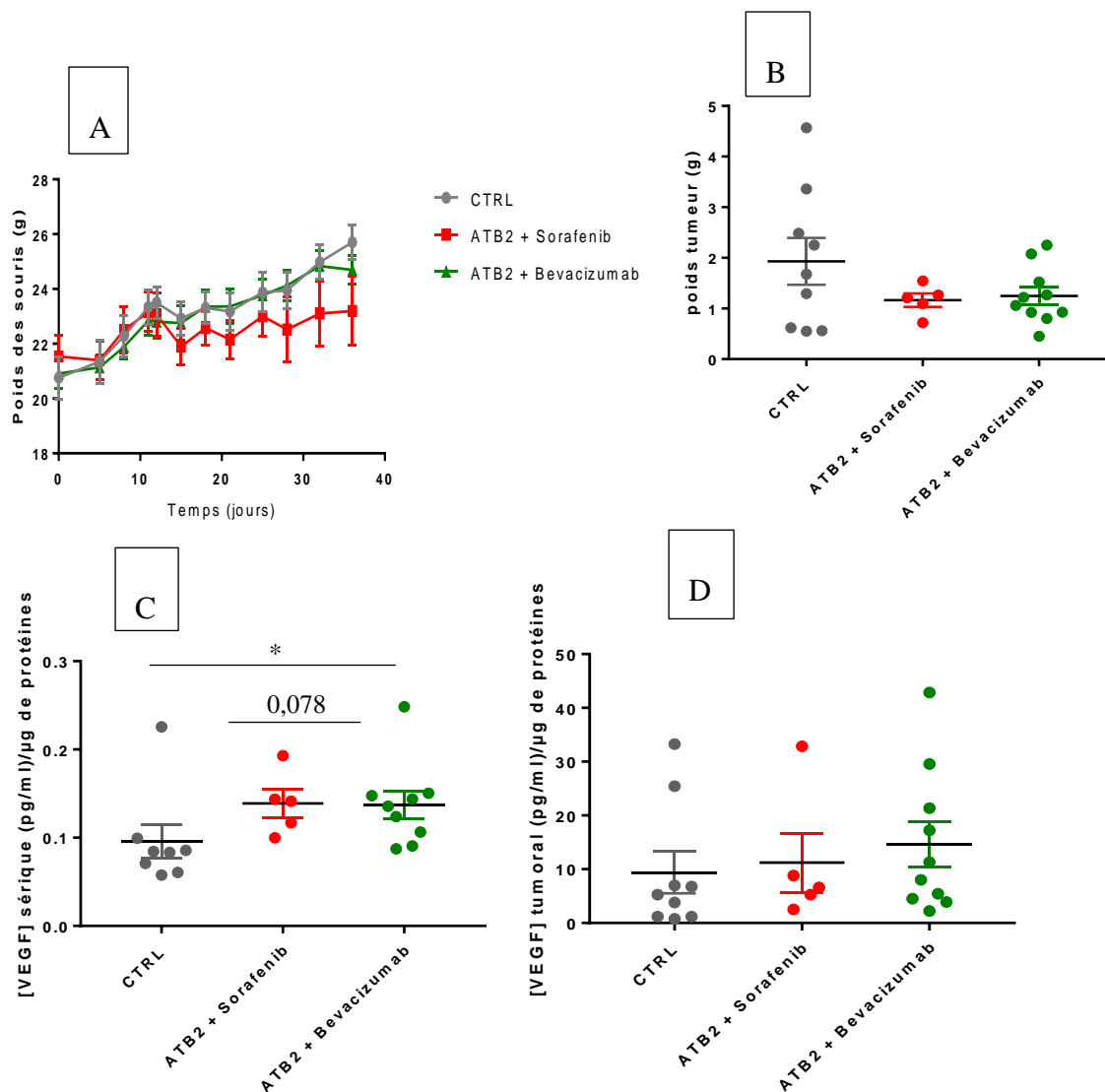


Figure 29 : Graphes représentant l'effet de l'ATB2 en association avec le Sorafenib ou le Bevacizumab sur l'évolution du PMP (modèle STLOM) greffés à des souris nudes. A) Courbes représentant le poids des souris greffées par le modèle STLOM en fonction du temps (Test Anova). B) Nuage de points représentant le poids des tumeurs ; C) la concentration sérique en VEGF et D) la concentration tumorale en VEGF mesurées par souris greffées par le modèle STLOM traitées par l'ATB2 en association avec le Sorafenib ou le Bevacizumab (Test Kruskal Wallis).

Nous pouvons observer qu'il n'y a pas de différence significative entre le poids des souris en fonction du temps entre les différents groupes (Figure 29A). Puis, nous pouvons observer que le poids tumoral des souris traitées par les combinaisons semble plus faible par rapport au CTRL mais il n'y a pas de différence significative. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cela est dû à l'hétérogénéité du groupe CTRL (Figure 29B).

Nous observons ensuite que la concentration en VEGF sérique est significativement plus élevée dans le groupe « ATB2 + Bevacizumab » par rapport au groupe CTRL (Figure 29C) et il y a également une tendance pour le groupe « ATB2 + Sorafenib » où la concentration en VEGF

semble plus élevée par rapport au groupe CTRL. Nous pouvons noter cependant que dans le groupe « ATB2 + Sorafenib », 5 souris sont décédées au cours de l'expérience pour des raisons inconnues, peut être liées au gavage du Sorafenib. De ce fait, les tests statistiques reposent sur seulement 5 valeurs pour ce groupe alors qu'il y en a 10 dans les autres groupes. Néanmoins, nous pouvons noter que les résultats observés dans cette expérience sont contraires à ceux observés dans les précédentes expériences : L'expression sérique du VEGF étaient significativement plus faible dans les combinaisons « ATB1 + Bevacizumab » (Figure 24D), la seule différence étant l'antibiotique utilisé ; et « ATB2 + Bevacizumab » (Figure 29C) par rapport au groupe CTRL respectivement. Nous pouvons noter cependant que le traitement a commencé 9 jours plus tôt dans cette expérience par rapport aux précédentes. En effet, le traitement a commencé à J9 post-greffe, comparé à J20 précédemment. Enfin, concernant la concentration tumorale de VEGF, il n'y a pas de différence entre les différents groupes.

Ainsi, nous pouvons conclure que le modèle STLOM est encore une fois très hétérogène et que les deux combinaisons de traitements « ATB2 + Sorafenib » et « ATB2 + Bevacizumab » semblent avoir un effet sur une diminution du développement du PMP chez la souris mais les résultats ne sont pas satisfaisants. C'est pour cela que nous avons souhaité tester un autre anti-angiogénique disponible dans le laboratoire : l'Aflibercept en association avec l'ATB2.

f) Evaluation de l'effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle de « morceaux » de tumeur gélatineuse STLOM)

L'Aflibercept contient une protéine de fusion recombinante composée des fragments des domaines extracellulaires des récepteurs de type 1 et 2 du VEGF humain fusionnés au fragment Fc de l'IgG1 humaine. Cette protéine agit comme un leurre avec une plus grande affinité que les récepteurs naturels pour le VEGF. Ce traitement est utilisé chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. C'est donc un bon candidat thérapeutique. Nous avons souhaité observer l'effet de ce médicament en association avec l'ATB2 sur le développement du PMP chez les souris greffées par le modèle STLOM.

Ci-dessous le schéma expérimental (Figure 30) :

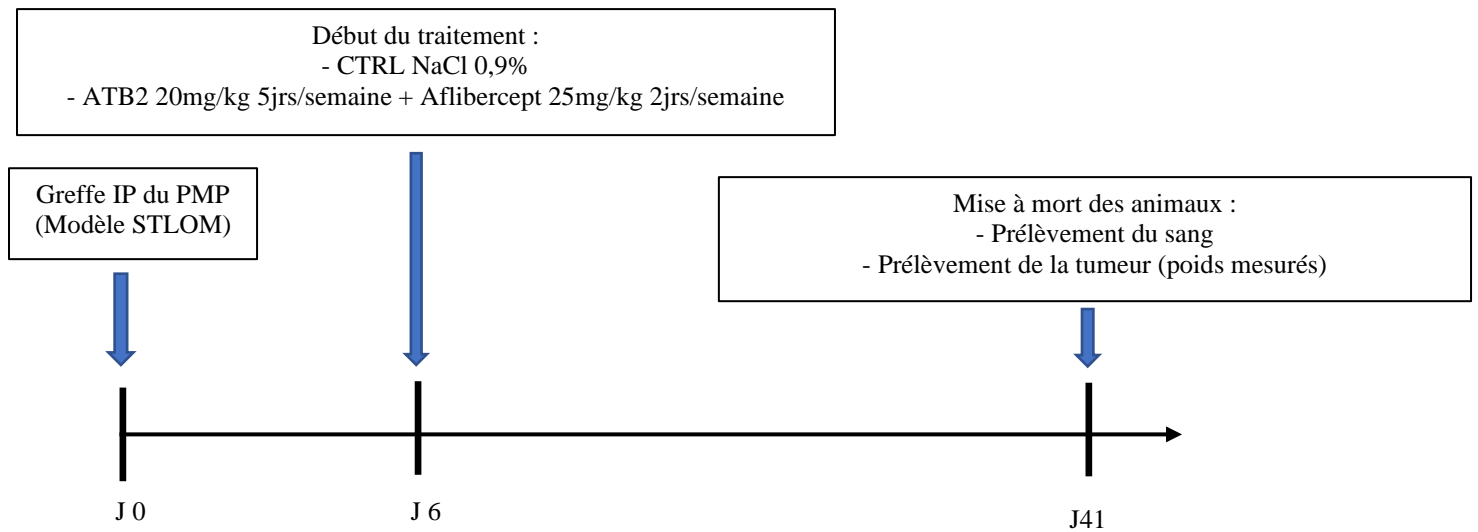


Figure 30 : Schéma expérimental de la sixième expérience : Effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle STLOM).

Le traitement a commencé plus tôt, à J6 comme la première expérience et a duré aussi plus longtemps, 35 jours.

Le suivi du poids des souris traitées ou contrôles en fonction du temps, la mesure du poids de la tumeur, des photos représentant les tumeurs obtenues par groupe ainsi que les dosages du VEGF et de l'ACE sérique et du VEGF tumoral nous ont permis d'obtenir les graphiques et photos ci-dessous (Figure 31) :

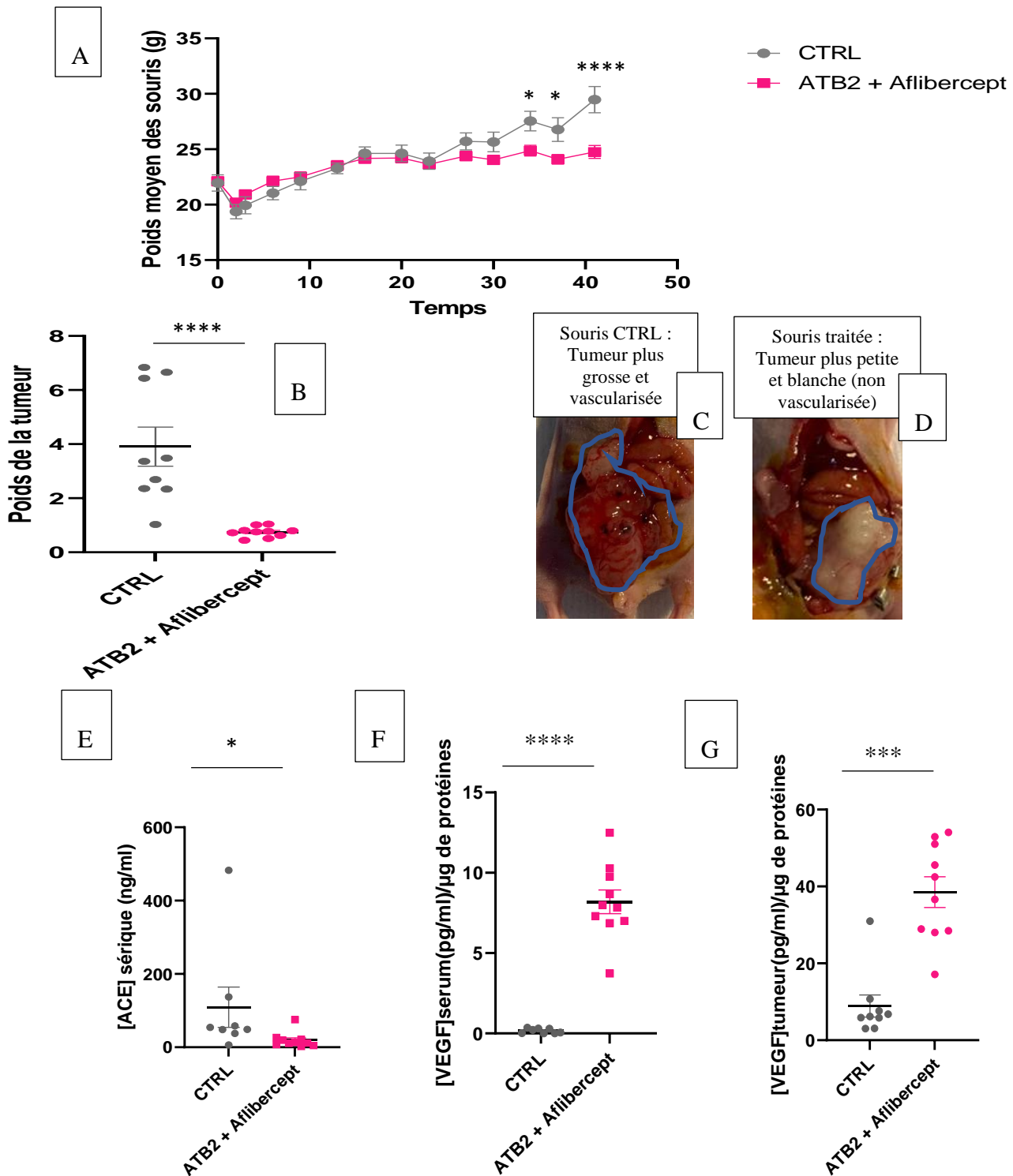


Figure 31 : Graphes représentant l'effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle STLOM) greffés à des souris nues. Les tumeurs sont entourées en bleues. A) Courbes représentant le poids des souris greffées par le modèle STLOM en fonction du temps (Test Anova). B) Nuage de points représentant les poids de la tumeur ; E) la concentration sérique en ACE, F) en VEGF et G) la concentration tumorale en VEGF mesurées par souris greffées par le modèle STLOM traitées par l'ATB2 en association avec l'Aflibercept (Test Mann Whitney). Photos représentatives de la tumeur obtenue dans le groupe CTRL (C) et traité (D).

Premièrement, nous pouvons observer sur la figure 31A que le poids des souris traitées par « ATB2 + Aflibercept » est significativement plus bas par rapport aux souris CTRL à partir de J34. En effet, le poids moyen des souris traitées est de 25g alors qu'il est de 29g pour les souris CTRL. Deuxièmement, le poids de la tumeur des souris traitées, obtenu à la fin de l'expérience, est aussi significativement plus faible par rapport aux souris CTRL (Figure 31B). Malgré une importante hétérogénéité du groupe CTRL, comme observé dans les précédentes expériences, nous observons au contraire une homogénéité des points correspondant au poids de la tumeur des souris traitées autour de 1g, alors que la moyenne est de 4g pour les CTRL. Nous pouvons observer également l'effet du traitement sur les photos représentant la tumeur obtenue, qui est plutôt grosse et vascularisée chez les souris CTRL, ou plus petite et non vascularisée (blanche) chez les souris traitées (Figures 31C et 31D respectivement).

Troisièmement, concernant le dosage sérique de l'ACE (Figure 31E), la concentration moyenne est 5 fois plus importante chez les souris CTRL (environ 100ng/ml) par rapport aux souris traitées (environ 20ng/ml). Enfin, quatrièmement, nous pouvons observer que la concentration en VEGF sérique et tumorale est beaucoup élevée chez les souris traitées par rapport aux souris CTRL, où les valeurs sont faibles pour le VEGF tumoral (environ 8pg/ml pour les CTRL vs 40 pg/ml pour les souris traitées, Cf. Figure 31G), et quasi inexistante pour le VEGF sérique (<0,35pg/ml pour les CTRL vs 8pg/ml pour les souris traitées). Nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : l'Aflibercept agit comme un leurre du récepteur au VEGF, mais cette liaison n'induit pas de signalisation du signal. De ce fait, notre hypothèse est que le VEGF est relargué, c'est pour cela qu'il est retrouvé en forte concentration dans le sérum et la tumeur alors que pour les souris CTRL le VEGF est utilisé.

Nous avons souhaité voir s'il y avait une corrélation entre la concentration en VEGF sérique ou tumorale et la concentration en ACE sérique et le poids tumoral obtenu. Pour cela, nous avons effectué des tests de Spearman (Figure 32).

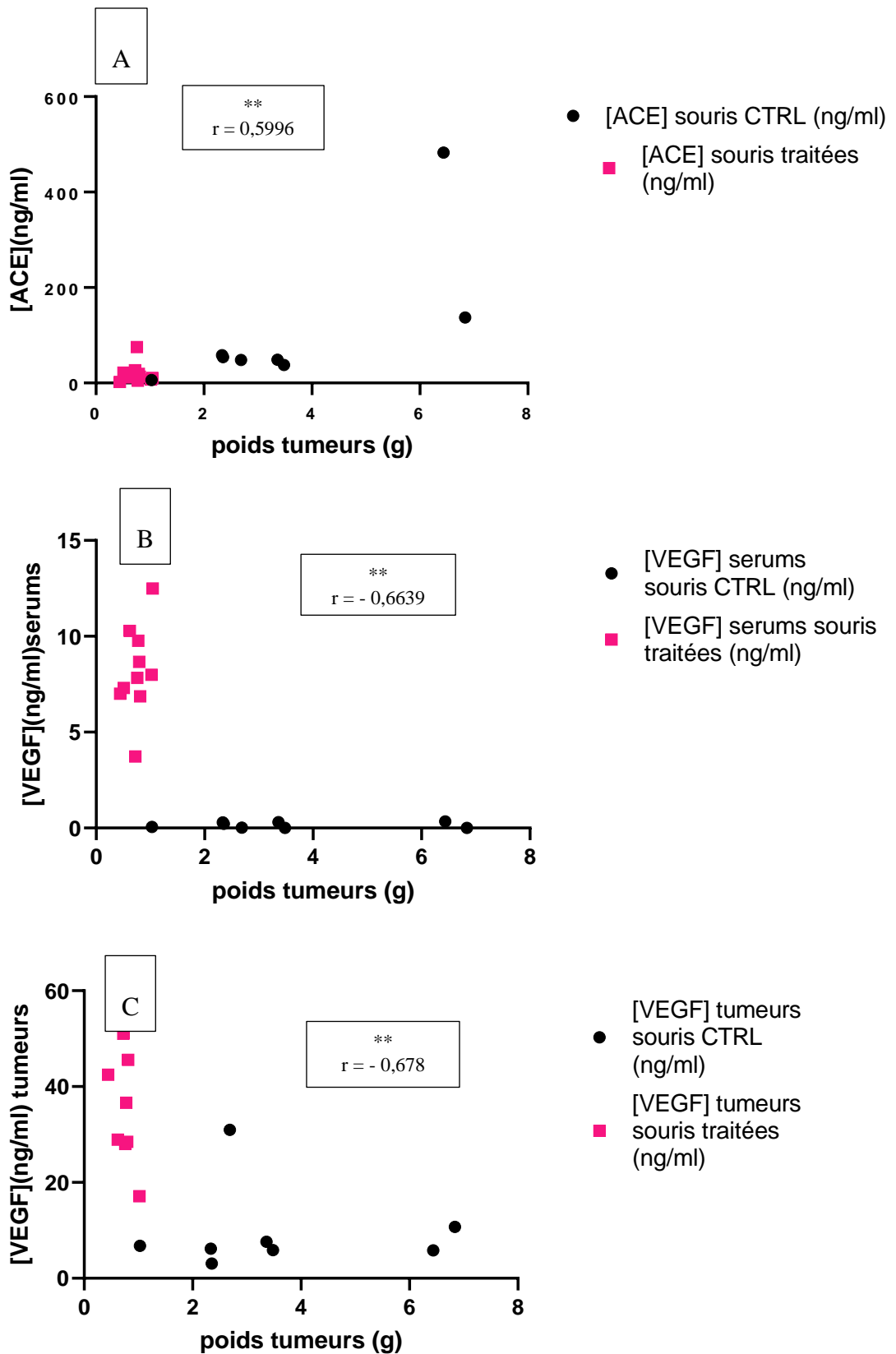


Figure 32 : Nuages de points représentant les corrélations entre la concentration en ACE sérique (A), en VEGF sérique (B) ou tumoral (C) et le poids de la tumeur des souris CTRL et traitées par l'Aflibercept et l'ATB2 (Test Spearman).

Nous pouvons observer une corrélation positive entre la concentration en ACE et le poids de la tumeur obtenu à la fin de l'expérience et une corrélation négative entre la concentration en VEGF sérique et tumorale et le poids tumoral. En effet nous observons que tous les points correspondant à un poids tumoral plus faible, c'est-à-dire correspondant aux souris traitées correspondent à une faible concentration en ACE et à une importante concentration en VEGF sérique et tumorale. Ces corrélations permettent de montrer l'efficacité du traitement utilisé sur une diminution du développement tumoral.

Nous pouvons alors conclure que la combinaison testée, « ATB2 + Aflibercept » inhibe la croissance tumorale et l'angiogenèse *in vivo* dans le modèle murin de PMP « morceaux » STLOM.

g) Evaluation de l'effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle d'ascite gélatineuse BOGH)

A la suite des résultats très encourageants obtenus précédemment, nous avons souhaité évaluer l'effet de cette combinaison thérapeutique, « ATB2 + Aflibercept » sur un autre modèle de PMP : le modèle d'ascite gélatineuse BOGH.

Ci-dessous le schéma expérimental (Figure 33) :

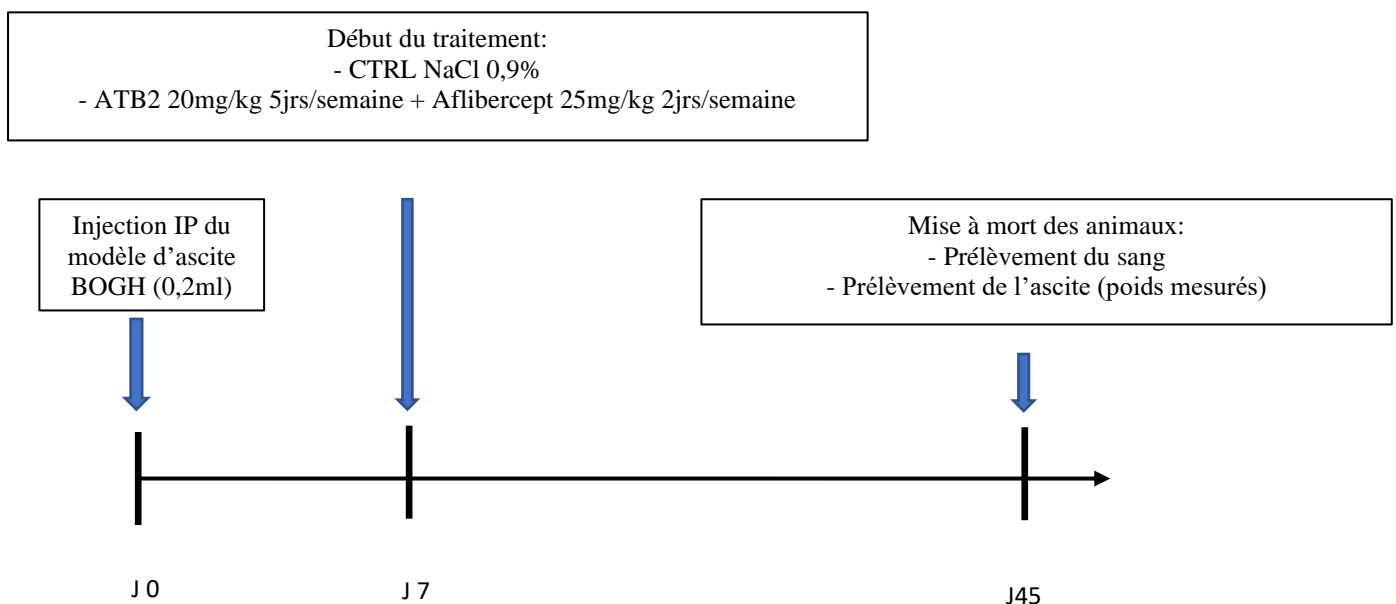


Figure 33 : Schéma expérimental de la septième expérience : Effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle BOGH).

Le suivi du poids des souris traitées ou contrôles en fonction du temps, la mesure du volume de l'ascite, des photos représentant les ascites obtenues par groupe ainsi que les dosages du VEGF et de l'ACE sérique et du VEGF tumoral nous ont permis d'obtenir les graphiques et photos ci-dessous (Figure 34) :

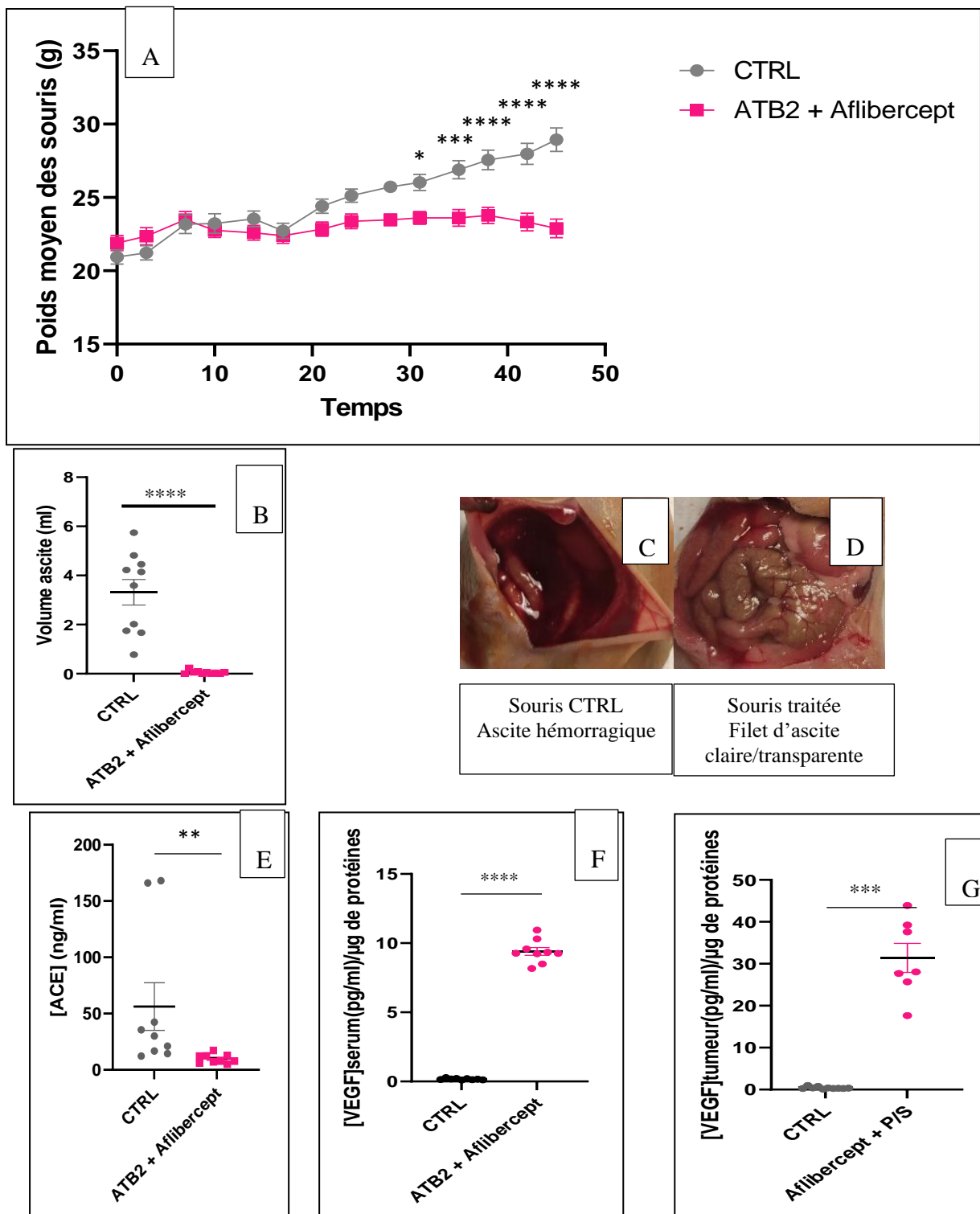


Figure 34 : Graphes représentant l'effet de l'ATB2 en association avec l'Aflibercept sur l'évolution du PMP (modèle BOGH) greffés à des souris nudes. A) Courbes représentant le poids des souris greffées par le modèle BOGH en fonction du temps (Test Anova). B) Nuage de points représentant le volume d'ascite ; E) la concentration sérique en ACE, F) en VEGF et F) la concentration tumorale en VEGF mesurés par souris greffées par le modèle BOGH traitées par l'ATB2 en association avec l'Aflibercept (Test Mann Whitney). Photos représentatives de l'ascite obtenue dans le groupe CTRL (C) et traité (D).

Premièrement, nous pouvons observer sur la figure 34A que le poids des souris traitées par « ATB2 + Aflibercept » est significativement plus bas par rapport aux souris CTRL à partir de J31. En effet, le poids moyen des souris traitées est de 23g alors qu'il est de 29g pour les souris CTRL à J45. Nous pouvons même noter une légère diminution du poids des souris traitées à partir de J42. Il aurait fallu continuer l'expérience pour voir si le poids des souris diminuait encore ou s'il était stable. Deuxièmement, le poids de l'ascite des souris traitées, obtenu à la fin de l'expérience, est aussi significativement plus faible par rapport aux souris CTRL (Figure 34B). Malgré une importante hétérogénéité du groupe CTRL dans ce modèle de PMP également, nous observons au contraire encore une fois une homogénéité des points correspondant au volume de l'ascite des souris traitées qui est quasi nulle, alors que la moyenne est de 3,5ml pour les CTRL. Nous pouvons observer également l'effet du traitement sur les photos représentant l'ascite obtenue, qui est très hémorragique chez les souris CTRL, quasi inexistante (filet clair) chez les souris traitées (Figures 34C et 34D respectivement).

Troisièmement, concernant le dosage sérique de l'ACE (Figure 34E), la concentration moyenne est aussi 5 fois plus importante chez les souris CTRL (environ 55ng/ml) par rapport aux souris traitées (environ 10ng/ml). Enfin, quatrièmement, nous pouvons observer que la concentration en VEGF sérique et tumorale est plus élevée chez les souris traitées par rapport aux souris CTRL, où les valeurs sont quasi nulles pour les souris CTRL et d'environ 10pg/ml de VEGF sérique et d'environ 30 pg/ml de VEGF tumoral pour les souris traitées. Nous pouvons émettre la même hypothèse que pour l'expérience précédente concernant le VEGF non utilisé qui serait relargué.

Nous avons souhaité voir s'il y avait également une corrélation entre la concentration en VEGF sérique ou tumorale et la concentration en ACE sérique et le volume d'ascite obtenu. Pour cela, nous avons effectué des tests de Spearman (Figure 35).

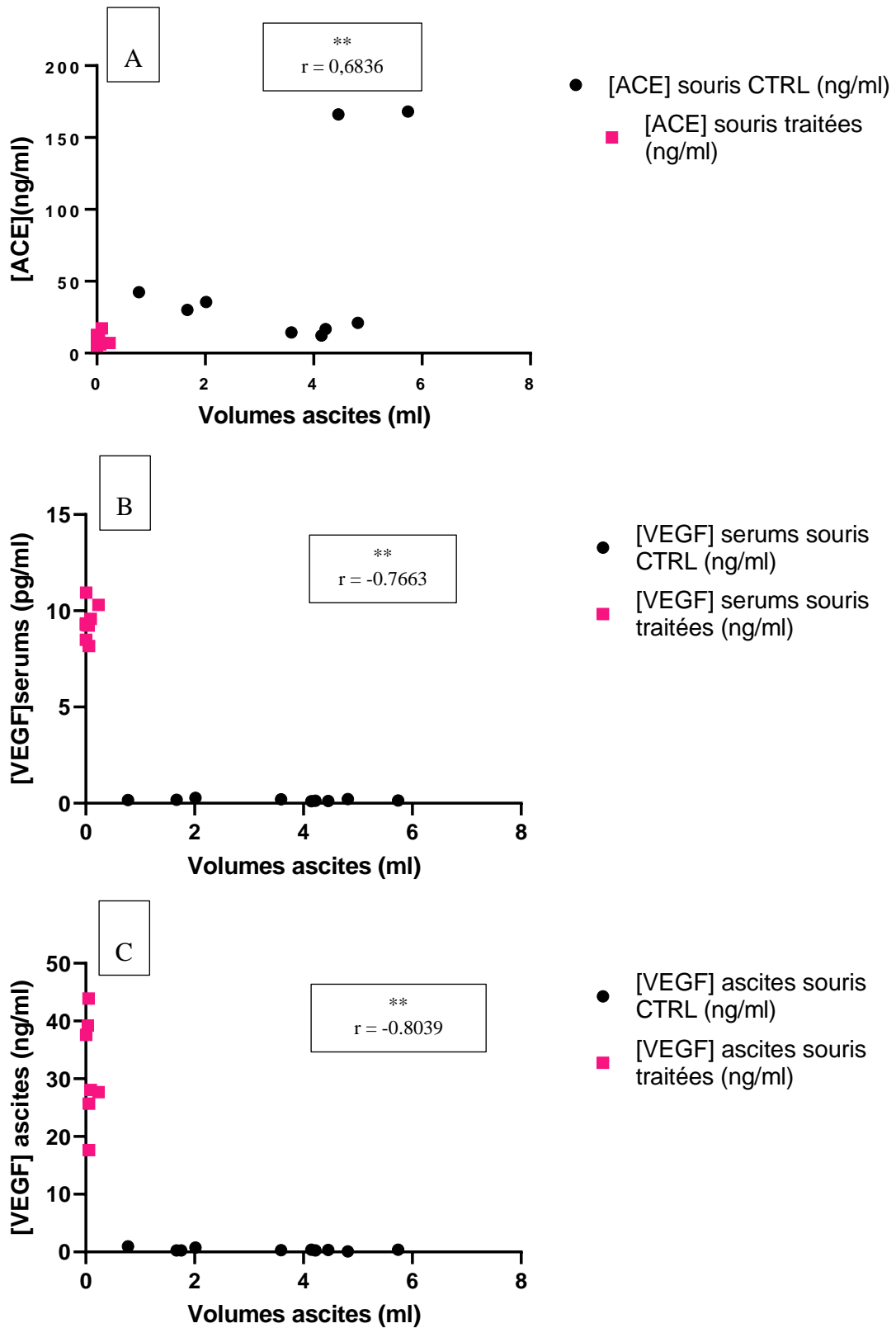


Figure 35 : Nuages de points représentant les corrélations entre la concentration en ACE sérique (A), en VEGF sérique (B) ou tumoral (C) et le volume de l'ascite des souris CTRL et traitées par l'Aflibercept et l'ATB2 (Test Spearman).

De la même façon que dans l'expérience précédente, nous pouvons observer une corrélation positive entre la concentration en ACE et le volume d'ascite obtenu à la fin de l'expérience et une corrélation négative entre la concentration en VEGF sérique et tumorale et le volume d'ascite. En effet nous observons que tous les points correspondants à un volume d'ascite plus faible, voire quasi nul, c'est-à-dire correspondant aux souris traitées correspondent à une faible concentration en ACE et à une importante concentration en VEGF sérique et tumorale. Ces corrélations permettent de montrer l'efficacité du traitement utilisé sur une diminution du développement tumoral.

Nous pouvons alors conclure que la combinaison testée, « ATB2 + Aflibercept » inhibe la croissance tumorale et l'angiogenèse *in vivo* dans le modèle murin de PMP d'ascite gélatineuse BOGH, de la même manière que pour le modèle « morceaux » STLOM.

En conclusion de cette partie, nous pouvons affirmer que la combinaison « antibiotique + anti-angiogénique », plus précisément l'« ATB2 + Aflibercept » est efficace sur l'inhibition du développement tumoral et l'angiogenèse dans le PMP car ce traitement a montré une efficacité sur les deux modèles STLOM et BOGH. Les autres traitements utilisés « ATB1 + Bevacizumab » et « ATB1 + Sorafenib » sur le modèle STLO d'ascite gélatineuse ont également été efficace, nous avons pu observer une diminution du volume d'ascite obtenu à la fin de l'expérience et une diminution du taux d'ACE dans la première expérience. Il faudrait effectuer les dosages du VEGF sérique et tumoral pour ces deux expériences afin de valider l'effet du traitement notamment sur l'angiogenèse. Cependant les traitements « ATB2 + Bevacizumab » ou encore « ATB2 + Sorafenib » testés sur le modèle STLOM semblent avoir un léger effet sur une diminution du développement tumoral mais les résultats ne sont pas satisfaisants et ce modèle trop hétérogène.

2) Quelles sont les cytokines qui ont un rôle dans le développement tumoral du PMP ?

Afin d'identifier des cytokines qui auraient un rôle dans le développement du PMP, nous avons réalisé un cytokine array qui permet de tester le niveau de 40 cytokines différentes. Le kit dispose de 4 membranes contenant les 40 anticorps correspondants aux 40 cytokines. Nous avons pour cela mélangé 20 µl de chaque sérum ou 20 µl de chaque lysat protéique de la tumeur ou de l'ascite et séparé en fonction du groupe, souris CTRL ou traitées à partir des échantillons des deux dernières expériences où nous avons observé une réelle efficacité du traitement. Ces mélanges d'échantillons ont été dosés et la même quantité de protéine a été déposée sur les 4 membranes selon les conditions suivantes :

- Sérum souris CTRL
- Sérum souris traitées
- Tumeur souris CTRL
- Tumeur souris traitées.

Les graphes ci-dessous (Figure 36) montrent le niveau de cytokines qui sont détectables par cette technique.

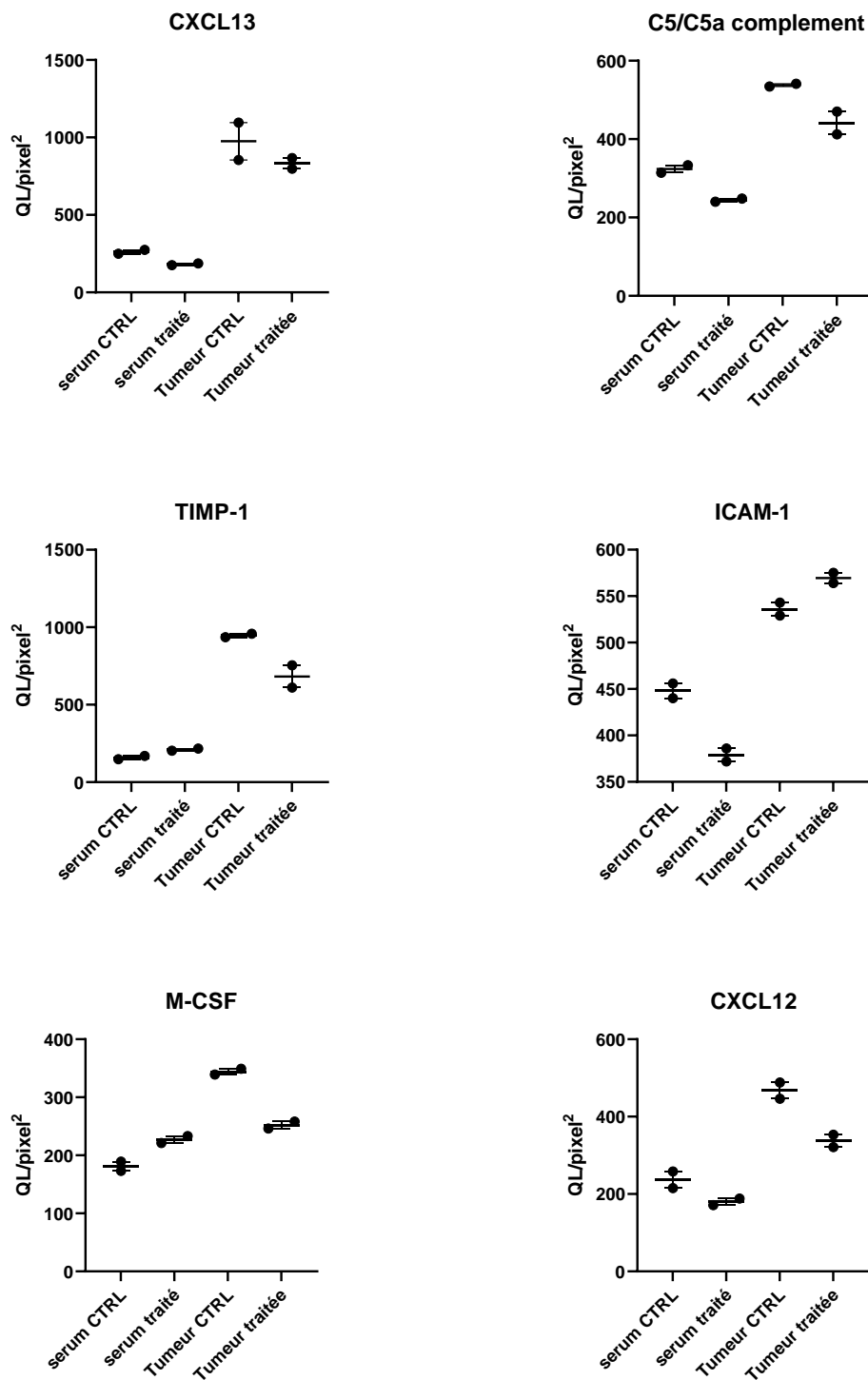


Figure 36 : Graphiques représentant les cytokines qui sont détectées dans les mélanges d'échantillons de sérum ou de tumeur/ascite des deux dernières expériences.

Nous avons identifié 6 cytokines : CXCL13, CXCL12, le complément C5/C5a, TIMP-1, ICAM-1 et M-CSF, qui ont toutes un rôle dans la progression tumorale, l'angiogenèse ou le recrutement des leucocytes ou encore la résistance à la chimiothérapie. On les retrouve en plus grande quantité dans le microenvironnement tumoral, c'est pour cela que l'on peut observer une quantité plus importante dans la tumeur comparée au sérum (Figure 36).

CXCL13 et CXCL12 sont des chimiokines, c'est-à-dire qu'elles vont permettre notamment le recrutement des leucocytes. Leur liaison à leur récepteur va aussi activer les voies de signalisation pour stimuler l'angiogenèse tumorale, la prolifération des cellules tumorales et la chimiorésistance (Meng, W et al. 2018 et Zhu, D. et al 2018).

ICAM-1 (Molécule d'adhésion cellulaire intercellulaire-1) est une molécule transmembranaire qui appartient à la famille des immunoglobulines. Elle participe à de nombreux processus importants comme la signalisation cellulaire ou la transmigration endothéliale leucocytaire. Elle est fortement exprimée dans les états inflammatoires et les tumeurs malignes (Kotteas, E et al. 2014).

Le complément C5a est un composant essentiel de la lutte contre les pathogènes et les cellules anormales conduisant à leur lyse. Cette molécule a donc été considérée comme anti-tumorale. Cependant, son rôle a été controversé. Il aurait un rôle pro-tumoral dans certains cancers (Daugan, M et al. 2017).

TIMP-1 (Inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase matricielle 1) est surexprimé dans certains cancers comme celui du sein ou du côlon et est un facteur pronostic péjoratif. Il pourrait induire *via* les voies FAK-PI3K/AKT et MAPK une stimulation de la prolifération tumorale et de l'angiogenèse et une inhibition de l'apoptose (Song, G et al. 2016).

Enfin, M-CSF (facteur de stimulation des macrophages) stimule la croissance et la différenciation de la lignée des monocytes et favorise la survie, la prolifération et les fonctions des monocytes et macrophages matures. Il posséderait une activité anti-tumorale (Evan, B. 2012).

Ces cytokines ont un rôle important dans le cancer en général. Cependant, nous n'observons pas de différence significative entre les groupes CTRL et traités. De ce fait, nous ne pouvons pas conclure sur le rôle effectif de ces cytokines dans le développement du PMP.

Afin d'en être sûre et être plus précis, il faudrait effectuer des ELISAs afin de doser chacune des cytokines dans chaque sérum et chaque lysat tumoral.

3) Les bactéries ont-elles été identifiées après mise en culture par le service de bactériologie ou par HIS (viewRNA ISH Tissue Assay) ?

a) Identification de bactéries après mise en culture du modèle de PMP cultivé en présence ou absence d'antibiotique.

Malgré l'hypothèse de la présence de bactéries dans le péritoine, cavité normalement stérile, nous ne retrouvons pas d'infection ni d'abcès dans le péritoine des souris. De ce fait,

nous pouvons alors émettre l'hypothèse que dans la cavité péritonéale il y a un équilibre avec le système immunitaire. Lorsque la tumeur est mise en culture, donc en dehors du péritoine, elle perd cet équilibre. De ce fait, les bactéries peuvent proliférer.

C'est pour cela que nous avons testé de mettre en culture le modèle STLO et STLOM sans antibiotiques. Le surnageant a été envoyé au service de bactériologie de l'hôpital Lariboisière. Le bactériologiste, M. Hervé JACQUIER, a réussi à identifier les germes suivants : Escherichia Coli, Enterococcus faecalis et Pseudomonas luteola, qui sont toutes les 3 des souches appartenant au phylum des Protéobactéries. Des germes comme Corynebacterium amycolatum ou Staphylococcus cohnii ont aussi été identifiées mais ce sont des contaminations liées probablement au prélèvement, ce sont des germes commensaux de la peau.

Ce qui est intéressant, c'est que les germes identifiés étaient dans les modèles cultivés dans du milieu sans antibiotique (mélange de Pénicilline Streptomycine). Concernant les modèles cultivés avec des antibiotiques, les cultures sont négatives. Ce mélange d'antibiotiques serait alors efficace contre les bactéries présentes dans les tumeurs.

b) Identification des bactéries par HIS (ViewRNA ISH Tissue Assay)

Nous avons effectué cette hybridation *in situ* (HIS) moderne et plus sensible sur des coupes de pseudomyxome de patients, mais aussi sur des coupes d'amygdales où nous étions sûres de la présence de bactéries et d'estomac afin de tester la sonde d'*Helicobacter pylori*. Ci-dessous les photos représentant les résultats sur une coupe d'amygdale (Figure 37) :

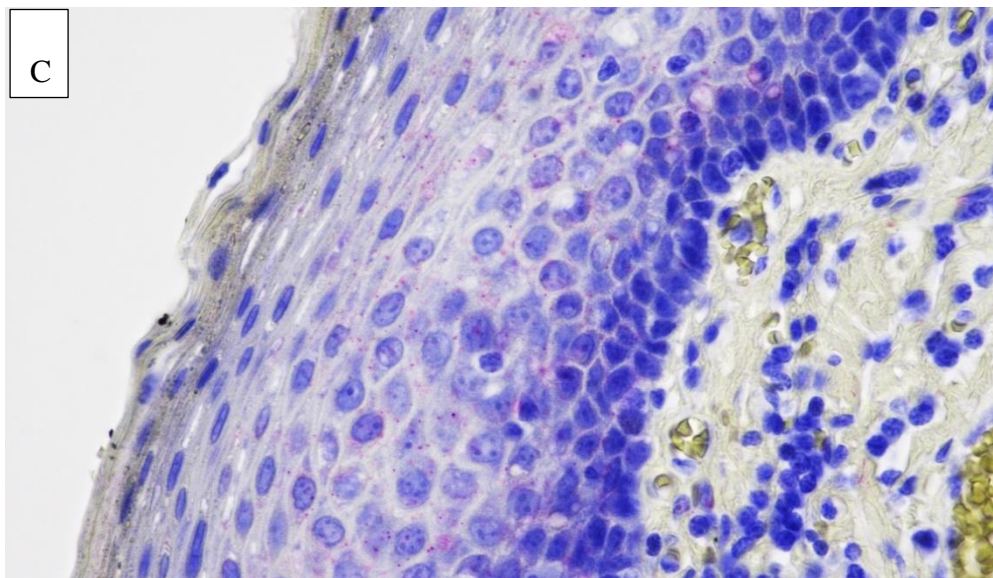
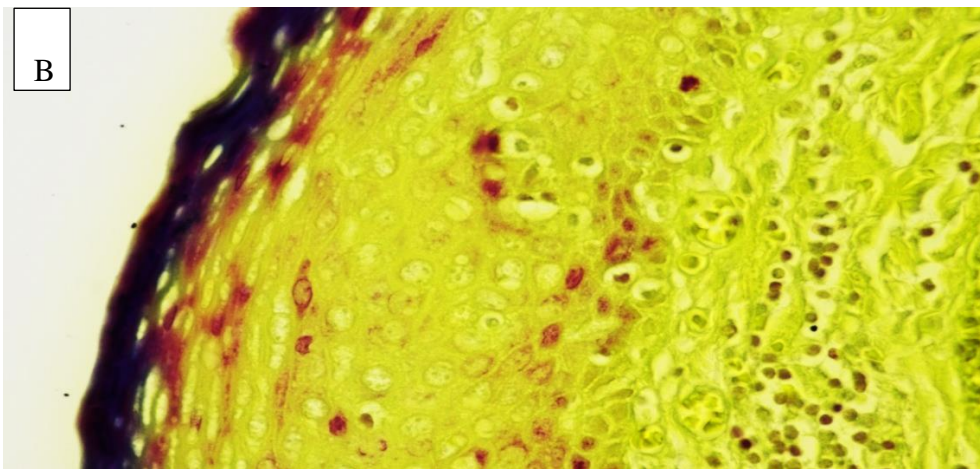
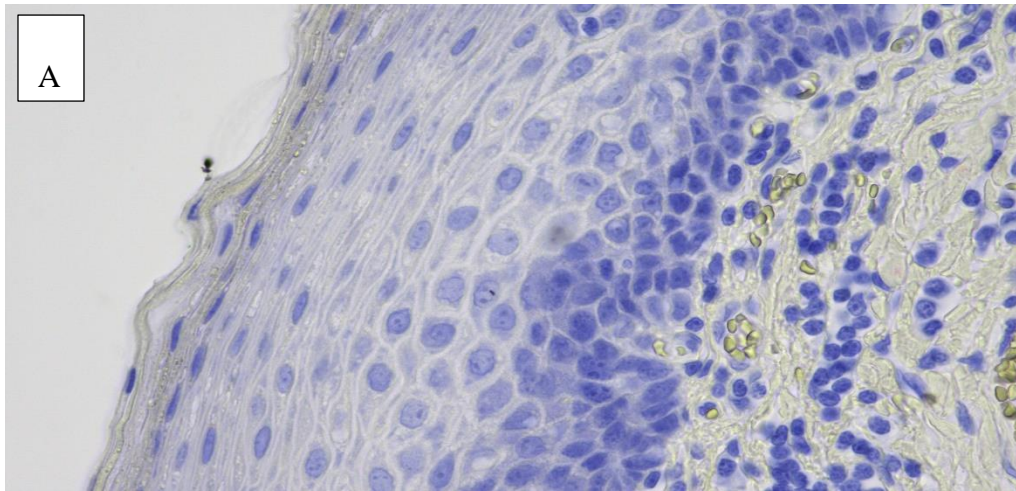


Figure 37 : Photos représentatives d'une amygdale avec présence de bactéries détectées par la coloration Brown - Brenn (B) ou par ViewRNA HIS Tissue Array avec la sonde RNA 16S qui ciblent toutes les bactéries (C) ; contrôle négatif (A) Objectif X40

Nous pouvons observer premièrement qu'il n'y a pas de marquage sur la coupe correspondante au contrôle négatif (Figure 37A) : Nous pouvons alors interpréter les résultats. Sur la Figure 37C nous pouvons observer la présence de plusieurs points roses qui montrent la présence de plusieurs bactéries car un point correspond à l'identification d'une bactérie (Matériels et Méthodes). La coloration réalisée sur la Figure 37B nous montre la présence de bactéries gram – (coloration rouge). Les bactéries ne correspondent cependant pas aux mêmes localisations identifiées sur la figure 37C, mais cela peut être lié à la sensibilité de la technique d'HIS comparé à une simple coloration qui est moins sensible.

Une autre zone de la coupe d'amygdale a été mise en évidence (Figure 38).

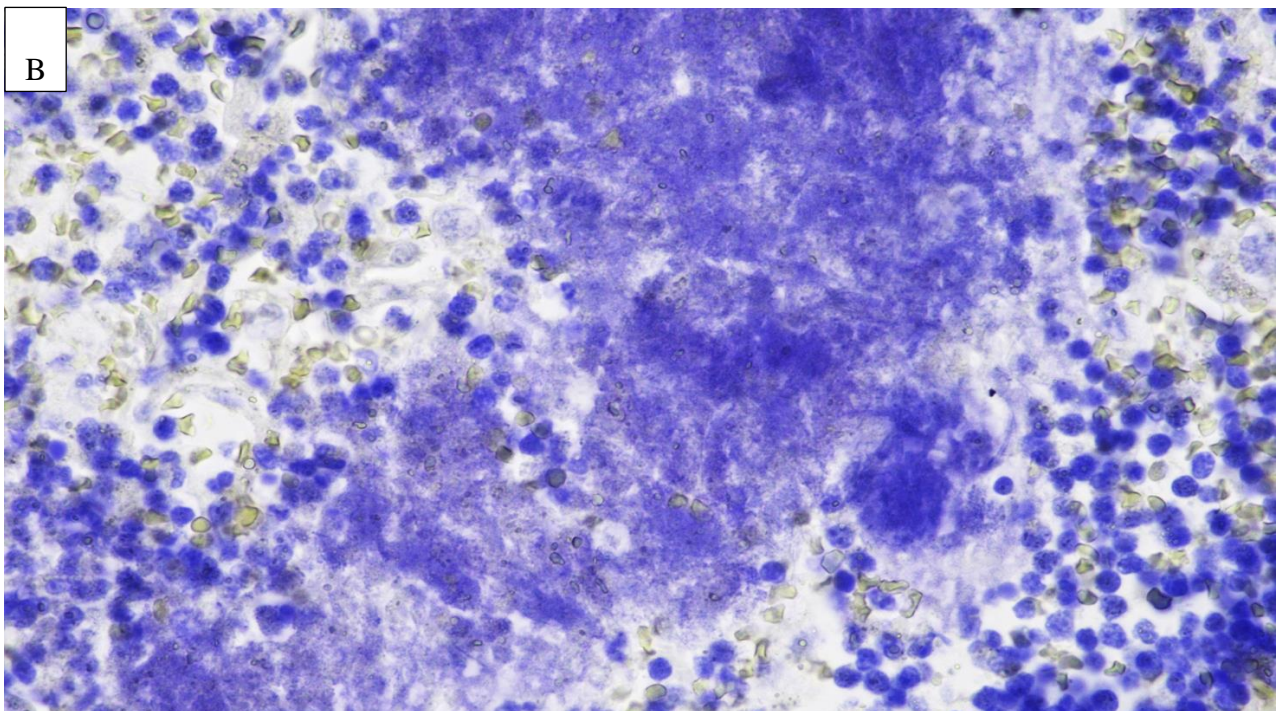
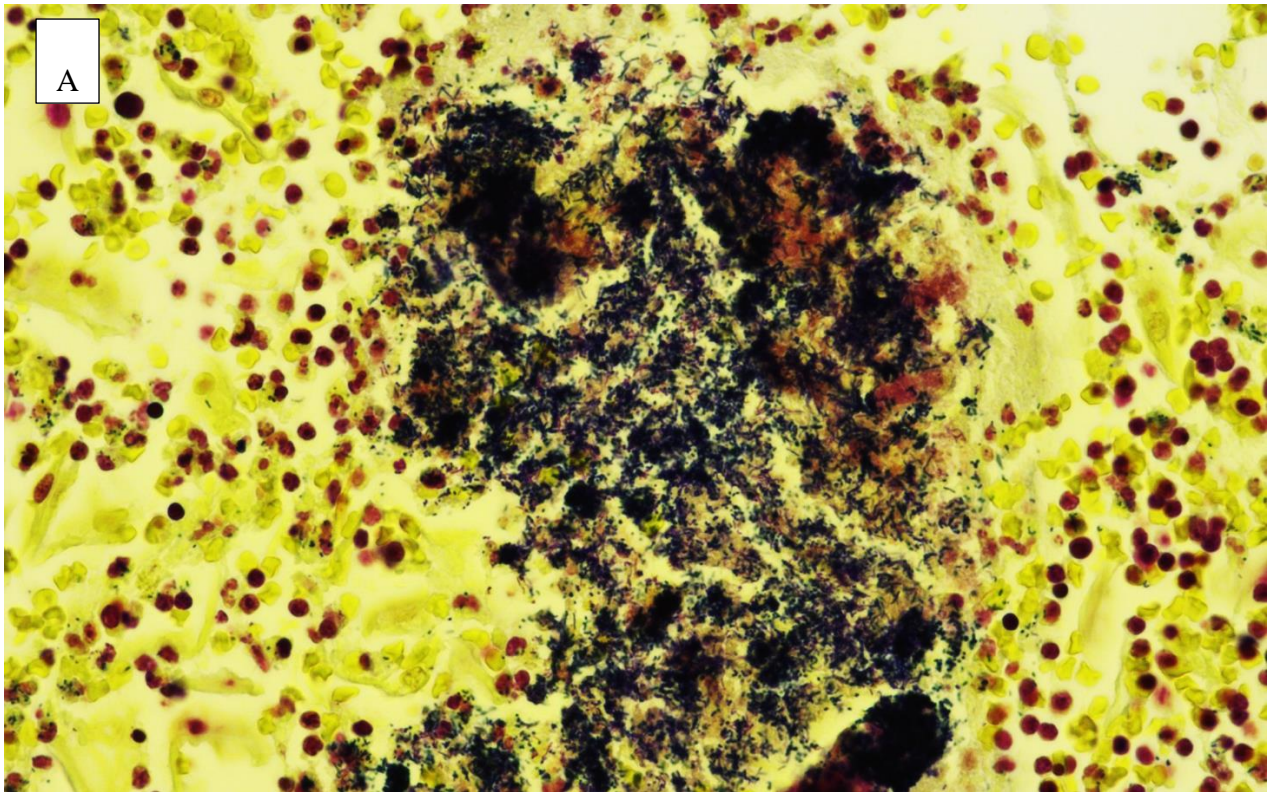


Figure 38 : Photos représentatives d'une amygdale avec présence de bactéries détectées par la coloration Brown - Brenn (A) ou par ViewRNA HIS Tissue Array avec la sonde RNA 16S qui ciblent toutes les bactéries (B) Objectif X40

Nous pouvons observer un très gros amas de bactéries colorées sur la Figure 38A, les plus représentés étant des Gram + (coloration bleue). D'autres bactéries Gram - sont difficilement visibles en rose derrière les bactéries bleues. Le point négatif de cette coloration, c'est qu'elle colore plus facilement les gram +. Or, dans le cadre de ce projet, nous recherchons plus des bactéries Gram -. En effet, sur la figure 38B, nous n'observons aucun marquage, ce qui est étrange au vu du nombre de bactéries présentes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la sonde utilisée marque plus les bactéries gram - et de ce fait, le gros amas de bactéries gram + aurait empêché les sondes d'accéder aux bactéries gram - qui sont minoritaires. Le contrôle négatif de la technique ayant fonctionné, nous avons testé les probes d'ARN 16S des bactéries sur une coupe de patient qui a un PMP de haut grade. Ci-dessous les résultats obtenus (Figure 39) :

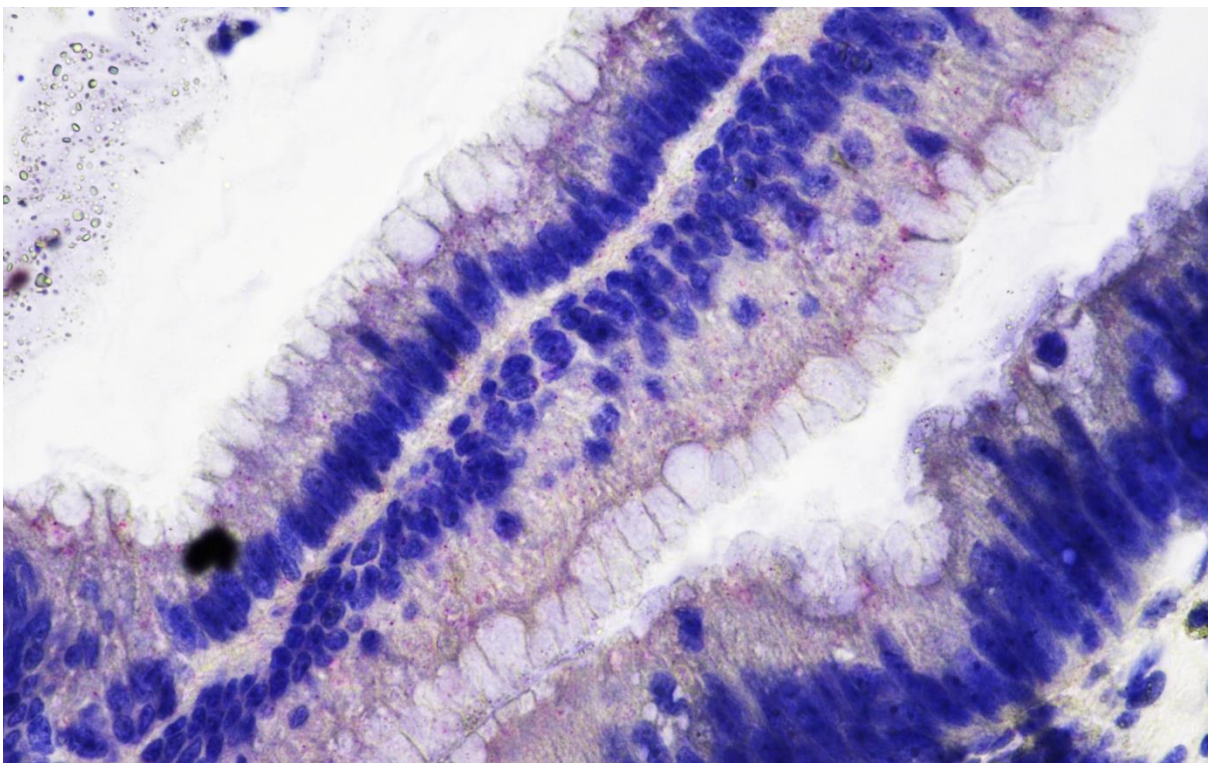
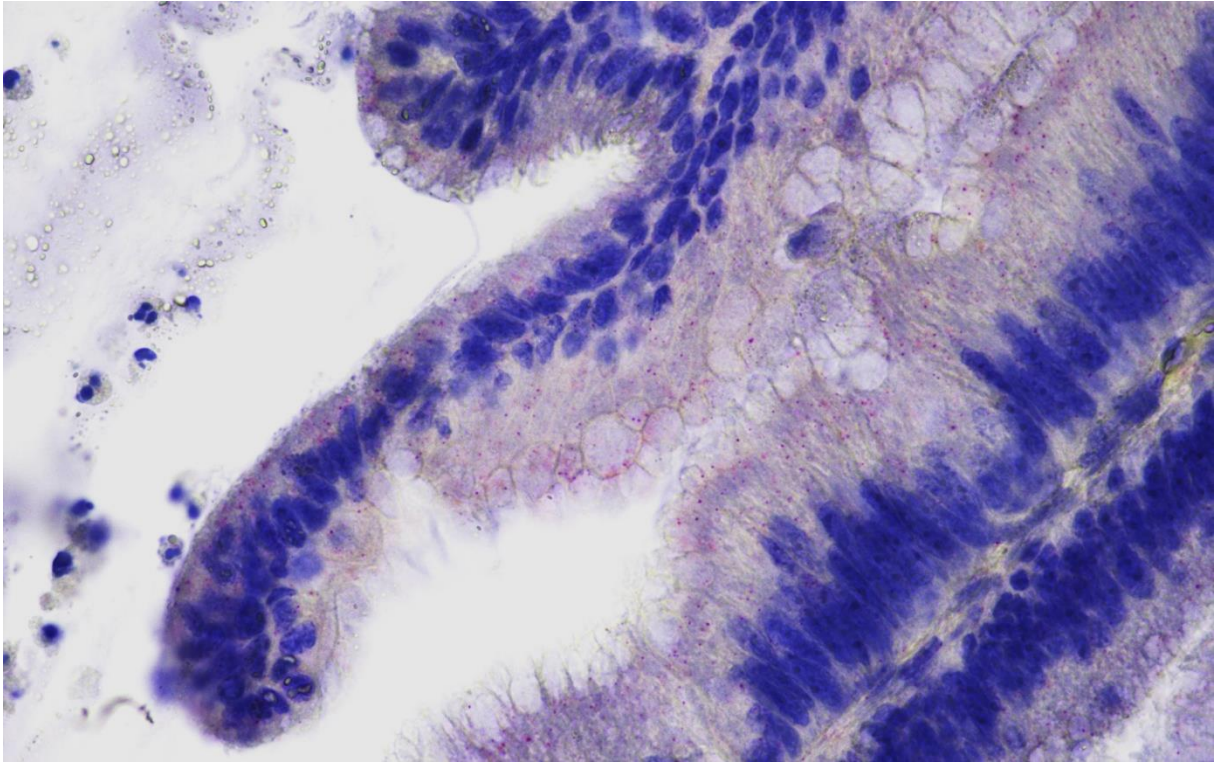


Figure 39 : Photos représentatives d'une coupe de PMP de haut grade avec présence de bactéries détectées par ViewRNA HIS Tissue Array avec la sonde RNA 16S qui ciblent toutes les bactéries (Objectif X40). Chaque point rose correspond à une molécule d'ARN 16S hybridée par la sonde spécifique.

Nous pouvons observer la présence de très nombreux points roses correspondant à la présence de bactéries. Les bactéries sont localisées dans le cytoplasme, proche de l'extrémité cellulaire et où le mucus est sécrété, ce qui est cohérent avec un lien entre les bactéries et la production de MUC2.

Les photos ci-dessous montrent l'expression de MUC2 et des bactéries avec l'utilisation de la sonde d'ARN 16 S ciblant toutes les bactéries (Figure 40).

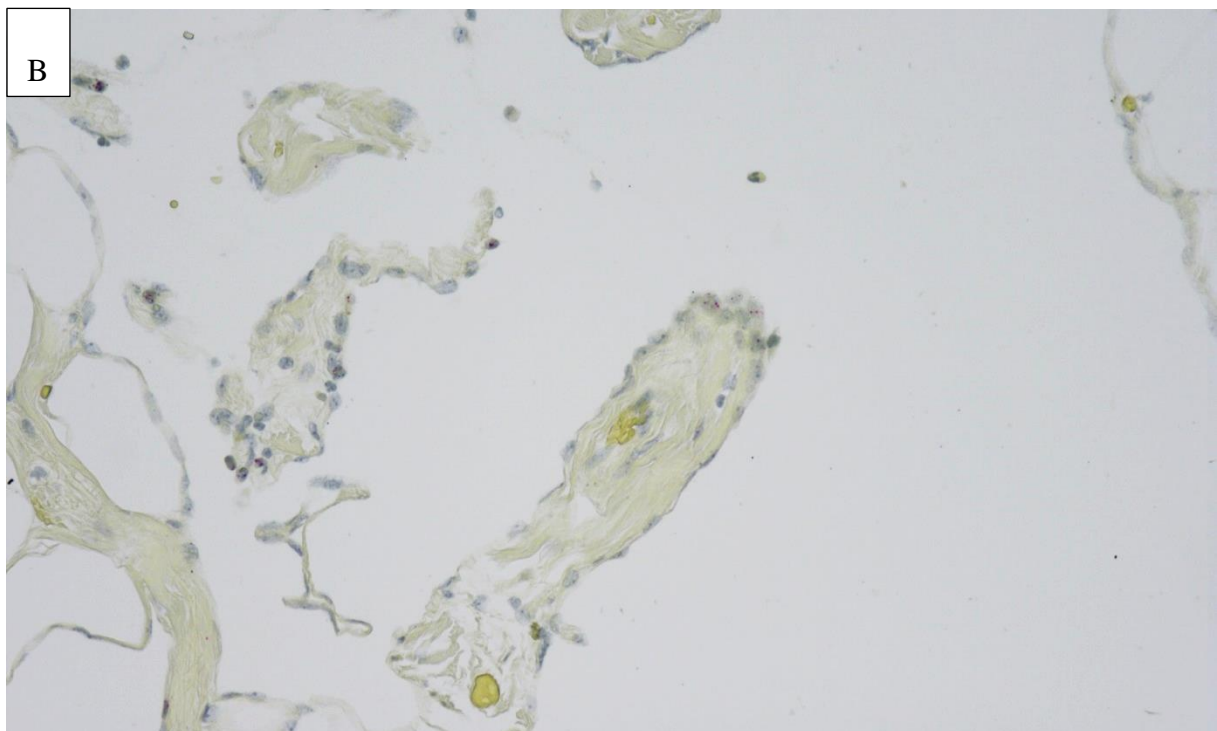
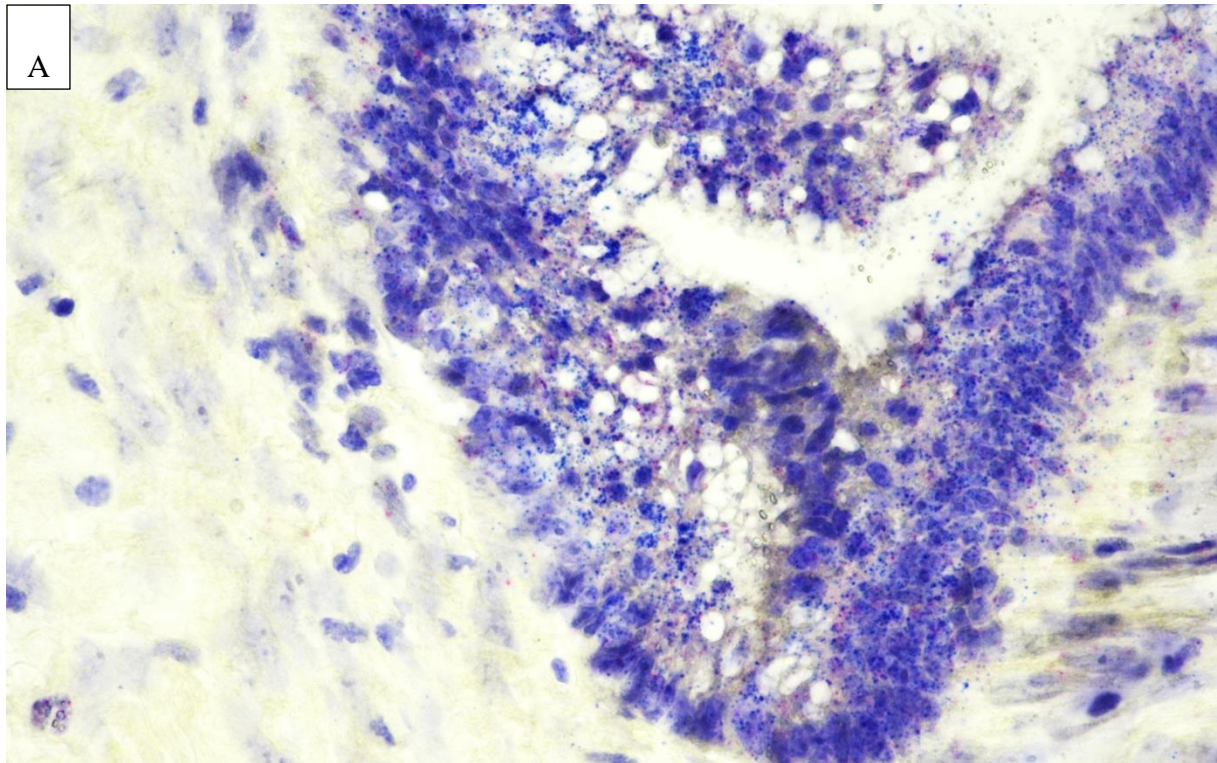


Figure 40 : Photos représentatives d'une coupe de patients ayant un PMP de haut grade (A) ou de bas grade (B) avec présence de MUC2 et de bactéries détectées par ViewRNA HIS Tissue Array avec les sondes MUC2 et RNA 16S qui ciblent toutes les bactéries respectivement (A : Objectif X40 ; B : Objectif X20). Chaque point rose correspond à une molécule d'ARN 16S et chaque point bleu correspond à une molécule d'ARN codant pour la protéine MUC2 hybridées par les sondes spécifiques.

Sur la Figure 40A, nous pouvons observer la présence de nombreux points bleus correspondant à l'expression de MUC2 et la présence de nombreux points roses correspondant à l'expression de l'ARN 16 S des bactéries. Ces dernières sont localisées dans le cytoplasme des cellules et dans le mucus et MUC2 est localisé dans le noyau, le cytoplasme et le mucus également, zones où il est normal d'observer cette protéine. Nous observons également une forte expression de ces deux cibles car il y a aussi de très nombreuses cellules cancéreuses. Sur la Figure 40B, nous observons très peu de cellules tumorales, ce qui est normal pour un PMP de bas grade. Aussi, nous observons seulement quelques points bleus et roses correspondant respectivement à l'expression de MUC2 et de l'ARN 16 S des bactéries. Ces observations sont en accord avec la corrélation montrée dans la littérature entre forte expression de MUC2 et des bactéries dans les prélèvements de haut grade alors que les bactéries sont peu nombreuses et l'expression de MUC2 très faible dans les PMP de bas grade.

Nous avons également testé la sonde dirigée contre *Helicobacter pylori* sur la coupe de PMP de haut grade. Ci-dessous les résultats obtenus (Figure 41) :

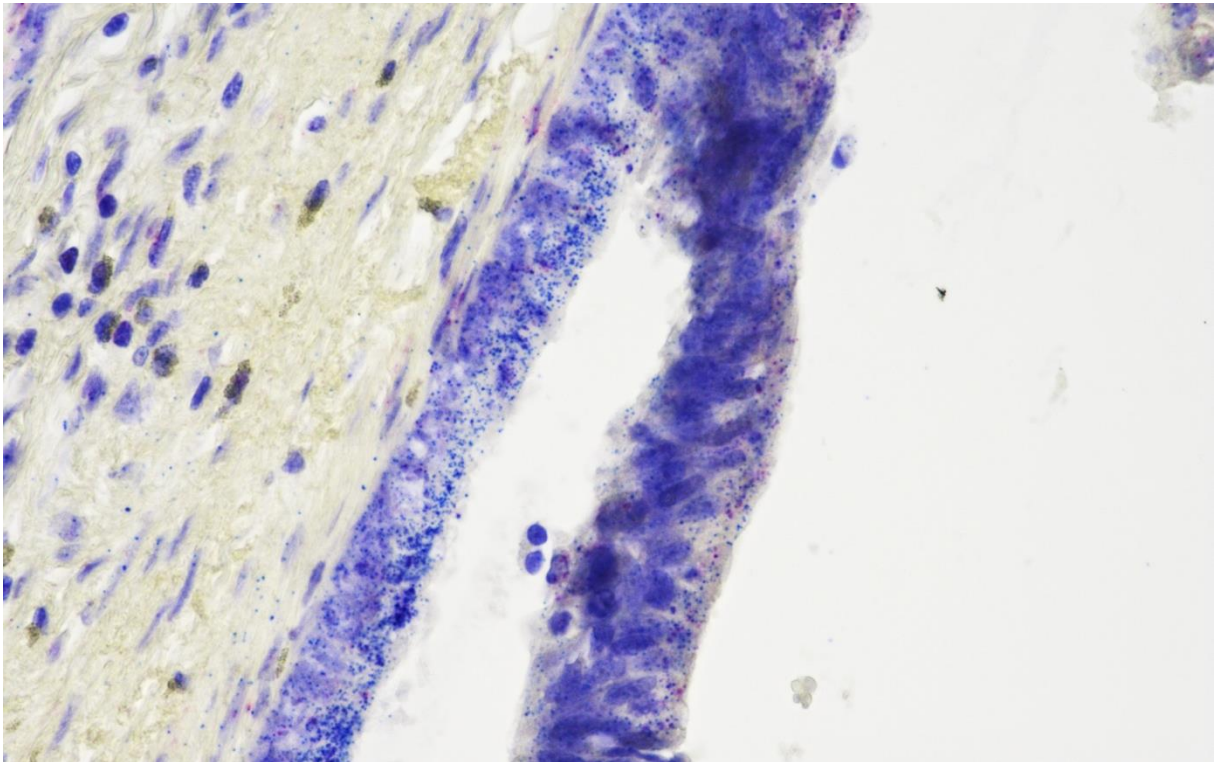


Figure 41 : Photos représentatives d'une coupe de patients ayant un PMP de haut grade avec présence de MUC2 et de Helicobacter pylori détectée par ViewRNA HIS Tissue Array avec les sondes MUC2 et RNA 16S qui ciblent seulement H. pylori respectivement (Objectif X40). Chaque point rose correspond à une molécule d'ARN 16S spécifique d'H. pylori et chaque point bleu correspond à une molécule d'ARN codant pour la protéine MUC2 hybridées par les sondes spécifiques.

Nous pouvons observer sur la figure 41 une forte expression de MUC2 localisée dans le noyau, le cytoplasme et le mucus sécrété de la même façon que précédemment. Nous observons

également une forte expression de l'ARN 16S de *H. pylori* aux mêmes endroits mais de façon moins importante que dans la figure 40A.

Nous pouvons conclure de cette expérience que la présence des bactéries a bien été identifiée de façon importante et en corrélation avec l'expression de MUC2 dans les coupes de patients ayant un PMP de haut grade. Plus précisément, nous avons pu identifier *H. pylori* comme bactéries présentes en grande quantité sur les coupes. Sa présence ne signifie pas que ce soit cette bactérie qui soit associée au développement du PMP mais sa présence ainsi que celle d'autres bactéries n'est pas normale. Ce que nous pouvons noter également, c'est que le marquage est abondant sur les coupes de haut grade alors qu'il est faible dans les coupes de bas grade, et est corrélé à l'expression de MUC2, ce qui est cohérent avec les observations de la littérature, c'est-à-dire corrélé à l'agressivité de la maladie.

V/ DISCUSSION/CONCLUSION

Suite aux sept expériences réalisées, nous pouvons affirmer que l'association d'antibiotique-anti-angiogénique inhibe le développement tumoral des modèles STLO, STLOM et BOGH. Cette association semble être efficace sur les modèles de PMP « morceaux » tumoral et d'ascite mais cela dépend du modèle. Premièrement, sur le modèle STLO, le Bevacizumab ou le Sorafenib seuls étaient suffisants pour inhiber l'angiogenèse et la production d'ascite. Puis des résultats similaires ont été observés avec les combinaisons « ATB1 + Bevacizumab » et « ATB1 + Sorafenib ». Cependant, il manque le dosage du VEGF sérique et tumoral ainsi que celui de l'ACE sérique pour pouvoir confirmer les effets biologiques du traitement sur l'angiogenèse et la production d'ascite.

Par contre, ces combinaisons n'ont pas été efficaces sur le modèle STLOM testé ensuite. Pourtant, il s'agit d'une tumeur issue du même patient. Nous avons observé une importante hétérogénéité premièrement dans le groupe CTRL puis un peu moins dans les groupes de traitements, nous laissant supposer que les traitements agissent tout de même, mais pas suffisamment pour induire une différence significative. Nous avons pu observer les mêmes résultats avec les combinaisons « ATB2 + Bevacizumab » et « ATB2 + Sorafenib ». De plus, les résultats obtenus par rapport au dosage du VEGF sérique et tumoral étaient contradictoires : une fois le niveau est plus faible dans le groupe traité puis dans l'expérience suivante le niveau est plus haut.

Concernant la nouvelle combinaison testée « ATB2 + Aflibercept », les résultats obtenus sur les modèles STLOM et BOGH ont été très encourageants. En effet, le poids de la tumeur ou le volume d'ascite développé à la fin de l'expérience est significativement plus faible pour les souris traitées par rapport aux souris CTRL, ces résultats étant alors cohérents avec une augmentation du poids en fonction du temps des souris CTRL par rapport aux souris traitées dont le poids reste assez stable. Enfin, le taux d'ACE sérique est significativement plus faible et les taux de VEGF sérique et tumoral significativement plus élevés pour les souris traitées par rapport aux souris CTRL. Le faible taux d'ACE montre un effet du traitement sur une diminution de la charge tumorale de la maladie. Dans le cas de notre hypothèse concernant le fait que le VEGF des souris traitées par l'Aflibercept ne serait pas utilisé comparé aux souris CTRL, les résultats montrent un effet important du traitement sur une inhibition de l'angiogenèse avec l'observation d'une tumeur vascularisée *vs* non vascularisée voire blanche, et d'une ascite hémorragique *vs* transparente.

Les résultats sont très encourageants. Cependant, une question peut se poser concernant le VEGF non dégradé. En cas d'arrêt du traitement, que se passerait-il ? Le VEGF serait-il alors utilisé ? Est-ce que cela conduirait à réactiver l'angiogenèse et le développement tumoral ? En effet, le laboratoire a mis en évidence dans d'autres travaux, un effet rebond du VEGF à l'arrêt du traitement des souris par le Bevacizumab [24]. De ce fait, cela signifie que le traitement ne devra pas être interrompu.

Idéalement, il faudrait également réaliser une étude toxicologique afin d'évaluer l'association thérapeutique en terme de toxicité, pour le sang et les organes. Pour cela, afin qu'il n'y ait pas de biais lié au cancer, il faudrait traiter les animaux non malades pendant plusieurs semaines et ainsi analyser par anatomopathologie les organes comme les reins, le foie et effectuer une Numération Formule Sanguine (NFS) et des analyses biochimiques dans le sang (dosage Alanine Amino-transférase (ALAT) et Aspartate Amino-transférase (ASAT)). Toutefois les

toxicités observées chez les hommes des deux traitements, anti-angiogéniques et antibiotiques sont connues et semblent raisonnables en regard du potentiel bénéfique clinique.

Il serait aussi intéressant de refaire l'expérience sur ces modèles en séparant les deux traitements afin d'évaluer réellement l'effet de l'ATB2 (Pénicilline/Streptomycine) et de l'Aflibercept seul ou en association sur l'évolution du PMP.

Une des expériences qui reste à réaliser est le dosage du niveau de MUC2 dans les prélèvements tumoraux. En effet, dans la littérature nous avons pu observer une corrélation entre le nombre de bactéries et l'expression de MUC2. De ce fait, après le traitement par la combinaison, nous espérons observer une diminution du niveau de MUC2 dans les prélèvements de souris traitées comparé aux prélèvements des souris CTRL. Nous avons commandé un kit ELISA afin de réaliser cette expérience.

Les résultats du cytokine array n'ont pas été statistiquement significatifs. Mais il serait intéressant de réaliser des ELISA sur chacun des prélèvements issus des deux dernières expériences afin d'identifier des régulations et un rôle possible des cytokines suivantes : CXCL13, CXCL12, le complément C5/C5a, TIMP-1, ICAM-1 et M-CSF.

Deuxièmement, concernant la mise en culture des prélèvements de souris avec ou sans antibiotique, trois souches appartenant au phylum des Protéobactéries ont été identifiées : Escherichia Coli, Enterococcus faecalis et Pseudomonas luteola. Ces germes sont de ce fait intéressants dans le cadre de notre projet. Ce sont des bacilles Gram -, germes opportunistes responsables d'infections.

Ces germes devraient, au plan théorique, venir directement des prélèvements de tumeurs humaines effectués au bloc opératoire. Toutefois, après de multiples essais nous n'avons pas été en mesure d'identifier des bactéries à partir des tumeurs humaines.

Les bactéries identifiées sur nos modèles animaux peuvent soit venir des tumeurs humaines greffées qui hébergent des bactéries issues de la perforation tumorale de l'appendice, soit elles proviennent finalement d'une translocation bactérienne des souris. Cette seconde hypothèse devrait conduire à une analyse du microbiote de la souris. Nous pouvons noter que le microbiote intestinal de la souris d'élevage est dépourvu de nombreux pathogènes. En effet, le développement des souris a abouti à la création de lignées murines génétiquement pures mais qui hébergent un microbiote dont la diversité est restreinte en raison de l'absence de contact des animaux avec la grande majorité des micro-organismes retrouvés dans les milieux naturels. Le microbiote intestinal de ces souris est donc spécifique de cette situation d'élevage et n'est pas représentatif de celui d'animaux élevés dans un milieu naturel. Étant donné l'influence du microbiote dans de multiples fonctions de l'organisme, ce biais pourrait altérer la reproductibilité des résultats expérimentaux obtenus chez la souris [25].

Par exemple, si une souris a une infection bactérienne, ces dernières pourraient être transmises aux souris lors des passages et induire un biais lors des expériences. Le PMP étant une maladie rare, nous avons très peu de prélèvements à notre disposition, c'est pour cela que la mise en culture a été faite à partir des prélèvements de souris. Nous avons aussi fait l'hypothèse que si l'association avec la bactérie était importante pour le développement tumoral, la bactérie persisterait de passage en passage.

De ce fait, concernant la recherche des bactéries, il serait peut-être plus judicieux de travailler à partir de prélèvements de patients frais directement, et non avec ceux dont plusieurs passages ont été réalisés sur la souris nude. Par contre, nous avons échoué à réaliser cela et il faut peut-être développer une méthode spécifique pour isoler les bactéries anaérobies présentes dans la tumeur et disparaissant probablement dès un contact avec l'air.

Troisièmement, de nombreuses bactéries ont été observées ainsi que précisément *Helicobacter pylori* par hybridation *in situ* à partir des sondes ciblant l'ARN 16S des bactéries et en association avec MUC2. Ces résultats, une importante expression de MUC2 associée à une importante présence des bactéries sur les coupes de haut grade sont cohérents avec une agressivité de la maladie plus élevée par rapport aux bas grades. Malgré le biais lié au microbiote de la souris, il serait intéressant de réaliser une HIS sur les coupes de souris traitées et non traitées. Enfin, une identification plus précise des germes présents dans les prélèvements de patients, soit par HIS, par PCR ou par séquençage serait nécessaires.

Nous pouvons conclure que les résultats obtenus avec la combinaison « ATB2 + Aflibercept » sont très intéressants mais beaucoup d'analyses restent à accomplir afin de pouvoir s'assurer totalement d'une part de l'efficacité du traitement sur le long terme, puis d'autre part de son innocuité.

En Norvège, une étude *in vivo* a également été réalisée à partir de prélèvements de patients greffés sur souris nudes [15]. En effet, l'équipe du Pr Kjersti Flatmark a comparé l'effet de deux anti-angiogéniques, le Bevacizumab et l'Aflibercept, sur le développement de 3 modèles de PMP. Avec le Bevacizumab, l'inhibition de la croissance tumorale a été variable mais non significative alors que l'Aflibercept a entraîné une forte inhibition de la croissance tumorale des 3 modèles. La dose de Bevacizumab utilisée était identique à celle utilisée dans nos expériences mais celle de l'Aflibercept était 2 à 4 fois plus faible. En effet, ils ont testé les doses de 6,25 et 12,5 mg/kg alors que nous avons testé la dose de 25mg/kg, dose utilisée par une collègue avec qui nous sommes en collaboration, qui travaille sur le cancer du foie. Cette étude confirme que cet anti-angiogénique est vraiment efficace sur l'inhibition du PMP, même à faible dose. Il semble important de réaliser une étude cytotoxique de ce médicament avant de potentiellement le tester sur des patients en phase 1.

Le seul traitement expérimental actuellement proposé aux patients porteurs de pseudomyxome non opérable vient d'Australie. Il s'agit de l'administration intrapéritonéale du BromAc composé de Bromélaïne et d'Acétylcystéine [26]. Plus précisément, un essai de Phase I a été effectué en Australie par l'équipe du Pr Morris. La Bromélaïne est dérivée de la tige de l'ananas contenant un mélange d'enzymes telles que des protéases, des glucosidases, des peroxydases, des cellulases ainsi que des glycoprotéines. L'Acétylcystéine est un anti-oxydant utilisé pour traiter la toxicité du paracétamol et comme mucolytique pour traiter la fibrose kystique. La Bromélaïne est connue pour cliver les liaisons peptidiques tandis que l'Acétylcystéine réduit les ponts disulfures des protéines du mucus, entraînant la solubilisation du mucus lorsqu'elles sont utilisées en association. Ce traitement a été validé par rapport à son innocuité, il induirait principalement une réaction inflammatoire avec une élévation du niveau de Protéine C réactive et une augmentation des monocytes et neutrophiles [26]. Ce nouveau traitement est administré localement en intrapéritonéal *via* des drains (suivi effectué par

scanner) traversant dans la paroi abdominale ce qui peut être gênant pour les patients. De plus, plusieurs injections sont prévues dans la tumeur qui est plus ou moins gélatineuse : molle, semi-molle ou dure [27]. En fonction de la texture du PMP, le traitement sera plus ou moins efficace. En effet, le traitement injecté dans une tumeur molle induira sa solubilité et pourra être aspirée. Par contre, l'ascite obtenue par solubilisation du mucus pouvant permettre son aspiration à partir d'une tumeur dure sera beaucoup moins importante [28]. Le BromAc est un médicament intéressant malgré les contraintes liées aux nombreux injections *via* des drains et que son utilisation dépend de l'accessibilité de la tumeur et de sa texture. En effet, le fait de pouvoir aspirer l'ascite « liquide » obtenue permet de diminuer les symptômes des patients liés à une compression thoracique ou abdominale qui sont notamment responsables de la mortalité des patients et ainsi augmenter leur survie [28].

VI/ PERSPECTIVES

Suite aux différentes expériences présentées dans ce mémoire, plusieurs analyses restent à accomplir comme le dosage du VEGF sérique et tumoral sur les prélèvements de la 1^{ère} et 2^{ème} expérience et le dosage de l'ACE sérique sur les prélèvements de la 2^{ème} expérience sur le modèle STLO. Puis, le dosage des 6 cytokines qui ont un rôle important dans les cancers en général : CXCL13, CXCL12, le complément C5/C5a, TIMP-1, ICAM-1, M-CSF ainsi que le dosage tumoral de MUC2 sur les prélèvements des deux dernières expériences sur les modèles STLOM et BOGH.

Nous avons pu mettre en évidence l'efficacité du traitement « ATB2 + Aflibercept » sur une inhibition du développement du PMP sur deux modèles *in vivo* de souris, STLOM et BOGH, mais il serait également intéressant de tester l'ATB2 (Pénicilline/Streptomycine) et l'Aflibercept seuls et en association sur ces deux modèles et d'évaluer l'effet de ces traitements sur un nouveau modèle de PMP. De plus, une analyse toxicologique de ces traitements sur des souris « sham » c'est à dire non malades est essentiel pour pouvoir continuer le projet.

Enfin, la recherche par PCR ou séquençage des différents phylums des bactéries présentes dans les prélèvements de patients nous permettra potentiellement d'identifier de nouveaux antibiotiques auxquels les bactéries seront sensibles et qui pourraient être plus efficaces.

Le mélange d'antibiotiques pourrait peut-être être injecté localement dans la tumeur comme est injecté le BromAc afin d'augmenter l'efficacité du traitement localement et éviter les effets secondaires potentiels systémiques comme des problèmes gastro-intestinaux et une modification de la flore intestinale.

Ce type d'association, antibiotique / anti-angiogénique, pourrait être évalué dans le traitement du cancer colo-rectal (CRC) car le développement de ce cancer pourrait être lié à une dysbiose du microbiote intestinale et à la présence de bactéries comme *Bacteroides fragilis* entérotoxigène ou *Fusobacterium nucleatum*. Cette dernière va, avec la protéine d'adhésion cellulaire FadA, interagir avec l'E-cadhérine déclenchant l'activation de la voie de signalisation de la β -caténine qui va favoriser la tumorigenèse [29, 30]. De plus, le CRC est connu pour un développement important de l'angiogénèse [24].

Cependant, les résultats obtenus sont très encourageants et sont motivants pour continuer ce projet pour permettre de traiter les patients qui ne peuvent supporter le traitement de choix, c'est-à-dire la chirurgie de cytoréduction (CRS) complète suivie d'une Chimiothérapie Hyperthermique Intrapéritonéal (CHIP). En effet l'objectif n'est pas de remplacer ce traitement qui permet d'augmenter significativement la survie des patients. La conception d'une étude clinique pour évaluer cette association chez des patients est en cours de discussion avec les cliniciens en charge des patients.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mittal R, Chandramohan A, Moran B: **Pseudomyxoma peritonei: natural history and treatment.** *Int J Hyperthermia* 2017, **33**(5):511-519.
2. Semino-Mora C, Testerman TL, Liu H, Whitmire JM, Studeman K, Jia Y, McAvoy TJ, Francis J, Nieroda C, Sardi A *et al*: **Antibiotic treatment decreases microbial burden associated with pseudomyxoma peritonei and affects beta-catenin distribution.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(14):3966-3976.
3. Dohan A, Lousquy R, Eveno C, Goere D, Broqueres-You D, Kaci R, Lehmann-Che J, Launay JM, Soyer P, Bonnin P *et al*: **Orthotopic animal model of pseudomyxoma peritonei: An in vivo model to test anti-angiogenic drug effects.** *Am J Pathol* 2014, **184**(7):1920-1929.
4. Gilbreath JJ, Semino-Mora C, Friedline CJ, Liu H, Bodi KL, McAvoy TJ, Francis J, Nieroda C, Sardi A, Dubois A *et al*: **A core microbiome associated with the peritoneal tumors of pseudomyxoma peritonei.** *Orphanet J Rare Dis* 2013, **8**:105.
5. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA: **An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease.** *Nature* 2007, **449**(7164):811-818.
6. Patrick-Brown T, Carr NJ, Swanson DM, Larsen S, Mohamed F, Flatmark K: **Estimating the Prevalence of Pseudomyxoma Peritonei in Europe Using a Novel Statistical Method.** *Ann Surg Oncol* 2021, **28**(1):252-257.
7. Semino-Mora C, Liu H, McAvoy T, Nieroda C, Studeman K, Sardi A, Dubois A: **Pseudomyxoma peritonei: is disease progression related to microbial agents? A study of bacteria, MUC2 AND MUC5AC expression in disseminated peritoneal adenomucinosis and peritoneal mucinous carcinomatosis.** *Ann Surg Oncol* 2008, **15**(5):1414-1423.
8. Shetty S, Thomas P, Ramanan B, Sharma P, Govindarajan V, Loggie B: **Kras mutations and p53 overexpression in pseudomyxoma peritonei: association with phenotype and prognosis.** *J Surg Res* 2013, **180**(1):97-103.
9. Carr NJ, Cecil TD, Mohamed F, Sobin LH, Sugarbaker PH, Gonzalez-Moreno S, Taflampas P, Chapman S, Moran BJ, Peritoneal Surface Oncology Group I: **A Consensus for Classification and Pathologic Reporting of Pseudomyxoma Peritonei and Associated Appendiceal Neoplasia: The Results of the Peritoneal Surface Oncology Group International (PSOGI) Modified Delphi Process.** *Am J Surg Pathol* 2016, **40**(1):14-26.
10. Ishida M, Mizumoto A, Yonemura Y, Kashu I, Takemura S, Tsuta K: **Prognostic significance of the presence of epithelial cell clusters in the ascites of patients with pseudomyxoma peritonei.** *Diagn Cytopathol* 2019, **47**(10):1024-1027.
11. Khamzina Y, King MC, Nieroda C, Merrell DS, Sardi A, Gushchin V: **The Role of Microorganisms in Appendiceal Pseudomyxoma Peritonei: A Review.** *Curr Oncol* 2022, **29**(5):3576-3584.
12. Chua TC, Moran BJ, Sugarbaker PH, Levine EA, Glehen O, Gilly FN, Baratti D, Deraco M, Elias D, Sardi A *et al*: **Early- and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy.** *J Clin Oncol* 2012, **30**(20):2449-2456.

13. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH: **Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)**. *J Cell Mol Med* 2005, **9**(4):777-794.
14. Robinson CJ, Stringer SE: **The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors**. *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 5):853-865.
15. Andersson Y, Fleten KG, Abrahamsen TW, Reed W, Davidson B, Flatmark K: **Anti-Angiogenic Treatment in Pseudomyxoma Peritonei-Still a Strong Preclinical Rationale**. *Cancers (Basel)* 2021, **13**(11).
16. Mody K, Baldeo C, Bekaii-Saab T: **Antiangiogenic Therapy in Colorectal Cancer**. *Cancer J* 2018, **24**(4):165-170.
17. Baker JM, Al-Nakkash L, Herbst-Kralovetz MM: **Estrogen-gut microbiome axis: Physiological and clinical implications**. *Maturitas* 2017, **103**:45-53.
18. Dohrman A, Miyata S, Gallup M, Li JD, Chapelin C, Coste A, Escudier E, Nadel J, Basbaum C: **Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria**. *Biochim Biophys Acta* 1998, **1406**(3):251-259.
19. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H: **Towards the human colorectal cancer microbiome**. *PLoS One* 2011, **6**(5):e20447.
20. Merrell DS, McAvoy TJ, King MC, Sittig M, Millar EV, Nieroda C, Metcalf JL, Blum FC, Testerman TL, Sardi A: **Pre- and post-operative antibiotics in conjunction with cytoreductive surgery and heated intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) should be considered for pseudomyxoma peritonei (PMP) treatment**. *Eur J Surg Oncol* 2019, **45**(9):1723-1726.
21. DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM: **Inflaming gastrointestinal oncogenic programming**. *Cancer Cell* 2008, **14**(1):7-9.
22. Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, Baek MS, Huang YJ, Daly RA, Karaoz U, Andersen GL, Brown R, Fujimura KE *et al*: **Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients**. *PLoS One* 2010, **5**(6):e11044.
23. Flatmark K, Reed W, Halvorsen T, Sorensen O, Wiig JN, Larsen SG, Fodstad O, Giercksky KE: **Pseudomyxoma peritonei--two novel orthotopic mouse models portray the PMCA-I histopathologic subtype**. *BMC Cancer* 2007, **7**:116.
24. Becherirat S, Valamanesh F, Karimi M, Faussat AM, Launay JM, Pimpie C, Therwath A, Pocard M: **Discontinuous Schedule of Bevacizumab in Colorectal Cancer Induces Accelerated Tumor Growth and Phenotypic Changes**. *Transl Oncol* 2018, **11**(2):406-415.
25. Estavoyer B, Soudja S: **[Gut microbiota of wild mice and laboratory mice differ significantly in conferring resistance to viral infection and cancer]**. *Med Sci (Paris)* 2018, **34**(6-7):609-611.
26. Ke K, Pillai K, Mekkawy AH, Akhter J, Badar S, Valle SJ, Morris DL: **The effect of intraperitoneal administration of BromAc on blood parameters: phase 1 study**. *Discov Oncol* 2021, **12**(1):25.
27. Pillai K, Akhter J, Mekkawy A, Chua TC, Morris DL: **Physical and chemical characteristics of mucin secreted by pseudomyxoma peritonei (PMP)**. *Int J Med Sci* 2017, **14**(1):18-28.

28. Lam AR, Bazzi K, Valle SJ, Morris DL: **Novel Use of Bromelain and Acetylcysteine (BromAc(R)) for Pleural Involvement in Pseudomyxoma Peritonei.** *Case Rep Oncol* 2021, **14**(1):628-633.
29. Hold GL, Garrett WS: **Gut microbiota. Microbiota organization--a key to understanding CRC development.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015, **12**(3):128-129.
30. Celardo I, Melino G, Amelio I: **Commensal microbes and p53 in cancer progression.** *Biol Direct* 2020, **15**(1):25.

ANNEXE 1 :

PROJET D'EXPERIMENTATION ANIMALE VALIDE PAR LE MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

« Effet in vivo de la combinaison

Antibiotique anti-angiogénique sur l'évolution des cancers rares du péritoine (Pseudomyxome
péritonéal, mésothéliome) »

1. Informations Générales

Numéro de version	1
1.1. Référence Dossier	2022051310157574
1.2. Titre du projet	EFFET IN VIVO DE la combinaison antibiotiqueantiangiogénique SUR L'EVOLUTION DES CANCERS RARES DU PERITOINE (PSEUDOMYXOME PERITONEAL, MESOTHELIOME)
1.3. Durée du projet	
Nombre d'années	5
1.4. Date prévue de début de projet	
Dès que le projet est autorisé	Oui

3. Informations Administratives et Réglementaires

3.1. L'Etablissement Utilisateur

3.1.1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux

Nom de l'Etablissement Utilisateur	Animalerie Viggo Petersen
Numéro d'agrément	D75-10-03

3.1.2. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet

Nombre de responsables de la mise en oeuvre générale du
projet 1

Coordonnées du responsable

Civilité Monsieur

Nom _____ POCARD
Prénom _____ Marc
Adresse Postale
Nom du laboratoire _____ INSERM U1275
Complément _____ Hôpital Lariboisière Bât Viggo Petersen 2ème étage
Numéro _____ 41
Voie _____ bd de la Chapelle
Code Postal _____ 75010
Ville _____ Paris
Pays _____ FRANCE
Email _____ marc.pocard@inserm.fr
Numéro de téléphone _____ 0153216750

3.1.3. Responsable(s) du bien être des animaux

Nombre de responsables du bien être des animaux _____ 3

Coordonnées du responsable

Civilité _____ Madame
Nom _____ ELGANFOUD
Prénom _____ Nadia

Adresse Postale

Nom du laboratoire _____ INSERM U942
Complément _____ Hôpital Lariboisière Bât Viggo Petersen 2ème étage

Page 2

Numéro _____ 41
Voie _____ bd de la Chapelle
Code Postal _____ 75010
Ville _____ Paris
Pays _____ FRANCE
Email _____ nadia.elganfoud@inserm.fr
Numéro de téléphone _____ 01 53 21 67 39

Coordonnées du responsable

Civilité _____ Madame
Nom _____ PIMPIE CROCHERAY
Prénom _____ Cynthia

Adresse Postale

Nom du laboratoire _____ INSERM U1275
Complément _____ Hôpital Lariboisière Bât Viggo Petersen 2ème étage
Numéro _____ 41
Voie _____ bd de la Chapelle
Code Postal _____ 75010
Ville _____ Paris
Pays _____ FRANCE
Email _____ cynthia.crocheray@inserm.fr
Numéro de téléphone _____ 0153216750

Page 3

Coordonnées du responsable

Civilité	Madame
Nom	LOUISSAINT
Prénom	Elisabeth

Adresse Postale

Nom du laboratoire	INSERM U1132
Complément	Hôpital Lariboisière Bât Viggo Petersen 2ème étage
Numéro	41
Voie	bd de la Chapelle
Code Postal	75010
Ville	Paris
Pays	FRANCE
Email	elisabeth.louissain@inserm.fr
Numéro de téléphone	0153216750

3.2. Le Personnel

Conception des procédures expérimentales et des projets	Oui
Application de procédures expérimentales aux animaux	Oui
Soins aux animaux	Oui
Mise à mort des animaux	Oui

3.3. Le Projet

3.3.1. Objectif du projet

Le projet est-il

Justifié d'un point de vue scientifique Oui

Quelle est l'instance qui a évalué l'intérêt de ce projet ?

Le projet est justifié du point de vue scientifique car il permettra de découvrir de nouveaux médicaments permettant de guérir les patients qui succomberaient à une chirurgie lourde. Ce modèle et ce projet ont été considérés comme pertinents par l'organisation nationale pour les maladies rares NORD (National Organization for Rare Disorders) qui a financé nos projets sur le pseudomyxome.

3.3.2. Description du projet

3.3.2.1. Objectifs du projet

Le but de ce nouveau projet est de tester l'effet combiné d'anti-angiogéniques et d'antibiotiques sur l'évolution du pseudomyxome et de ce fait pouvoir déterminer un traitement pour les patients qui ne peuvent supporter une chirurgie lourde.

3.3.2.2. Déroulé du projet

Page 5

Le Pseudomyxome est une tumeur rare du péritoine. Les modèles de PMP (PseudoMyxomes Péritonéaux) sont disponibles dans le laboratoire. La tumeur croît dans le péritoine d'une souris, sans que celle-ci ne porte des métastases. Le volume de la masse augmente progressivement sans que la tumeur soit invasive et comme chez l'homme cela semble indolore. Le pseudomyxome associe à la mucine et aux cellules tumorales une quantité importante de vaisseaux, ce qui a conduit notre unité à explorer l'effet d'anti-angiogéniques sur l'évolution du PMP. Les deux anti-angiogéniques testés dans le projet précédent ont apporté des résultats encourageants. De façon associée, l'origine du PMP par perforation de l'appendice soulève l'hypothèse d'une composante bactérienne associée aux cellules tumorales. La présence de plusieurs bactéries retrouvées dans plusieurs tumeurs de patients et potentiellement une association avec la mucine MUC2 nous a amené à émettre l'hypothèse que ces bactéries pourraient avoir un rôle dans l'évolution de la maladie. C'est pourquoi, le but de ce nouveau projet est de tester l'effet combiné d'anti-angiogéniques et d'antibiotiques sur l'évolution du pseudomyxome et de ce fait pouvoir déterminer un traitement pour les patients qui ne peuvent supporter une chirurgie lourde. Pour le moment, nous avons à notre disposition au sein du laboratoire 3 types d'anti-angiogéniques :
-Le Bevacizumab : ce sont des anticorps monoclonaux humanisés anti-vegf
-Le Sorafenib : Ce sont des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) qui permettent donc l'inhibition de plusieurs voies de signalisation favorisant la croissance tumorale et l'angiogenèse.
-L'Aflibercept : C'est une protéine de fusion recombinante composée des fragments des domaines extracellulaires des récepteurs de type 1 et 2 du VEGF humain fusionnés au fragment Fc de l'IgG1 humaine. L'aflibercept agit comme un leurre soluble de récepteur, qui se lie au VEGF-A et au PlGF avec une affinité supérieure à celle de leurs récepteurs naturels et peut ainsi inhiber la liaison et l'activation de ces récepteurs apparentés. Nous espérons pouvoir obtenir d'autres anti-angiogéniques à tester au cours de ces 5 années. Concernant les antibiotiques, notre choix se portera en fonction de la recherche des bactéries. En effet, une partie de notre projet consiste à rechercher par hybridation in situ des bactéries sur les coupes de pseudomyxomes de patients obtenues par le service d'anatomo-pathologie. De plus, les modèles de PMP qui se sont développés sur les souris seront envoyés en bactériologie afin d'également rechercher une présence bactérienne. A partir de ces résultats, nous pourrons sélectionner de potentiels antibiotiques. Cette tumeur est très peu cellulaire car essentiellement formée de gélatine, nous ne pouvons l'étudier in vitro. Il est nécessaire de reproduire la maladie par un modèle de greffe orthotopique par greffe de fragments de pseudomyxome en intrapéritonéal sur des souris nudes. A chaque expérience, lorsque c'est possible, nous utiliserons un groupe contrôle pour 2 ou 3 groupes testés correspondant à une combinaison différente. Cela permettra de diminuer le nombre d'animaux. Aussi, nous utilisons 3 souris à chaque passage des différents modèles de PMP. En effet, nous disposons d'une dizaine de modèles de tumeurs rares du péritoine (PMP, mésothéliome) issus de tumeurs humaines (issues de patients) greffées aux souris au laboratoire. Nous utilisons 3 souris à chaque passage des différents modèles (de l'Homme à la souris puis de souris en souris). Nous effectuons environ 3 passages dans l'année soit l'utilisation

Page 6

de 90 souris par an soit 450 souris pendant la durée du projet. Ce sont des modèles très précieux car ce type de tumeur est rare et met du temps à se développer (environ 4 mois).
Lorsque les animaux arrivent au laboratoire, ils pèsent environ 18g. Ils seront mis à mort en fonction du poids sans attendre de décès par la croissance tumorale. A 33 grammes, l'expérience est terminée. L'analyse du poids est importante car il faut prendre en considération la masse tumorale mais aussi la formation d'ascite.
Si au bout de 6 mois, le poids de la souris n'a toujours pas atteint 33g, nous considérerons l'expérience terminée. Les animaux seront alors mis à mort.
Le schéma joint récapitule une expérience.
Nous espérons pouvoir tester 5 combinaisons par modèles (48 souris pour 3 combinaisons, et 36 souris pour 2 combinaisons, soit 84 souris pour 5 combinaisons par modèle) et tester les traitements sur 6 modèles maximum : soit utiliser au maximum 504 souris (84x6 = 504 souris).

3.3.2.3. Bénéfices attendus du projet

Les bénéfices attendus du projet sont de pouvoir déterminer un traitement non invasif qui inhiberait l'évolution du pseudomyxome afin de traiter les patients qui ne peuvent pas supporter une chirurgie lourde et donc le traitement de référence.

3.3.2.4. Nuisances ou effets indésirables attendus sur les animaux

Il n'y a pas d'effets indésirables attendus sur les animaux traités par les antiangiogéniques car ils ont déjà été utilisés dans d'autres projets et sont utilisés à des doses non toxiques. Concernant les antibiotiques, nous n'attendons pas d'effets indésirables non plus mais comme chez l'homme, le risque d'effets notamment sur le système digestif n'est pas à écarter. Nous utiliserons les mêmes doses qui sont utilisées chez l'homme, rapporté au poids de la souris. Cependant, la surveillance quotidienne des animaux et plus précisément des points comme leur poids, leur apparence, leur comportement 2 fois par semaine notifiés dans un cahier de suivi des animaux nous permettront de déterminer si les traitements ont un effet néfaste sur la santé des animaux.

3.3.3. Précisez, le cas échéant, les méthodes de mise à mort prévues

L'intervention finale nécessitera une injection d'analgésique (Buprénorphine - 0,1mg/kg). Les animaux seront ensuite anesthésiés à l'isoflurane à 3% avant ponction cardiaque puis mis à mort par dislocation cervicale. Dans le cas où un des points limites serait atteint, l'animal sera mis à mort par dislocation cervicale dans les 24h suivant l'observation.

3.3.6. Stratégies de Remplacement, de Réduction et de Raffinement

3.3.6.1. Remplacement

Page 7

Nous ne pouvons remplacer le modèle murin. En effet, cette tumeur est très peu cellulaire car essentiellement formée de gélatine, nous ne pouvons l'étudier in vitro. Il est nécessaire de reproduire la maladie par un modèle de greffe orthotopique par greffe de fragments de pseudomyxome en intrapéritonéal sur des souris nues.

3.3.6.2. Réduction

En dessous de 7 animaux par groupe, du fait des variations de nos modèles ou vitesse de propagation de la maladie il y a trop peu de données pour avoir un résultat solide. Compte tenu de notre expérience sur les modèles de PMP et de la variabilité observée de ces derniers, un nombre minimum de 10 animaux par groupe est nécessaire pour tester une expérience. En cas de groupe contrôle régulier nous nous autorisons à diminuer le nombre à 5 en acceptant pour faire les analyses scientifiques de pooler deux groupes contrôles. Ce sont des règles de bonne pratique pour toutes expériences en oncologie sur l'animal, utilisant des xenogreffes. Vu qu'il y a un risque de mortalité lié à l'intervention permettant la greffe de pseudomyxome, les groupes seront composés de 12 souris. Aussi, nous allons utiliser un seul groupe de souris contrôle pour 2 à 3 groupes de traitement quand cela sera possible. Cela permettra de diminuer le nombre d'animaux. Nous réaliserons des tests de Student et Anova en comparant le groupe CTRL avec les groupes traités par les combinaisons.

3.3.6.3. Raffinement

Les souris auront une période d'acclimatation de 5 jours minimum. Les animaux seront observés quotidiennement. Afin d'effectuer la greffe intrapéritonéale de pseudomyxome, les animaux recevront une injection d'analgésie locale et seront sous anesthésie générale gazeuse. Avant l'intervention finale (ponction cardiaque) les animaux recevront une injection d'analgésie et seront ensuite sous anesthésie générale. Concernant l'examen de microangiographie, les animaux seront aussi sous anesthésie générale. Différents points limites seront particulièrement surveillés tels que la perte de poids, le comportement (yeux fermés, dos voûté, isolement), l'apparence physique (automutilation, plaies) et la gêne pour se déplacer qui seront notifiés dans un cahier de suivi des animaux 2 fois par semaine. Les souris seront hébergées en portoir ventilé avec alimentation standard) et eau stérile ad libitum. Cycle nyctéméral 12h jour/12h nuit Température : 22°C Aussi, les souris disposeront d'enrichissement tels que maison rouge, nids en papier kraft ou buchette de bois à ronger pour leur permettre d'exprimer tout le comportement social normal d'une souris et ainsi améliorer leurs conditions d'hébergements. En cas d'atteinte des points limites, ils seront alors exclus de l'expérience dans les 24heures.

3.4. Les Animaux

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés (le champ 3.4.1. est supprimé)

Souris (*Mus musculus*) [A1] Oui

3.4.3. Justifiez la pertinence des espèces animales choisies

Page 8

Nous utilisons l'espèce souris pour notre projet car nous avons besoin d'animaux immunodéficients (cas des souris NOD ou nude). En effet, dans ce cas les tumeurs greffées ont la possibilité de se développer sans risquer un rejet. Aussi, les essais pré-cliniques sur la souris dans le cas du pseudomyxome permettent d'obtenir des informations satisfaisantes pour l'Homme.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle de leur commerce ? Non

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? Non

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? Non

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? Non

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques) Oui

Animaux génétiquement altérés Oui

Animaux génétiquement altérés

Souche mutante autre

Création d'un mutant Non

Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation Oui

Phénotype dommageable Non

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou

de fournisseurs agréés ?

Oui

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés français fournissant tout ou partie des animaux du projet 1

Etablissement éleveur

Nom de l'établissement Charles River LAB FRANCE

Adresse postale

Voie BP 0109 L'Arbresle cedex

Code Postal 69592

Ville L'arbresle

Pays FRANCE

Animaux fournis Souris nues femelles de 4 semaines

Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

Etablissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet 0

Etablissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France 0

fournissant tout ou partie des animaux du projet _____

Etablissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet _____ 0

Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent? _____ Non

Animaux utilisés

3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet _____ 954

Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées _____

Lorsque nous réaliserons une expérience sur un modèle le fournisseur nous fournira au maximum 48 souris nues femelles âgées de 4 semaines, sans compter les 3 souris utilisées à chaque passage d'un des modèles de PMP. Plus précisément, nous aurons :

-4 groupes de souris greffées au maximum (12 souris/groupe) : 1 groupe contrôle puis 3 groupes testés par une combinaison antibiotique-anti-angiogénique

-3souris pour le passage, ce qui permettra de conserver le modèle.

Nous espérons pouvoir tester 5 combinaisons par modèles (48 souris pour 3 combinaisons, et 36 souris pour 2 combinaisons, soit 84 souris pour 5 combinaisons par modèle) et tester les traitements sur 6 modèles maximum : soit utiliser au maximum 504 souris (84x6 = 504 souris).

Aussi, nous utilisons 3 souris à chaque passage des différents modèles de PMP.

En effet, nous disposons d'une dizaine de modèles de tumeurs rares du péritoine (PMP, mésothéliome) issus de tumeurs humaines (issues de patients) greffées aux souris au laboratoire. Nous utilisons 3 souris à chaque passage des différents modèles (de l'Homme à la souris puis de souris en souris). Nous effectuons environ 3 passages dans l'année soit l'utilisation de 90 souris par an soit 450 souris pendant la durée du projet.

Ce sont des modèles très précieux car ce type de tumeur est rare et met du temps à se développer (environ 4 mois).

Nous pensons donc utiliser au maximum environ 954 souris pendant la durée du projet.

3.4.11. Indiquez à quels stades de développement les animaux seront utilisés et le justifier _____

Les souris seront utilisées à l'âge de 5-6 semaines pour ne pas interférer avec les processus de vieillissement.

3.4.12. Indiquer le sexe des animaux et le justifier _____

Page 11

Nous utilisons des femelles car les mâles sont plus agressifs et ne permettent pas de les garder dans la même cage. Pour leur bien-être et pour qu'il n'y ait pas de facteur pouvant engendrer de l'angoisse ou un stress, il est nécessaire que les souris ne soient pas isolées mais en contact avec d'autres souris.

4. Procédures Expérimentales

4.2. Description des procédures

Nombre de procédures _____ 2

4.2.1. Procédure n°1

Nom de la procédure _____

EFFET IN VIVO DE la combinaison antibiotiqueantiangiogénique SUR L'EVOLUTION DES CANCERS RARES DU PERITOINE (PSEUDOMYXOME PERITONEAL, MESOTHELIOME)

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité _____ Classe modérée

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale _____

Page 12

Cette procédure commence par la greffe itrapéritonéale d'un pseudomyxome. Les souris sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane à 3% au moment de l'induction puis à 1,5% pour l'entretien, débit d'air de 1,5L/min) recevront une analgésie locale (là où sera l'incision) de Lidocaïne en sous-cutanée (1mg/kg) et seront allongées sur le dos sur une plaque chauffante, sans autre moyen pour les maintenir allongées. Après désinfection cutanée à la povidone-iodine, une incision abdominale médiane d'environ 1 cm est pratiquée sur l'abdomen de la souris. Des fragments de tumeur (3x3x3 mm) humaine ou réséqués d'une souris sont déposés dans les gouttières des flancs droit et gauche (6 fragments au total). L'incision est refermée par 2 points de vicryl et l'incision cutanée par une ou deux agrafes métalliques. La durée de la procédure est de 5-10 minutes.

Les animaux sont ensuite réveillés dans une cage chauffée par une lampe.

7 jours après la greffe, les animaux commenceront le traitement. L'administration par voie intrapéritonéale se fera à l'aide d'une aiguille 26G 2 fois par semaine pour le Bevacizumab ou l'Ablibercept pour les souris traitées (ou le solvant pour les souris contrôles); ou du lundi au vendredi pour l'antibiotique (ou du solvant)(Volume injecté = 0,1-0,3ml). L'administration par gavage se fera à l'aide d'une sonde de gavage 22G du Sorafenib ou du solvant (12,5% Cremophor EL ; 12,5% Ethanol ; 75% eau distillée) du lundi au vendredi(Volume injecté = 0,1-0,2ml).

L'administration de traitement ne nécessite aucun analgésique ni anesthésique.

A la fin de l'expérience, 4 souris par groupe auront un examen de microangiographie. Pour cela, nous utiliserons un analgésique (buprénorphine en sous-cutané à 0,1mg/kg) en per-opératoire afin de limiter la souffrance des animaux car il s'agit d'une procédure invasive. Ensuite, sous anesthésie générale (mélange de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (16 mg/kg)), les souris auront une laparotomie longitudinale et l'aorte abdominale sera exposée. La tumeur, laissée adhérente au péritoine, sera déplacée sur le côté gauche tandis que l'intestin sera luxé sur la droite et sera ligaturé sous loupe binoculaire en amont de la bifurcation iliaque au Vicryl 6.0 (Ethicon, France) et en aval. Un cathéter en polyéthylène sera introduit dans l'aorte abdominale. Nous perfuserons 0,5ml de solution saline héparinée pour éviter la formation de caillots de sang et 0,8ml de Bandeiraea simplicifolia isolectine B4 (IB4) conjugué à la FITC (Isothiocyanate de Fluoresceine) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), après une dilution avec du PBS à la concentration de 0,25mg/ml. Ce traceur (IB4) se lie sélectivement sur les extrémités α -galactose et présente une spécificité pour les cellules endothéliales. Quinze minutes plus tard, la tumeur sera retirée chirurgicalement. Les échantillons de tumeur seront analysés à l'aide d'un ordinateur couplé à un microscope à fluorescence. Cette technique nous permettra d'analyser l'architecture du réseau vasculaire avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre, bien supérieure à celle des techniques non invasives telles que l'IRM. Les vaisseaux peuvent être tortueux, irréguliers... ou normalisés grâce au traitement anti-angiogénique.

Cette technique est la plus précise pour fournir une information anatomique.

Les souris seront à la fin de la microangiographie mise à mort par dislocation cervicale.

Les 8 autres souris auront à la fin de l'expérience une ponction cardiaque afin d'obtenir un prélèvement de sang pour analyses post-mortem. Pour cela, 30 minutes avant le début du prélèvement intra-cardiaque, l'analgésie

sera assurée par une injection souscutanée de buprénorphine (0,1mg/kg) Les souris seront ensuite anesthésiées à l'isoflurane à 3% Après désinfection cutanée à la povidone-iodine, une incision subcostale gauche est effectuée ; puis une incision du diaphragme nous permettra d'avoir accès au coeur. Une aiguille 26 G sera introduite au niveau de l'apex du coeur et le sang sera recueilli dans une seringue héparinée. Les animaux seront ensuite mis à mort par dislocation cervicale. Ce prélèvement total de sang sera utilisé pour des analyses post-mortem. Aussi la tumeur obtenue sera pesée et utilisée pour des analyses biochimiques et immunologiques.

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

Les 504 souris recevront la greffe intrapéritonéale de pseudomyxome. Il y aura soit un groupe contrôle et 3 groupes traités (soit 12 souris contrôle et 36 souris traitées), soit un groupe contrôle et 2 groupes traités (12 souris contrôle et 24 souris traitées); ces groupes seront pour 1 modèle (donc 24 souris contrôles et 60 souris traitées); soit pour 6 modèles 144 souris contrôles et 360 souris traitées. Il est nécessaire de procéder au même type d'administration sur les souris contrôles que sur les souris traitées afin qu'elles soient toutes dans les mêmes conditions pour pouvoir comparer les résultats par la suite. Concernant l'examen de microangiographie, il y aura 4 animaux par groupe soit 28 par modèle, soit 168 souris pour les 6 modèles. Enfin, 336 souris auront le prélèvement intracardiaque.

Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Les animaux seront surveillés quotidiennement.

Les points limites seront les suivants : perte de poids >20%, comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), apparence physique anormale (automutilation, plaies), gêne pour se déplacer. Ces points seront surveillés selon la grille de score jointe 5 jours par semaine par l'expérimentateur et par la personne de garde le week end. Ils seront notés 2 fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur pour permettre de limiter au minimum la douleur de l'animal. Aussi, les souris disposeront d'enrichissement tels que maison rouge, nids en papier kraft ou buchette de bois à ronger pour leur permettre d'exprimer tout le comportement social normal d'une souris. En cas d'atteinte d'un point limite, les animaux concernés seront mis à mort dans les 24heures.

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

Il y aura un seul prélèvement à la fin de l'expérience (Volume = 0,5ml).

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Page 14

Les animaux seront observés quotidiennement. Afin d'effectuer la greffe intrapéritonéale de pseudomyxome, les animaux seront sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane à 3% au moment de l'induction puis à 1,5% pour l'entretien) et recevront une injection locale (là où il y aura l'incision au niveau de l'abdomen) de Lidocaïne (1mg/kg).

L'administration des traitements ne nécessite pas d'analgésique ni d'anesthésique. Pour l'examen de microangiographie, les animaux seront sous anesthésie générale (mélange de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (16 mg/kg)) 30minutes après l'injection de buprénorphine en sous-cutanée (0,1mg/kg). Enfin, pour le prélèvement intracardiaque, 30 minutes avant, l'analgésie sera assurée par une injection souscutanée de buprénorphine (0,1mg/kg) Les souris seront ensuite anesthésiées à l'isoflurane à 3%. Différents points limites seront particulièrement surveillés tels que la perte de poids, le comportement (yeux fermés, dos voûté, isolement), l'apparence physique (automutilation, plaies) et la gêne pour se déplacer qui seront notifiés dans un cahier de suivi des animaux 2 fois par semaine. Les souris seront hébergées en portoir ventilé avec alimentation standard) et eau stérile ad libitum. Cycle nyctéméral 12h jour/12h nuit Température : 22°C Aussi, les souris disposeront d'enrichissement tels que maison rouge, nids en papier kraft ou buchette de bois à ronger pour leur permettre d'exprimer tout le comportement social normal d'une souris et ainsi améliorer leurs conditions d'hébergements. En cas d'atteinte des points limites, ils seront alors mis à mort dans les 24heures.

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Les animaux seront surveillés quotidiennement. Le poids des animaux sera consigné dans un cahier de suivi par l'expérimentateur 2 fois par semaine. La déshydratation, leur comportement, leur apparence physique, leur mobilité seront analysés par l'expérimentateur 5 fois par semaine selon la grille de score jointe et par la personne de garde le week end. En cas de signes de souffrance des animaux, ils seront mis à mort dans les 24h par dislocation cervicale sous anesthésie générales (isoflurane à 3%).

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Mise à mort _____ Oui

Précisez les animaux concernés

Tous les animaux seront mis à mort à la fin de l'expérience.

4.2.2. Procédure n°2

Nom de la procédure

Entretien des modèles de pseudomyxomes

Page 15

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Cette procédure commence par la greffe intrapéritonéale d'un pseudomyxome. Les souris sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane à 3% au moment de l'induction puis à 1,5% pour l'entretien, débit d'air de 1,5L/min) recevront une analgésie locale (là où sera l'incision) de Lidocaïne en sous-cutanée (1mg/kg) et seront allongées sur le dos sur une plaque chauffante, sans autre moyen pour les maintenir allongées. Après désinfection cutanée à la povidone-iodine, une incision abdominale médiane d'environ 1 cm est pratiquée sur l'abdomen de la souris. Des fragments de tumeur (3x3x3 mm) humaine ou réséqués d'une souris sont déposés dans les gouttières des flancs droit et gauche (6 fragments au total). L'incision est refermée par 2 points de vicryl et l'incision cutanée par une ou deux agrafes métalliques. La durée de la procédure est de 5-10 minutes.

Les animaux sont ensuite réveillés dans une cage chauffée par une lampe.

Nous utilisons 3 souris à chaque passage des différents modèles de PMP. En effet, nous disposons d'une dizaine de modèles de tumeurs rares du péritoine (PMP, mésothéliome) issus de tumeurs humaines (issues de patients) greffées aux souris au laboratoire. Nous utilisons 3 souris à chaque passage des différents modèles

(de l'Homme à la souris puis de souris en souris). Nous effectuons environ 3 passages dans l'année soit l'utilisation de 90 souris par an soit 450 souris pendant la durée du projet. Ce sont des modèles très précieux car ce type

de tumeur est rare et met du temps à se développer (environ 4 mois).

Lorsque les animaux arrivent au laboratoire, ils pèsent environ 18g. Ils seront mis à mort en fonction du poids sans attendre de décès par la croissance tumorale. A 33 grammes, les animaux seront mis à mort afin

d'effectuer le passage à 3 autres souris. L'analyse du poids

est importante car il faut prendre en considération la masse tumorale mais aussi la formation d'ascite.

Si au bout de 6 mois, le poids de la souris n'a toujours pas atteint 33g, elle sera mise à mort en considérant qu'il n'y a pas eu de prise de greffe.

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

Les 450 souris recevront la greffe intrapéritonéale de pseudomyxome.

Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Les animaux seront observés quotidiennement. Afin d'effectuer la greffe intrapéritonéale de pseudomyxome, les animaux seront sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane à 3% au moment de l'induction puis à 1,5% pour l'entretien) et recevront une injection locale (là où il y aura l'incision au niveau de l'abdomen) de Lidocaïne (1mg/kg).

L'administration des traitements ne nécessite pas d'analgésique ni d'anesthésique. Pour l'examen de microangiographie, les animaux seront sous anesthésie générale (mélange de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (16 mg/kg)) 30minutes après l'injection de buprénorphine en sous-cutanée (0,1mg/kg). Enfin, pour le prélèvement intracardiaque, 30 minutes avant, l'analgésie sera assurée par une injection souscutanée de buprénorphine (0,1mg/kg) Les souris seront ensuite anesthésiées à l'isoflurane à 3%. Différents points limites seront particulièrement surveillés tels que la perte de poids, le comportement (yeux fermés, dos voûté, isolement), l'apparence physique (automutilation, plaies) et la gêne pour se déplacer qui seront notifiés dans un cahier de suivi des animaux 2 fois par semaine. Les souris seront hébergées en portoir ventilé avec alimentation standard) et eau stérile ad libitum. Cycle nyctéméral 12h jour/12h nuit Température : 22°C Aussi, les souris disposeront d'enrichissement tels que maison rouge, nids en papier kraft ou buchette de bois à ronger pour leur permettre d'exprimer tout le comportement social normal d'une souris et ainsi améliorer leurs conditions d'hébergements. En cas d'atteinte des points limites, ils seront alors mis à mort dans les 24heures.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Page 17

Les animaux seront observés quotidiennement. Afin d'effectuer la greffe intrapéritonéale de pseudomyxome, les animaux seront sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane à 3% au moment de l'induction puis à 1,5% pour l'entretien) et recevront une injection locale (là où il y aura l'incision au niveau de l'abdomen) de Lidocaïne (1mg/kg).

L'administration des traitements ne nécessite pas d'analgésique ni d'anesthésique. Pour l'examen de microangiographie, les animaux seront sous anesthésie générale (mélange de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (16 mg/kg)) 30minutes après l'injection de buprénorphine en sous-cutanée (0,1mg/kg). Enfin, pour le prélèvement intracardiaque, 30 minutes avant, l'analgésie sera assurée par une injection souscutanée de buprénorphine (0,1mg/kg) Les souris seront ensuite anesthésiées à l'isoflurane à 3%. Différents points limites seront particulièrement surveillés tels que la perte de poids, le comportement (yeux fermés, dos voûté, isolement), l'apparence physique (automutilation, plaies) et la gêne pour se déplacer qui seront notifiés dans un cahier de suivi des animaux 2 fois par semaine. Les souris seront hébergées en portoir ventilé avec alimentation standard) et eau stérile ad libitum. Cycle nyctéméral 12h jour/12h nuit Température : 22°C Aussi, les souris disposeront d'enrichissement tels que maison rouge, nids en papier kraft ou buchette de bois à ronger pour leur permettre d'exprimer tout le comportement social normal d'une souris et ainsi améliorer leurs conditions d'hébergements. En cas d'atteinte des points limites, ils seront alors mis à mort dans les 24heures.

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Les animaux seront surveillés quotidiennement. Le poids des animaux sera consigné dans un cahier de suivi par l'expérimentateur 2 fois par semaine. La déshydratation, leur comportement, leur apparence physique, leur mobilité seront analysés par l'expérimentateur 5 fois par semaine selon la grille de score jointe et par la personne de garde le week end.

En cas de signes de souffrance des animaux, ils seront mis à mort dans les 24h par dislocation cervicale sous anesthésie générales (isoflurane à 3%).

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Mise à mort _____ Oui

Précisez les animaux concernés _____

Tous les animaux seront mis à mort dès que leur poids atteindra 33g afin d'effectuer le passage du modèle à 3 autres souris pour conserver ce modèle.

5. Résumé au format européen

5.1. Intitulé du projet [Repris automatiquement du champ 1.2] _____ EFFET IN VIVO DE la combinaison

Page 18

5.2. Durée du projet (en mois) [Repris automatiquement du champ 1.3] 60

5.3. Mots-clés

Mot-clé n°1	pseudomyxome
Mot-clé n°2	anti-angiogénique
Mot-clé n°3	antibiotique

5.4. Finalités du projet. Sélectionner dans la liste proposée la ou les finalités du projet.

Finalités du projet

Finalité n°1 du projet	PT21 Recherche translationnelle et appliquée : Cancer humain [PT21]
------------------------	---

5.5. Objectifs et bénéfices escomptés du projet

5.5.1. Décrire les objectifs du projet [Repris automatiquement du champ 3.3.2.1]

Le but de ce nouveau projet est de tester l'effet combiné d'anti-angiogéniques et d'antibiotiques sur l'évolution du pseudomyxome et de ce fait pouvoir déterminer un traitement pour les patients qui ne peuvent supporter une chirurgie lourde.

5.5.2. Quels sont les bénéfices susceptibles de découler de ce projet ? [Repris automatiquement du champ 3.3.2.3]

Les bénéfices attendus du projet sont de pouvoir déterminer un traitement non invasif qui inhiberait l'évolution du pseudomyxome afin de traiter les patients qui ne peuvent pas supporter une chirurgie lourde et donc le traitement de référence.

5.6. Nuisances prévues

5.6.1. À quels types d'interventions les animaux seront-ils soumis (par exemple, prélèvements sur animaux vigiles, procédures chirurgicales) ? Indiquer leur nombre et leur durée.

Page 19

Les souris sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane 3%), après une injection sous cutanée locale de Lidocaïne (1mg/kg), seront soumis à une greffe intrapéritonéale d'une tumeur de pseudomyxome (1 fois 5-10min). Puis les animaux vigiles recevront en intrapéritonéale ou par gavage 2 fois par semaine pour l'anti-angiogénique (ou le solvant), et du lundi au vendredi pour le sorafenib et l'antibiotique (ou le solvant) (30secondes à chaque administration). A la fin de l'expérience, 4souris par groupe seront anesthésiées par un mélange de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (16 mg/kg) après une injection en sous-cutanée de buprénorphine 30 minutes avant (0,1mg/kg) (1fois 30secondes) pour l'examen de microangiographie (20- 25minutes). Enfin, les autres souris auront une injection sous-cutanée de buprénorphine (1 fois 30 secondes) puis 30 minutes après elles seront sous anesthésie générale (isoflurane à 30%) pour réaliser un prélèvement intracardiaque de sang qui permettra une analyse post-mortem.

5.6.2. Quels sont les effets / ou effets indésirables prévus sur les animaux ? [Repris automatiquement du champ 3.3.2.4.]

Il n'y a pas d'effets indésirables attendus sur les animaux traités par les antiangiogéniques car ils ont déjà été utilisés dans d'autres projets et sont utilisés à des doses non toxiques. Concernant les antibiotiques, nous n'attendons pas d'effets indésirables non plus mais comme chez l'homme, le risque d'effets notamment sur le système digestif n'est pas à écarter. Nous utiliserons les mêmes doses qui sont utilisées chez l'homme, rapporté au poids de la souris. Cependant, la surveillance quotidienne des animaux et plus précisément des points comme leur poids, leur apparence, leur comportement 2 fois par semaine notifiés dans un cahier de suivi des animaux nous permettront de déterminer si les traitements ont un effet néfaste sur la santé des animaux.

5.7. Quelles espèces est-il prévu d'utiliser? Quels sont le degré de gravité des procédures et le nombre d'animaux prévus dans chaque catégorie de gravité (par espèce) ?

Espèce et nombre estimé d'animaux par degré de gravité (selon les codes indiqués en 3.4.2)

Espèce	A1 Souris (Mus musculus) [A1]
Sans réveil	0
Légère	0
Modérée	954
Sévère	0

5.8. Qu'advendra-t-il des animaux maintenus en vie à la fin du projet ?

Page 20

Espèce et nombre estimé d'animaux à réutiliser, à replacer dans leur habitat naturel ou dans un système d'élevage ou à proposer à l'adoption (selon les codes indiqués en 3.4.2)

Espèce	A1 Souris (Mus musculus) [A1]
Réutilisés	0
Replacés	0
Adoptés	0

5.9. Justifier le sort prévu de tous les animaux à l'issue de chaque procédure

Tous les animaux seront mis à mort à la fin de l'expérience par ponction cardiaque puis dislocation cervicale sous anesthésie générale pour la 1ère procédure, par dislocation cervicale sous anesthésie générale pour la deuxième procédure, dès que le poids aura atteint 33g. A la fin de la 1ère procédure, nous utiliserons le sang et la tumeur pour des analyses post-mortem; pour la 2ème procédure, une petite partie de la tumeur obtenue sera greffé à 3 autres souris pour maintenir le modèle.

5.10. Application de la règle des «trois R»

1. Remplacement. [Repris automatiquement du champ 3.3.6.1]

Nous ne pouvons remplacer le modèle murin. En effet, cette tumeur est très peu cellulaire car essentiellement formée de gélatine, nous ne pouvons l'étudier in vitro. Il est nécessaire de reproduire la maladie par un modèle de greffe orthotopique par greffe de fragments de pseudomyxome en intrapéritonéal sur des souris nues.

2. Réduction. [Repris automatiquement du champ 3.3.6.2]

En dessous de 7 animaux par groupe, du fait des variations de nos modèles ou vitesse de propagation de la maladie il y a trop peu de données pour avoir un résultat solide. Compte tenu de notre expérience sur les modèles de Pseudomyxomes (cancer rare du péritoine) et de la variabilité observée de ces derniers, un nombre minimum de 10 animaux par groupe est nécessaire pour tester une expérience. En cas de groupe contrôle régulier nous nous autorisons à diminuer le nombre à 5 en acceptant pour faire les analyses scientifiques de pooler deux groupes contrôles. Ce sont des règles de bonne pratique pour toutes expériences en oncologie sur l'animal, utilisant des xenogreffes. Vu qu'il y a un risque de mortalité lié à l'intervention permettant la greffe de pseudomyxome, les groupes seront composés de 12 souris. Aussi, nous allons utiliser un seul groupe de souris contrôle pour 2 à 3 groupes de traitement quand cela sera possible. Cela permettra de diminuer le nombre d'animaux. Nous réaliserons des tests de Student et Anova en comparant le groupe Contrôle avec les groupes traités par les combinaisons.

3. Raffinement. [Repris automatiquement du champ 3.3.6.3]

Page 21

Les souris auront une période d'acclimatation de 5 jours minimum. Les animaux seront observés quotidiennement. Afin d'effectuer la greffe intrapéritonéale de pseudomyxome, les animaux recevront une injection d'analgésie locale et seront sous anesthésie générale gazeuse. Avant l'intervention finale (ponction cardiaque) les animaux recevront une injection d'analgésie et seront ensuite sous anesthésie générale. Concernant l'examen de microangiographie, les animaux seront aussi sous anesthésie générale. Différents points limites seront particulièrement surveillés tels que la perte de poids, le comportement (yeux fermés, dos voûté, isolement), l'apparence physique (automutilation, plaies) et la gêne pour se déplacer qui seront notifiés dans un cahier de suivi des animaux 2 fois par semaine. Les souris seront hébergées en portoir ventilé avec alimentation standard) et eau stérile ad libitum. Cycle nyctéméral 12h jour/12h nuit Température : 22°C Aussi, les souris disposeront d'enrichissement tels que maison rouge, nids en papier kraft ou buchette de bois à ronger pour leur permettre d'exprimer tout le comportement social normal d'une souris et ainsi améliorer leurs conditions d'hébergements. En cas d'atteinte des points limites, ils seront alors exclus de l'expérience dans les 24heures.

5.11. Expliquer le choix des espèces et les stades de développement y afférents. [Repris automatiquement des champs 3.4.3 et 3.4.11, dans la limite des 2500 premiers caractères]

Nous utilisons l'espèce souris pour notre projet car nous avons besoin d'animaux immunodéficients (cas des souris NOD ou nude). En effet, dans ce cas les tumeurs greffées ont la possibilité de se développer sans risquer un rejet. Aussi, les essais pré-cliniques sur la souris dans le cas du pseudomyxome permettent d'obtenir des informations satisfaisantes pour l'Homme.

Les souris seront utilisées à l'âge de 5-6 semaines pour ne pas interférer avec les processus de vieillissement.

ANNEXE 2 : Protocole du « mouse cytokine array Panel A »

ARRAY PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature before use. Keep samples on ice. To avoid contamination, wear gloves while performing the procedures.

1. Prepare all reagents and samples as directed in the previous sections.
2. Pipette 2 mL of Array Buffer 6 into each well of the 4-Well Multi-dish to be used. Array Buffer 6 serves as a block buffer.
3. Using flat-tip tweezers, remove each membrane to be used from between the protective sheets and place in a well of the 4-Well Multi-dish. The number on the membrane should be facing upward.
Note: Upon contact with Array Buffer 6, the blue dye from the spots will disappear, but the capture antibodies are retained in their specific locations.
4. Incubate for one hour on a rocking platform shaker. Orient the tray so that each membrane rocks end to end in its well.
5. While the membranes are blocking, prepare samples by adding up to 1 mL of each sample to 0.5 mL of Array Buffer 4 in separate tubes. Adjust to a final volume of 1.5 mL with Array Buffer 6 as necessary.
6. Add 15 μ L of reconstituted Mouse Cytokine Array Panel A Detection Antibody Cocktail to each prepared sample. Mix and incubate at room temperature for one hour.
7. Aspirate Array Buffer 6 from the wells of the 4-Well Multi-dish and add sample/antibody mixtures prepared in steps 5 and 6. Place the lid on the 4-Well Multi-dish.
8. Incubate overnight at 2-8 °C on a rocking platform shaker.
Note: A shorter incubation time may be used if optimal sensitivity is not required.
9. Carefully remove each membrane and place into individual plastic containers with 20 mL of 1X Wash Buffer. Rinse the 4-Well Multi-dish with deionized or distilled water and dry thoroughly.
10. Wash each membrane with 1X Wash Buffer for 10 minutes on a rocking platform shaker. Repeat two times for a total of three washes.
11. Dilute the Streptavidin-HRP in Array Buffer 6 using the dilution factor on the vial label. Pipette 2.0 mL of diluted Streptavidin-HRP into each well of the 4-Well Multi-dish.
12. Carefully remove each membrane from its wash container. Allow excess buffer to drain from the membrane. Return the membrane to the 4-Well Multi-dish containing the diluted Streptavidin-HRP. Cover the wells with the lid.
13. Incubate for 30 minutes at room temperature on a rocking platform shaker.

ARRAY PROCEDURE *CONTINUED*

14. Wash each array as described in steps 9 and 10.

Note: *Complete the remaining steps without interruption.*

15. Carefully remove each membrane from its wash container. Allow excess Wash Buffer to drain from the membrane by blotting the lower edge onto paper towels. Place each membrane on the bottom sheet of the plastic sheet protector with the identification number facing up.

16. Pipette 1 mL of the prepared Chemi Reagent Mix evenly onto each membrane.

Note: *Using less than 1 mL of Chemi Reagent Mix per membrane may result in incomplete membrane coverage.*

17. Carefully cover with the top sheet of the plastic sheet protector. Gently smooth out any air bubbles and ensure Chemi Reagent Mix is spread evenly to all corners of each membrane. Incubate for 1 minute.

18. Position paper towels on top and sides of plastic sheet protector containing the membranes and carefully squeeze out excess Chemi Reagent Mix.

19. Remove the top plastic sheet protector and carefully lay an absorbent lab wipe on top of the membranes to blot off any remaining Chemi Reagent Mix.

20. Leaving the membranes on the bottom plastic sheet protector, cover the membranes with plastic wrap taking care to gently smooth out any air bubbles. Wrap the excess plastic wrap around the back of the sheet protector so that the membranes and sheet protector are completely wrapped.

21. Place the membranes with the identification numbers facing up in an autoradiography film cassette.

Note: *Use an autoradiography cassette that is not used with radioactive isotope detection.*

22. Expose membranes to X-ray film for 1-10 minutes. Multiple exposure times are recommended.

ANNEXE 3 : Protocole du test ELISA (Quantikine ELISA mouse VEGF Assay, MMV00, Biotechne) permettant le dosage du VEGF

SAMPLE PREPARATION

Use polypropylene tubes.

Serum and plasma samples require a 5-fold dilution into Calibrator Diluent RD5T. A suggested 5-fold dilution is 50 μ L of sample + 200 μ L of Calibrator Diluent RD5T.

Cell culture supernates and tissue homogenates may require dilution. The dilution factor is dependent upon sample values.

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature before use.

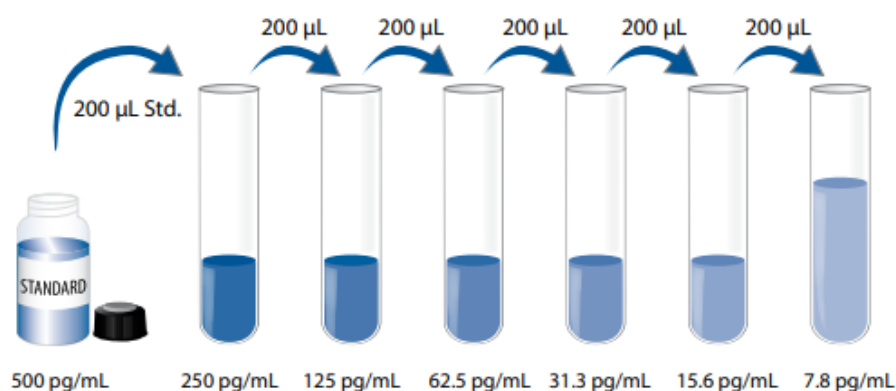
Mouse VEGF Control - Reconstitute the control with 1.0 mL deionized or distilled water. Mix thoroughly. Assay the control undiluted.

Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. To prepare enough Wash Buffer for one plate, add 20 mL of Wash Buffer Concentrate to 480 mL of deionized or distilled water to prepare 500 mL of Wash Buffer.

Substrate Solution - Color Reagents A and B should be mixed together in equal volumes within 15 minutes of use. Protect from light. 100 μ L of the resultant mixture is required per well.

Mouse VEGF Standard - Refer to the vial label for reconstitution volume. Reconstitute the Mouse VEGF Standard with Calibrator Diluent RD5T. Do not substitute other diluents. This reconstitution produces a stock solution of 500 pg/mL. Allow the stock solution to sit for a minimum of 5 minutes with gentle mixing prior to making dilutions.

Use polypropylene tubes. Pipette 200 μ L of Calibrator Diluent RD5T into each tube. Use the stock solution to produce a dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The undiluted Mouse VEGF Standard (500 pg/mL) serves as the high standard. Calibrator Diluent RD5T serves as the zero standard (0 pg/mL).




ASSAY PROCEDURE


Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all standards, control, and samples be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents, working standards, control, and samples as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal.
3. Add 50 μ L of Assay Diluent RD1N to each well.
4. Add 50 μ L of standard, control, or sample* to each well. Mix by gently tapping the plate frame for 1 minute. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at room temperature. A plate layout is provided to record standards and samples assayed.
5. Aspirate each well and wash, repeating the process four times for a total of five washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μ L) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
6. Add 100 μ L of Mouse VEGF Conjugate to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 2 hours at room temperature.
7. Repeat the aspiration/wash as in step 5.
8. Add 100 μ L of Substrate Solution to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature. **Protect from light.**
9. Add 100 μ L of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
10. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

*Samples may require dilution. See Sample Preparation section.

ANNEXE 4 : Fiche technique du test d'Electrochimiluminescence (ECLIA) permettant le dosage de l'ACE





07027079190

07027079500

300

cobas e 402
cobas e 801

Français

Informations techniques

Nom abrégé	ACN (code d'application)
CEA	10003

Remarque

La concentration en ACE d'un échantillon de patient peut varier selon le test pratiqué. Le compte rendu du laboratoire doit donc toujours préciser la méthode de dosage d'ACE utilisée. Les taux d'ACE d'un patient obtenus à partir de différentes méthodes ne peuvent être comparés, ceci pouvant conduire à des erreurs d'interprétation médicale.

En cas de changement de méthode au cours du suivi thérapeutique, les taux d'ACE doivent être confirmés pendant une période transitoire en effectuant des dosages en parallèle par les deux méthodes.

Domaine d'utilisation

Test immunologique pour la détermination quantitative in vitro de l'antigène carcino-embryonnaire dans le sérum et le plasma humains. Le test s'utilise également dans le suivi des taux de CEA chez les patients atteints de cancer.

Ce test par électrochimiluminescence - ECLIA - s'utilise sur les systèmes d'immunanalyse **cobas e**.

Caractéristiques

L'antigène carcino-embryonnaire (ACE) est une protéine fortement glycosylée d'un poids moléculaire d'environ 180 kDa.¹ Comme l'AFP (alpha-fœtoprotéine), l'ACE appartient au groupe des antigènes carcino-embryonnaires produits durant la période embryonnaire et fœtale. L'ACE participe à de nombreux processus biologiques comme l'adhésion cellulaire, l'immunité et l'apoptose.² Sa synthèse étant interrompue après la naissance, l'ACE est faiblement exprimé dans les tissus d'adultes normaux.³ L'ACE n'est par conséquent détectable qu'en très faible quantité dans le sang de l'adulte sain.³ Le gène de l'ACE appartient à une famille de 17 gènes actifs composés de deux sous-groupes: le groupe des NCA (Non-specific Cross-reacting Antigens) dans lequel se trouve le gène de l'ACE et le groupe des PSG (Pregnancy-Specific-Glycoproteins).³ Les concentrations en ACE sont fréquemment élevées lors d'adénocarcinome colorectal.⁴ Des concentrations d'ACE légèrement à moyennement élevées sont observées chez les patients présentant des affections malignes de l'intestin, du pancréas, du foie et du poumon (cancer, hépatite chronique, pancréatite, colite ulcéreuse, maladie de Crohn, etc.).⁴ Le tabagisme peut conduire à une élévation des taux d'ACE et doit être pris en compte lors de l'interprétation des résultats.⁵ La détermination d'ACE n'est pas recommandée pour le dépistage de cancers dans la population générale et les taux d'ACE normaux ne permettent pas d'exclure la présence d'une affection maligne. La principale indication de la détermination de l'ACE est le suivi thérapeutique du cancer colorectal, l'identification de récurrences après traitement ou résection chirurgicale et la classification et l'évaluation du stade métastatique.⁶

La valeur préopératoire d'ACE peut être un facteur pronostique indépendant et une aide à la gestion de l'intervention chirurgicale et constitue une valeur de base pour les dosages ultérieurs. Chez les patients de stade II et III, un dosage d'ACE est recommandé tous les 2 à 3 mois pendant au moins 3 ans après le diagnostic. Pour le suivi thérapeutique des stades avancés, l'ACE doit être testé tous les 2 à 3 mois.^{4,6} Les anticorps du test Elecsys CEA réagissent avec l'ACE et avec l'antigène méconium (NCA-2).^{10,11} La réaction croisée avec le NCA-2 s'est avérée être un outil de détection de cancer colorectal métastatique et de récurrences.¹²

Les épitopes de l'ACE ont été caractérisés et les anticorps monoclonaux disponibles reconnaissent 5 groupes d'épitopes.^{3,11} Les anticorps du test Elecsys CEA réagissent avec les groupes 2 et 5.

Principe

Méthode « sandwich ». Durée totale du cycle analytique: 18 minutes

- 1ère incubation: 6 µL d'échantillon sont mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-ACE marqué à la biotine et d'un anticorps monoclonal anti-ACE marqué au ruthénium.¹¹ Il se forme un « sandwich ».
- 2ème incubation: les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.
- Le mélange réactionnel est aspiré dans la cellule de mesure où les microparticules sont maintenues au niveau de la surface de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell II M. Une différence de potentiels appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée spécifiquement pour l'analyseur utilisé par une calibration en 2 points et une courbe de référence fournie via **cobas link**.

(*) Ru(bpy)₃ : Tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II)

Réactifs - composition et concentrations

Le **cobas e** pack est étiqueté CEA.

M Microparticules tapissées de streptavidine, 1 flacon, 16,0 mL;
Microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/mL; conservateur

R1 Ac anti-ACE-biotine, 1 flacon, 21,0 mL;
Anticorps monoclonal (souris/humain) anti-ACE biotinylé 3,0 mg/L;
tampon phosphate 100 mmol/L, pH 6,0; conservateur

R2 Ac anti-ACE-Ru(bpy)₃²⁺, 1 flacon, 15,8 mL;
Anticorps monoclonal (souris) anti-ACE ruthénylé 4,0 mg/L; tampon phosphate 100 mmol/L, pH 6,5; conservateur

Précautions d'emploi et mises en garde


Pour diagnostic in vitro, usage réservé aux professionnels de santé. Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire.

Déchets infectieux ou microbiens :
Mise en garde : Manipuler les déchets comme des matériaux potentiellement infectieux. Éliminer les déchets conformément aux instructions et aux procédures du laboratoire.

Risques environnementaux :
Suivre toutes les réglementations locales en vigueur pour une élimination en toute sécurité.

Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels.

Ce coffret contient des substances classées de la manière suivante selon le Règlement (CE) No. 1272/2008 :



Mise en garde

H317 Peut provoquer une allergie cutanée.

H412 Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Prévention :

P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P273 Éviter le rejet dans l'environnement.

P280 Porter des gants de protection.

Réponse :

2021-09, V 5.0 Français

1 / 4

P333 + P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.

P362 + P364 Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

Élimination :

P501 Éliminer le contenu/réactif dans un centre de collecte de déchets agréé.

L'étiquetage de sécurité du produit est conforme aux recommandations SGH de l'UE.

Contact NL: tous pays: +49-621-7590

Éviter la formation de mousse dans les réactifs et les échantillons de tous types (échantillons de patients, calibrateurs et contrôles).

Préparation des réactifs

Les réactifs contenus dans le coffret sont prêts à l'emploi et ne peuvent être utilisés séparément.

Toutes les informations nécessaires au déroulement correct du test sont disponibles via [cobas link](#).

Conservation et stabilité

Conservation entre 2 et 8 °C.

Ne pas congeler.

Ranger le **cobas e** pack en position verticale, de manière à ce que toutes les microparticules soient rassemblées pour l'homogénéisation automatique qui précède l'analyse.

Stabilité :	
Avant ouverture, entre 2 et 8 °C	Jusqu'à la date de péremption indiquée
Sur les analyseurs	16 semaines

Prélèvement et préparation des échantillons

Seuls les types d'échantillons indiqués ci-dessous ont été testés et peuvent être utilisés.

Sérum recueilli sur tubes de prélèvement standard ou contenant un gel séparateur.

Plasma recueilli sur héparinate de lithium, EDTA dipotassique et EDTA tripotassique.

Les tubes de prélèvement de plasma contenant un gel séparateur peuvent être utilisés.

Critère d'acceptabilité: Pente 0.9-1.1 + coefficient de corrélation ≥ 0.95

Stabilité: 7 jours entre 20 et 25 °C, 14 jours entre 2 et 8 °C, 6 mois à -20 °C (± 5 °C). Les échantillons peuvent être congelés 3 fois.

Les différents types d'échantillons indiqués ci-dessous ont été testés à l'aide d'une sélection de tubes de prélèvement disponibles dans le commerce au moment du test : Les tubes de prélèvement des différents fabricants n'ont pas tous été testés. Les systèmes de prélèvement du sang de divers fabricants peuvent contenir différents matériaux pouvant, dans certains cas, avoir une influence sur le résultat du test. En cas d'utilisation de tubes primaires (systèmes de prélèvement du sang), suivre les instructions données par le fabricant.

Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.

Les échantillons ou contrôles stabilisés par de l'azote ne doivent pas être utilisés.

S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons de patients et des calibrateurs se situe entre 20 et 25 °C.

En raison des risques d'évaporation, il est recommandé de doser les échantillons et les calibrateurs dans les 2 heures qui suivent leur mise en place sur les analyseurs.

Matériel fourni

Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations ».

Matériel auxiliaire nécessaire

- [11731645322](#), CEA CalSet, 4 x 1.0 mL

- [11776452122](#), PrediControl Tumor Marker, pour 4 x 3.0 mL ou [11731416190](#), PrediControl Universal, pour 4 x 3.0 mL
- [07299001190](#), Diluant Universel, 45.2 mL, diluant pour échantillon
- Équipement habituel de laboratoire
- Analyseur **cobas e**
- Matériel auxiliaire pour les analyseurs **cobas e** 402 et **cobas e** 801 :
 - [06906799190](#), ProCell II M, 2 x 2 L, tampon système
 - [04880293190](#), CleanCell M, 2 x 2 L, solution de lavage pour la cellule de mesure
 - [07485409001](#), Reservoir Cup, 8 réservoirs pour ProCell II M et CleanCell M
 - [06906853190](#), ProClean II M, 2 x 2 L, solution de lavage
 - [05694302001](#), Assay Tip/Assay Cup tray, 6 x 6 blocs de 105 embouts de pipettes et 105 cuvettes, 3 boîtes à déchets
 - [07485425001](#), Liquid Flow Cleaning Cup, 2 tubes adaptateurs pour ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean pour Liquid Flow Cleaning Detection Unit
 - [07485433001](#), PreWash Liquid Flow Cleaning Cup, 1 tube adaptateur pour ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean pour Liquid Flow Cleaning PreWash Unit
 - [11298500316](#), ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean, 5 x 100 mL, solution de lavage du système

Réalisation du test

Pour garantir le bon fonctionnement du test, se conformer aux instructions relatives à l'analyseur utilisé indiquées dans le présent document. Pour les instructions spécifiques de l'analyseur, se référer au manuel d'utilisation approprié.

L'analyseur effectue automatiquement l'homogénéisation des microparticules.

Placer le **cobas e** pack réfrigéré (entre 2 et 8 °C) dans le compartiment réactif. Éviter la formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température des réactifs et l'ouverture/fermeture du **cobas e** pack.

Calibration

Traçabilité: la méthode a été standardisée par rapport à la première préparation de référence internationale de l'OMS (1st IRP 73/601). La courbe de référence est adaptée à l'analyseur à l'aide du CalSet respectif.

Fréquence des calibrations : Effectuer une calibration par lot de réactif en utilisant du réactif frais (le **cobas e** pack ayant été enregistré depuis au maximum 24 heures sur l'analyseur).

La fréquence de calibration peut être réduite après une vérification acceptable de la calibration par le laboratoire.

Une nouvelle calibration est recommandée :

- Après 12 semaines pour un même lot de réactif
- Après 26 jours pour un même **cobas e** pack resté sur l'analyseur
- Si nécessaire : Par ex. si les résultats du contrôle de qualité se situent en dehors des limites de confiance définies

Contrôle de qualité

Utiliser PrediControl Tumor Marker ou PrediControl Universal.

D'autres contrôles appropriés peuvent également être utilisés.

Il est recommandé de réaliser un dosage simple des contrôles (sans répétition) au moins une fois toutes les 24 heures pendant une routine, pour chaque nouveau **cobas e** pack et après chaque calibration.

La fréquence des contrôles et les limites de confiance doivent être adaptées aux exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance définies. Chaque laboratoire devra établir la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors des limites définies.

Le cas échéant, refaire une analyse des échantillons concernés.

Se conformer à la réglementation gouvernementale et aux directives locales en vigueur relatives au contrôle de qualité.

Calcul des résultats

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en ng/mL ou en µg/L.

1 ng/mL d'ACE correspond à 16,9 mU/mL.

Limites d'utilisation - Interférences

L'influence des substances endogènes et médicamenteuses suivantes sur les performances analytiques du test a été recherchée. Les interférences ont été testées jusqu'aux concentrations indiquées. Aucune influence sur les résultats n'a été observée.

Substances endogènes

Substance	Concentration testée
Bilirubine	≤ 1130 µmol/L ou ≤ 66 mg/dL
Hémoglobine	≤ 0,621 mmol/L ou ≤ 1000 mg/dL
Intralipid	≤ 2000 mg/dL
Biotine	≤ 286 nmol/L ou ≤ 70 ng/mL
Facteur rhumatoïde	≤ 1200 UI/mL

Critère d'acceptabilité: Recouvrement ± 1 ng/mL par rapport aux valeurs initiales ≤ 10 ng/mL et ± 10 % des valeurs initiales > 10 ng/mL.

Chez les patients traités par de fortes doses de biotine (> 5 mg/jour), il est recommandé d'effectuer le prélèvement de l'échantillon au moins 8 heures après la dernière administration.

On n'a pas observé d'effet croché jusqu'à des concentrations en ACE de 200000 ng/mL.

Substances pharmacologiques

L'influence de 16 médicaments fréquemment administrés a été recherchée in vitro. Aucune interférence n'a été observée.

Par ailleurs, les spécialités anti-cancéreuses suivantes ont été testées. Aucune interférence n'a été observée.

Spécialités anti-cancéreuses

Médicament	Concentration testée mg/L
Carboplatine	1000
Cisplatine	225
Ciclophosphamide	1000
Doxorubicine	75
Etoposide	400
Fluorouracile	500
Flutamide	1000
Méthotrexate	1000
Mitomycine	25
Tamoxifène	50
Taxol	5,5

Dans de rares cas, des titres extrêmement élevés d'anticorps dirigés contre des anticorps spécifiques de l'analyte, la streptavidine ou le ruthénium peuvent conduire à des interférences. Ces effets sont minimisés dans le test par un procédé approprié.

Pour le diagnostic, les résultats devraient toujours être confrontés aux données de l'anamnèse du patient, au tableau clinique et aux résultats d'autres examens.

Limites et intervalles

Domaine de mesure

0,3-1000 ng/mL (défini par la Limite du Blanc et le maximum de la courbe de référence). Les taux situés au-dessous de la Limite du Blanc sont exprimés de la manière suivante : < 0,3 ng/mL. Les taux situés au-dessus du domaine de mesure sont exprimés de la manière suivante : > 1000 ng/mL ou jusqu'à 50000 ng/mL pour les échantillons dilués au 1/50ème.

Limites inférieures de mesure

Limite du Blanc, Limite de Détection et Limite de Quantification

Limite du Blanc = 0,3 ng/mL

Limite de Détection = 0,6 ng/mL

Limite de Quantification = 1,8 ng/mL

La Limite du Blanc, la Limite de Détection et la Limite de Quantification ont été déterminées conformément aux exigences EP17-A2 du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

La Limite du Blanc correspond au 95^{ème} centile d'au moins 60 déterminations d'échantillons exempts d'analyte dans plusieurs séries indépendantes. La Limite du Blanc correspond à la concentration au-dessous de laquelle on obtient des échantillons exempts d'analyte avec une probabilité de 95 %.

La Limite de Détection a été déterminée sur la base de la Limite du Blanc et de l'écart-type des échantillons de faible concentration. La Limite de Détection correspond à la concentration en analyte la plus basse qui peut être détectée (valeur située au-dessus de la Limite du Blanc avec une probabilité de 95 %).

La Limite de Quantification est définie comme étant la concentration en analyte la plus basse pouvant être mesurée de manière reproductible et donnant un CV inter-séries ≤ 20 %.

Une étude interne a été réalisée conformément aux recommandations du protocole EP17-A2 du CLSI. La Limite du Blanc et la Limite de Détection ont été calculées et ont donné les valeurs suivantes :

Limite du Blanc = 0,134 ng/mL

Limite de Détection = 0,269 ng/mL

Pour la Limite de Quantification, des échantillons (n ≥ 4) de sérum humain ont été dosés sur un analyseur en 5 répliques par jour sur 5 jours. La Limite de Quantification était de 0,403 ng/mL pour un CV inter-séries ≤ 20 %.

Dilution

Les échantillons présentant une concentration en ACE située au-dessus du domaine de mesure peuvent être dilués avec Diluent Universel. Rapport de dilution recommandé: 1/50 (dilution automatique sur les analyseurs ou dilution manuelle). La concentration de l'échantillon dilué doit être ≥ 20 ng/mL.

Si la dilution est effectuée manuellement, multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

Si la dilution est effectuée par l'analyseur, le logiciel tient compte automatiquement de la dilution lors du calcul du résultat.

Valeurs de référence

Des études avec le test Elecsys CEA ont été effectuées sur 352 sujets sains. Les résultats suivants ont été obtenus:

	Tous sujets		Non fumeurs (anciens/ jamais fumeurs)		Fumeurs (actuels)	
	20-69	40-69	20-69	40-69	20-69	40-69
Âge (en années)	20-69	40-69	20-69	40-69	20-69	40-69
95 ^{ème} centile (ng/mL)	4,7	5,2	3,8	5,0	5,5	6,5
n	352	203	242	154	110	49

Chaque laboratoire devra vérifier la validité de ces valeurs et établir au besoin ses propres domaines de référence selon la population examinée.

Performances analytiques

Les performances analytiques indiquées ci-dessous sont représentatives. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

Précision

La précision a été déterminée à l'aide de réactifs Elecsys, d'échantillons et de contrôles, selon un protocole (EP05-A3) du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Chaque échantillon a été dosé en double dans 2 séries par jour pendant 21 jours (n = 84). Les résultats suivants ont été obtenus:

Analyseurs cobas e 402 et cobas e 801					
Echantillon	Moyenn-e ng/mL	Répétabilité		Précision inter-médiaire	
		SD ng/mL	CV %	SD ng/mL	CV %
Sérum humain 1	0.863	0.0209	2.4	0.0227	2.6
Sérum humain 2	1.77	0.0486	2.8	0.0581	3.3
Sérum humain 3	3.77	0.0659	1.7	0.0823	2.2
Sérum humain 4	522	10.8	2.1	12.1	2.3
Sérum humain 5	930	20.5	2.2	21.3	2.3
PreciControl TM ^{b)}	4.96	0.0797	1.6	0.103	2.1
PreciControl TM2	47.6	0.710	1.5	0.979	2.1
PreciControl U ^{c)}	4.63	0.0758	1.6	0.104	2.2
PreciControl U2	47.6	0.744	1.6	0.851	1.8

b) TM = Tumor Marker

c) U = Universal

Comparaison de méthodes

Une comparaison du test Elecsys CEA, 07027079190 (analyseur **cobas e 801**; y) avec le test Elecsys CEA, 11731629322 (analyseur **cobas e 601**; x) a donné les corrélations suivantes (en ng/mL) :

Nombre d'échantillons de sérum analysés : 141

Passing/Bablok¹³ Régression linéaire

$$y = 1.02x + 0.021 \quad y = 1.01x + 1.09$$

$$r = 0.993 \quad r = 1.00$$

Les concentrations des échantillons étaient situées entre 0.541 et 965 ng/mL.

Une comparaison du test Elecsys CEA, 07027079190 (analyseur **cobas e 402**; y) avec le test Elecsys CEA, 07027079190 (analyseur **cobas e 801**; x) a donné les corrélations suivantes (en ng/mL) :

Nombre d'échantillons analysés : 139

Passing/Bablok¹³ Régression linéaire

$$y = 0.979x + 0.183 \quad y = 0.975x + 0.818$$

$$r = 0.984 \quad r = 1.00$$

Les concentrations des échantillons étaient situées entre 0.488 et 966 ng/mL.

Spécificité analytique

Les réactions croisées avec les glycoprotéines du foie et du poulmon n'ont pas été étudiées.

Références bibliographiques

- 1 Thompson J, Zimmermann W. The carcinoembryonic antigen gene family: structure, expression and evolution. *Tumour Biol* 1988;9(2-3):63-83.
- 2 Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):67-81.
- 3 Thompson JA. Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol* 1995;16:10-16.
- 4 Ballesta AM, Molina R, Filolla X, et al. Carcinoembryonic Antigen in Staging and Follow-up of Patients with Solid Tumors. *Tumour Biol* 1995;16:32-41.
- 5 Rubel Moroff A. CEA serum levels in nonneoplastic disease. *Int J Biol Markers* 1992;7(3):160-166.
- 6 Fukuda I, Yamakado M, Kyose H. Influence of Smoking on Serum Carcinoembryonic Antigen Levels in Subjects Who Underwent Multiphasic Health Testing and Services. *J Med Syst* 1998;22(2):89-93.
- 7 Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer. Is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47(4): 624-630.

- 8 Duffy MJ, Van Dalen A, Haglund C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003;39(6): 718-727.
- 9 Sturgeon CM, Duffy MJ, Stanman UH, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast and Ovarian Cancers. *Clin Chem* 2008;54(12): e11-e79.
- 10 Kuroki M, Haruno M, Arakawa F, et al. Reaction profiles of seven enzyme immunoassay kits for carcinoembryonic antigen (CEA) analyzed with purified preparations of CEA and related normal antigens. *Clin Biochem* 1992;25:29-35.
- 11 Borner CP, Thane-Steen K. Epitope group specificity of six immunoassays for carcino-embryonic antigen. *Tumour Biol* 1991;12:9-15.
- 12 Hanada H, Muggi S, Takeoka K, et al. Early detection of colorectal cancer metastasis and relapse by recognizing non-specific cross-reacting antigen 2 in commercial carcinoembryonic antigen assays. *Clin Chem* 2009;55(9):1747-1748.
- 13 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783-790.

Pour de plus amples informations, se référer au manuel d'utilisation de l'analyseur concerné, aux fiches techniques respectives et aux notices d'utilisation de tous les réactifs nécessaires disponibles dans votre pays.

Dans cette fiche technique, le séparateur décimal pour distinguer la partie décimale de la partie entière d'un nombre décimal est un point. Aucun séparateur de milliers n'est utilisé.

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif doit faire l'objet d'une notification au fabricant et à l'autorité compétente de l'Etat membre dans lequel l'utilisateur ou le patient est établi.

Le résumé des caractéristiques de sécurité et des performances est disponible à l'adresse : <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symboles

Roche Diagnostics utilise les signes et les symboles suivants en plus de ceux de la norme ISO 15223-1 (pour les USA : voir diagf.roche.com pour la définition des symboles utilisés) :

	Contenu du coffret
	Analyseurs/appareils compatibles avec les réactifs
	Réactif
	Calibrateur
	Volume après reconstitution ou homogénéisation
	Code article international

Les ajouts, modifications ou suppressions sont signalés par une barre verticale dans la marge.

© 2021, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68205 Mannheim
www.roche.com
+49 6205 6000



Experimental procedure

The ViewRNA ISH™ Tissue Assay can be run in a single long day or broken up over two days for added flexibility. The procedure includes two parts:

- Part 1: "Prepare sample and hybridize target probe" (optional stopping point at end of procedure)
- Part 2: "Amplify and Detect Signal"

Prepare sample and hybridize target probe

1. Bake slides (65 minutes)
 - a. Set the dry oven or hybridization system to $60 \pm 1^\circ\text{C}$.
 - b. Label the slides with a pencil
 - c. Bake the slides. With a dry oven, insert slides into the slide rack and bake for 60 minutes. With a ThermoBrite System, keep the lid open and bake for 60 minutes. If necessary, adjust the ThermoBrite System so that it is at the correct temperature while the lid is open.
2. Prepare buffers, reagents, and equipment while slides bake
 - a. Verify that the hybridization system is set to $40 \pm 1^\circ\text{C}$ and that it is appropriately humidified.
 - b. Prepare 3 L 1X PBS: add 300 mL 10X PBS and 2.7 L ddH₂O to a 3 L capacity container.
 - c. Prepare 200 mL 10% NBF (4% formaldehyde in PBS), working in fume hood: add 178 mL 1X PBS + 22 mL 37% formaldehyde to a 200 mL capacity container and mix well.
 - d. Prepare 4 L Wash Buffer: add the components below in the order listed to a 4 L capacity container and mix well:
 - 3 L ddH₂O
 - 36 mL Wash Comp 1
 - 10 mL Wash Comp 2Adjust the total volume to 4 L with ddH₂O.
 - e. Prepare 500 mL 1X Pretreatment Solution: add 5 mL 100X Pretreatment Solution and 495 mL ddH₂O to a 1 L glass beaker.
 - f. If using the optional stopping point, prepare 200 mL Storage Buffer: add 60 mL Wash Comp 2 and 140 mL ddH₂O to a 200 mL capacity container.
 - g. Prepare 1 L of 0.01% ammonium hydroxide, working in a fume hood: add 0.33 mL 30% ammonium hydroxide and 999.67 mL ddH₂O in a 1 L capacity container.
 - h. Ensure the availability of:
 - 600 mL 100% ethanol
 - 1.4 L ddH₂O
 - 600 mL xylene or 600 mL Histo-Clear
 - 200 mL Gill's Hematoxylin I
 - 200 mL of 3 µg/mL DAPI in 1X PBS (optional, for fluorescence detection). Store in the dark at 4 °C until use.

- i. Thaw probe set(s). Mix, briefly centrifuge to collect contents, and place on ice until use.
 - j. Pre-warm 40 mL 1X PBS and Probe Set Diluent to $40 \pm 1^\circ\text{C}$.
 - k. If performing both parts of the assay in 1 day:
 - Pre-warm Pre-amplifier Mix, Amplifier Mix, and Label Probe Diluent to 40°C .
 - Briefly spin down the Label Probe 1-AP, Label probe 6-AP, and Blue reagents (for 2-plex), then place on ice until use.
 - Bring Fast Red Substrate, Red Reaction Buffer, Blue Buffer (for 2-plex), and AP Enhancer Solution to room temperature.
 - l. Optional: if using a microplate shaker for the washes, set the speed to 285 rpm. Place a slide rack in a clear staining dish containing the appropriate reagent and insert the slides into the rack. Manually lift the rack up and down 10 times. Put the lid on the staining dish and place it on a microplate shaker platform that is equipped with a non-skid pad. Shake for the recommended amount of time.
3. Deparaffinization (30 minutes)
- If using xylene (work in a fume hood):**
- a. Pour 200 mL of xylene into a green clearing agent dish.
 - b. Transfer the rack of baked slides to the green clearing dish containing the xylene.
 - c. Incubate the slides at room temperature for 5 minutes. Agitate frequently by moving the rack up and down.
 - d. Discard the used xylene and refill with another 200 mL of fresh xylene. Incubate slides at room temperature for 5 minutes with frequent agitation.
 - e. Repeat Step 3d above.
 - f. Remove the slide rack from the xylene and wash the slides twice, each time with 200 mL of 100% ethanol for 5 minutes with frequent agitation.
 - g. Remove the slides from the rack and place them face up on a paper towel to air dry for 5 minutes at room temperature.
- If using Histo-Clear:**
- a. Pour 200 mL of Histo-Clear into a green clearing dish and insert an empty slide rack.
 - b. Set the dry oven or hybridization system to $80 \pm 1^\circ\text{C}$.
 - c. Bake the slide for 3 minutes to melt the paraffin.
 - d. Immediately insert the warm slides into the Histo-Clear and agitate frequently by moving the rack up and down for 5 minutes at room temperature.
 - e. Discard the used Histo-Clear and refill the dish with another 200 mL of fresh Histo-Clear. Agitate frequently by moving the rack up and down for another 5 minutes at room temperature. Repeat this step once more for a total of 3 washes in Histo-Clear.
 - f. Remove the slide rack from the Histo-Clear and wash the slides twice, each time with 200 mL of 100% ethanol for 5 minutes with frequent agitation.
 - g. Remove the slides from the rack and place them face up on a paper towel to air dry at room temperature for 5 minutes.

4. Draw hydrophobic barrier (40 minutes)
 - a. Dab the hydrophobic barrier pen on a paper towel several times before use to ensure proper flow of the hydrophobic solution.
 - b. To create a hydrophobic barrier:
 - Place the slide over the template image, making sure that the tissue sections fall inside the blue rectangle.
 - Lightly trace the thick blue rectangle 2-4 times with the hydrophobic barrier pen to ensure a solid seal.
 - Allow for barrier to dry at room temperature for 20-30 minutes. Begin the next step while the barrier is drying.



5. Heat pretreatment (10-25 minutes, depending on optimized time)
 - a. Tightly cover the beaker containing the 500 mL of 1X Pretreatment Solution with aluminum foil, place it on a hot plate, and heat the solution to a temperature of 90-95°C. Use a waterproof probe thermometer to measure and maintain the temperature of the solution at 90-95°C during the pretreatment period.
 - b. Load the slides into the vertical slide rack.
 - c. Using a pair of forceps, submerge the slide rack into the heated 1X Pretreatment Solution. Cover the glass beaker with aluminum foil and incubate at 90-95°C for the optimal time as determined in "Sample pretreatment optimization procedures", page 33.
 - d. After pretreatment, remove the slide rack with forceps, submerge it into a clear staining dish containing 200 mL of ddH₂O, and wash for 1 minute with frequent agitation.
 - e. Repeat the wash one more time with 200 mL of fresh ddH₂O.
 - f. Transfer the slide rack to a clear staining dish containing 1X PBS.

IMPORTANT: Do not let the tissue sections dry out from this point forward. After heat pretreatment, sections can be stored covered in 1X PBS at room temperature overnight.
6. Protease digestion and fixation (30-50 minutes, depending on optimized time)
 - a. Prepare the working protease solution by diluting the Protease 1:100 in prewarmed 1X PBS (e.g. 4µL Protease added to 396 µL 1X PBS prewarmed to 40°C) and briefly vortex to mix. Scale reagents according to the number of assays to be run. Include one slide volume overage.
 - b. Remove each slide and flick it to remove excess 1X PBS. Without completely drying out the sections, tap the slides on the edge and then wipe the backside on a laboratory wipe.
 - c. Place the slides face up on a flat, elevated platform (e.g., Eppendorf tube rack for easier handling) and immediately add 400 µL of the working protease solution onto the tissue section. Make sure that the tissue section is covered with working protease solution. It may be necessary to spread the solution with a pipette tip.

- d. Transfer the slides to the hybridization system and incubate at 40 °C for the optimal time as determined in “Sample pretreatment optimization procedures”, page 33.
 - e. Pour 200 mL of 1X PBS into a clear staining dish and insert an empty slide rack into the dish.
 - f. After the incubation, decant the working protease solution from the slides, insert the slides into the rack and wash gently but thoroughly by moving the rack up and down for 1 min.
 - g. Repeat the wash one more time with another 200 mL of fresh 1X PBS.
 - h. Transfer the slide rack to a clear staining dish containing 200 mL of 10% NBF and fix for 5 minutes at room temperature under a fume hood.
 - i. Wash the slides twice, each time with 200 mL of fresh 1X PBS for 1 minute with frequent agitation.
7. Target probe set hybridization (2 hours and 10 minutes)
- a. Prepare the working probe set solution using the table below as a guide. Dilute the ViewRNA™ Probe Set 1:40 in prewarmed Probe Set Diluent and briefly vortex to mix. Scale reagents according to the number of assays to be run and include one slide volume overage.

Note: Add only 400 µL of Probe Set Diluent to the “negative control” or probe negative control slide.

1-plex (400 µL total volume)	Volume
Probe Set Diluent (prewarmed to 40°C)	390 µL
ViewRNA™ TYPE 1	10 µL
2-plex (400 µL total volume)	Volume
Probe Set Diluent (prewarmed to 40°C)	380 µL
ViewRNA™ TYPE 1 Probe Set	10 µL
ViewRNA™ TYPE 6 Probe Set	10 µL

- b. Remove each slide and flick it to remove excess 1X PBS. Without completely drying out the sections, tap the slides on the edge and then wipe the backside on a laboratory wipe
 - c. Place the slides face up on a flat, elevated platform and immediately add 400 µL of pre-warmed Probe Set Diluent to the negative probe control and 400 µL of working probe set solution to each test sample.
 - d. Transfer the slides to the hybridization system and incubate at 40°C for 2 hr.
8. Wash slides (8 minutes)
- a. Insert an empty slide rack into a clear staining dish containing 200 mL of Wash Buffer.
 - b. After incubation, decant the working probe set solution from the slides and insert them into the slide rack.
 - c. Wash the slides 3 times, each time with 200 mL of fresh Wash Buffer at room temperature for 2 minutes with constant and vigorous agitation.
 - d. If you plan to perform the assay over the course of two days, proceed to Step 9. Otherwise, proceed to “Amplify and detect signal” to complete the entire assay in one day.

9. Optional stopping point (1 minute)
 - a. Store slides in a clear staining dish containing 200 mL of Storage Buffer at room temperature for up to 24 hours. Cover the dish with a lid or sealing film to prevent evaporation.
 - b. Discard 1X Pretreatment Solution, 10% NBF, remaining protease and probe set working solutions.
 - c. Store the remaining 1X PBS and Wash Buffer at room temperature for use in "Amplify and detect signal".
 - d. If using a ThermoBrite System, rewet the ThermoBrite Humidity Strips in ddH₂O.
 - e. Proceed to "Amplify and detect signal" when you are ready to continue the assay.

Amplify and detect signal

1. Prepare additional buffers and reagents (5 minutes)
 - a. Pour Gill's Hematoxylin into a clear staining dish and store at room temperature protected from light until use.
 - b. Pre-warm Pre-amplifier Mix, Amplifier Mix, and Label Probe Diluent buffers to 40°C.
 - c. Briefly spin down the Label Probe 1-AP, Label probe 6-AP (for 2-plex), and Blue reagents (for 2-plex). Place them on ice.
 - d. Bring Fast Red Substrate, Red Reaction Buffer, AP Enhancer Solution, and Blue Buffer (for 2-plex) to room temperature.
2. Wash slides (5 minutes)
 - a. Remove the slides from Storage Buffer. Transfer slide rack to a clear staining dish containing Wash buffer, and wash for 2 minutes with frequent agitation.
 - b. Decant Wash Buffer, refill with 200 mL fresh Wash Buffer, and wash for 2 minutes with frequent agitation. Repeat this step once more for a total of 3 washes.
3. Pre-amplifier hybridization (35 minutes)
 - a. Swirl the Pre-amplifier Mix bottle briefly to mix the solution.
 - b. Remove each slide and flick it to remove the Wash Buffer. Without completely drying out the sections, tap the slide on its edge and then wipe the backside on a laboratory wipe. Place the slides face up on a flat, elevated platform and immediately add 400 µL of Pre-amplifier Mix to each tissue section.
 - c. Transfer slides to the hybridization system and incubate at 40°C for 25 min.
4. Wash slides (8 minutes)
 - a. Insert an empty slide rack into a clear staining dish containing 200 mL of Wash Buffer.
 - b. After incubation, decant the Pre-amplifier Mix from the slides and insert them into the slide rack.
 - c. Wash the slides 3 times, each time with 200 mL of fresh Wash Buffer at room temperature for 2 minutes with constant and vigorous agitation.

5. Amplifier hybridization (20 minutes)
 - a. Swirl the Amplifier Mix bottle briefly to mix the solution.
 - b. Remove each slide and flick it to remove the Wash Buffer. Without completely drying out the sections, tap the slide on its edge and then wipe the backside on a laboratory wipe. Place the slides face up on a flat, elevated platform and immediately add 400 μ L of Amplifier Mix to each tissue section.
 - c. Transfer slides to the hybridization system and incubate at 40°C for 15 min.
6. Wash slides (8 minutes)
 - a. Insert an empty slide rack into a clear staining dish containing 200 mL of Wash Buffer.
 - b. After incubation, decant the Amplifier Mix from the slides and insert them into the slide rack.
 - c. Wash the slides 3 times, each time with 200 mL of fresh Wash Buffer at room temperature for 2 minutes with constant and vigorous agitation.

IMPORTANT: For 1-plex assays, proceed directly to step 12: Label Probe 1-AP Hybridization, and omit steps 7–11. For 2-plex assays, continue with step 7.

7. Label Probe 6-AP hybridization (20 minutes)
 - a. Briefly spin down Label Probe 6-AP before using.
 - b. Prepare the Working Label Probe 6-AP Solution using the table below as a guide. Dilute Label Probe 6-AP 1:1000 in pre-warmed Label Probe Diluent and briefly vortex to mix. Scale reagents according to the number of assays to be run and include overage of one slide's volume.

Working Label Probe 6-AP Solution per slide (400 μ L total volume)	Volume
Label Probe Diluent (pre-warmed to 40°C)	399.6 μ L
Label Probe 6-AP	0.4 μ L

- c. Remove each slide and flick to remove the Wash Buffer. Without completely drying out the sections, tap the slide on its edge and then wipe the backside on a laboratory wipe. Place the slides face up on a flat, elevated platform and immediately add 400 μ L of Working Label Probe 6-AP Solution to each tissue section.
 - d. Transfer the slides to the hybridization system and incubate at 40°C for 15 min.
8. Wash slides (12 minutes)
 - a. Insert an empty slide rack into a clear staining dish containing 200 mL of Wash Buffer.
 - b. After incubation, decant the Working Label Probe 6-AP Solution from the slides and insert them into the slide rack.
 - c. Wash the slides 3 times, each time with 200 mL of fresh Wash Buffer at room temperature for 3 minutes with constant and vigorous agitation.
9. Apply Fast Blue Substrate (35 minutes)
 - a. Prepare the Fast Blue Substrate: Add 5 mL of Blue Buffer and 105 μ L of Blue Reagent 1 to a 15 mL conical tube and vortex. Add 105 μ L of Blue Reagent 2 and vortex. Add 105 μ L Blue Reagent 3 and briefly vortex. Protect from light by wrapping in aluminum foil until use.

- b. Remove each slide and flick it to remove the Wash Buffer. Without completely drying out the sections, tap the slide on its edge and then wipe the backside on a laboratory wipe. Place the slides face up on a flat, elevated platform and immediately add 400 μ L of Fast Blue Substrate.
 - c. Incubate in the dark at room temperature for 30 minutes.
10. Wash slides (12 minutes)
- a. Insert an empty slide rack into a clear staining dish containing 200 mL of Wash Buffer.
 - b. After incubation, decant the Fast Blue Substrate from the slides and insert them into the slide rack.
 - c. Wash the slides 3 times, each time with 200 mL of fresh Wash Buffer at room temperature for 3 minutes with constant and vigorous agitation.
11. Quench Label Probe 6-AP (35 minutes)
- a. Remove each slide and flick it to remove the Wash Buffer. Without completely drying out the sections, tap the slide on its edge and then wipe the backside on a laboratory wipe. Place the slides face up on a flat, elevated platform and immediately add 400 μ L of AP Reaction Stop Solution. Incubate in the dark at room temperature for 30 minutes.
 - b. Insert an empty slide rack into a clear staining dish containing 200 mL of 1X PBS.
 - c. After incubation, decant the AP Reaction Stop Solution from the slides and insert them into the slide rack.
 - d. Wash the slides twice, each time in 200 mL of fresh 1X PBS at room temperature for 1 minute with frequent agitation.
 - e. Replace the 1X PBS with 200 mL of fresh Wash Buffer and rinse any residual PBS from the slides by moving the slide rack up and down for 1 min.
12. Label Probe 1-AP hybridization (20 minutes)
- a. Briefly spin down Label Probe 1-AP before using.
 - b. Prepare the Working Label Probe 1-AP Solution using the table below as a guide. Dilute Label Probe 1-AP 1:1000 in pre-warmed Label Probe Diluent and briefly vortex to mix. Scale reagents according to the number of assays to be run and include coverage of one slide's volume.

Working Label Probe 6-AP Solution per slide (400 μ L total volume)	Volume
Label Probe Diluent (pre-warmed to 40°C)	399.6 μ L
Label Probe 1-AP	0.4 μ L

- c. Remove each slide and flick to remove the Wash Buffer. Without completely drying out the sections, tap the slide on its edge and then wipe the backside on a laboratory wipe. Place the slides face up on a flat, elevated platform and immediately add 400 μ L of Working Label Probe 1-AP Solution to each tissue section.
- d. Transfer the slides to the hybridization system and incubate at 40°C for 15 minutes.

-
13. Wash slides (12 minutes)
 - a. Insert an empty slide rack into a clear staining dish containing 200 mL of Wash Buffer.
 - b. After incubation, decant the Working LabelProbe 1-AP Solution from the slides and insert them into the slide rack.
 - c. Wash the slides 3 times, each time with 200 mL of fresh Wash Buffer at room temperature for 3 minutes with constant and vigorous agitation.
 14. Apply Fast Red Substrate (75 minutes)
 - a. Remove each slide and remove the Wash Buffer by flicking. Tap the slide on its edge and then wipe the backside on a laboratory wipe without letting the sections dry out. Place slides face up on a flat, elevated surface.
 - b. Immediately add 400 μ L of the AP Enhancer Solution to each tissue section and incubate at room temperature for 5 minutes while preparing the Fast Red Substrate.
 - c. Prepare the 400 μ L ViewRNA™ Fast Red staining solution for each slide: For 12 slides make 5 mL staining solution, but adjust the volume for more or less slides. Add 5 mL of ViewRNA™ Fast Red Reaction Buffer and add 80 μ L of ViewRNA™ Fast Red substrate 1 to a 15 mL conical tube and vortex. Add 80 μ L of ViewRNA™ Fast Red substrate 2 and vortex. Add 80 μ L ViewRNA™ Fast Red substrate 3 and briefly vortex. Protect from light by wrapping in aluminum foil until use.
 - d. Decant the AP Enhancer Solution and flick the slide twice to completely remove any excess AP Enhancer Solution. Tap the slide on its edge then wipe the backside on a laboratory wipe. Immediately add 400 μ L of Fast Red Substrate onto each tissue section.
 - e. Transfer the slides to the hybridization system and incubate at room temperature for 60 minutes.
 - f. Insert an empty slide rack into a clear staining dish containing 200 mL of 1X PBS.
 - g. After incubation, decant the ViewRNA™ Fast Red Staining solution from the slides and insert them into the slide rack.
 - h. Rinse off the excess ViewRNA™ Fast Red Staining solution from the slides by moving the slide rack up and down for 1 minute.
 15. Optional Counterstain (25 minutes)

Counter staining with Gill's hematoxylin for bright field microscopy:

 - a. Transfer the slide rack to the clear staining dish containing the 200 mL of Gill's hematoxylin and stain at room temperature.
 - b. Wash the slides 3 times, each time with 200 mL of fresh ddH₂O for 1 minute by moving the slide rack up and down.
 - c. Pour off the ddH₂O, refill with 200 mL of 0.01% ammonium hydroxide and incubate the slides for 10 seconds. Unused 0.01% ammonium hydroxide can be stored at room temperature for up to 1 month.
 - d. Wash the slides once more in 200 mL of fresh ddH₂O by moving the rack up and down for 1 minute.

Counter staining with DAPI for fluorescent imaging.

 - a. Prepare 200 mL of 1X DAPI staining solution by adding 2 drops of NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (Cat. No. R37606) per mL of

1X PBS or 3 µg/mL solution in PBS of DAPI, FluoroPure™ grade (Cat. No. D21490).

- b. Move the slide rack into a clear staining dish containing 200 mL 1X DAPI Staining solution. Incubate the slides for 1-5 min, then rinse them in 200 mL of fresh ddH₂O by moving the slide rack up and down for 1 minute.
- c. Remove the slides from the slide rack and flick to remove the excess ddH₂O. Tap the slide on its edge then wipe the backside on a laboratory wipe. Place them face up onto a paper towel to air dry in the dark.

16. Mounting for imaging

ViewRNA™ ISH Tissue Assay is compatible with most aqueous and non-aqueous Mountants. For Fluorescent imaging, the Mountants containing Antifades are highly recommended. When mounted with a curing, hardening mountant, slides can be stored for years at 2-8°C.

Mounting with Aqueous mountant:

- a. Follow the manufacturer's instruction for mounting. ViewRNA™ ISH Tissue Assay has been tested with ProLong™ Glass Antifade Mountant (Cat. No. P36980), SlowFade Diamond Antifade Mountant (Cat. No. S36963), and DAKO Ultramount mounting medium (Agilent Cat. No. S1964).

Mounting with non-Aqueous mountant:

- a. For dehydration, we recommend 2 washes for 1 minute each with 95% ethanol, then another 2 washes for 1 minute each with 100% ethanol.
- b. For optional clearing, we recommend 3 washes of 1 minute each with Richard-Allan Scientific™ Signature Series Clear-Rite™ 3 (Cat. No. 6901TS).

Note: Avoid using Xylene for clearing or dehydration steps. Xylene will dissolve ViewRNA™ Fast Blue or ViewRNA™ Fast Blue precipitates.

Mount with a non-aqueous mountant:

- a. We tested VectaMount™ (Vector Laboratories Cat. No. H-5000) successfully.



ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE
« Nouvelles approches thérapeutiques pour le pseudomyxome péritonéal *via* des modèles animaux et l'utilisation d'agents anti-angiogéniques et antibiotiques. »

Cynthia CROCHERAY

6 Décembre 2022

RESUME :

Le pseudomyxome péritonéal (PMP), aussi appelé maladie gélatineuse du péritoine, est un cancer rare du péritoine. La tumeur primitive qui se développe dans la lumière de l'appendice serait à l'origine de ce cancer. Cette tumeur, en se développant, obstruerait l'appendice et entraînerait une accumulation de mucus, qui conduirait à la rupture de l'appendice, avec une libération de cellules tumorales et de mucus, et peut-être aussi de bactéries présentes naturellement dans l'appendice ? dans le péritoine des patients. Cette origine soulève alors l'hypothèse d'une composante bactérienne associée aux cellules tumorales. De plus, une vascularisation importante est retrouvée dans cette maladie. Ces deux composantes ont conduit notre unité à explorer l'effet des antibiotiques et des anti-angiogéniques sur le développement de la maladie, et plus précisément la combinaison de ces deux types de traitements.

Afin d'obtenir un modèle murin de pseudomyxome, nous avons effectué une greffe intrapéritonéale de prélèvement de patients dans l'abdomen de souris immunodéprimées nues (projet Apafis #34082). Trois modèles ont été obtenus : STLO et BOGH qui sont des modèles d'ascite gélatineuse issus de deux patients différents ; et STLOM qui est un modèle de PMP sous forme de masse gélatineuse solide issu du même patient que STLO. Nous avons testé différentes combinaisons d'anti-angiogéniques et d'antibiotiques : mélange de métronidazole et d'amoxicilline en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib ; mélange de Pénicilline et de Streptomycine en association avec le Bevacizumab, le Sorafenib ou l'Aflibercept. Le sang et la tumeur (et l'ascite) ont été récupérés à la fin de l'expérience pour des analyses biochimiques post-mortem. Le dosage du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) sérique et tumoral a été effectué par la méthode immuno-enzymatique ELISA et le dosage de l'Antigène carcino-embryonnaire (ACE) par électrochimiluminescence (ECLIA). Enfin, la recherche des bactéries a été réalisée par hybridation *in situ* (HIS) sur des coupes de tissus de patients inclus en paraffine à partir de sondes ciblant l'ARN 16S des bactéries, spécifiquement l'ARN 16S de *Helicobacter pylori* ou l'ARN codant pour la protéine MUC2 qui est la mucine présente en grande quantité dans les prélèvements de patients.

Le mélange métronidazole et amoxicilline en association avec le Bevacizumab ou le Sorafenib ont induit une diminution significative du développement de l'ascite sur le modèle STLO ($p=0,002$ et $p=0,029$ respectivement). Puis, la combinaison Pénicilline/Streptomycine en association avec l'Aflibercept ont induit une diminution significative du développement tumoral, de l'ascite et de l'angiogenèse sur les modèles de pseudomyxome STLOM et BOGH par rapport aux souris non traitées contrôles ($p<0,0001$). De plus, la concentration moyenne en ACE est 5 fois plus faible dans le sérum des souris traitées et les concentrations moyennes en VEGF sérique et tumorale sont significativement plus élevées chez les souris traitées par rapport aux souris contrôles. Dans une seconde partie de nos recherches, nous avons pu observer une importante présence bactérienne et de *H. pylori* par HIS sur des coupes de patients ayant un PMP, en association avec une importante expression de MUC2.

La combinaison d'antibiotiques et d'anti-angiogéniques semble être efficace pour inhiber la croissance du PMP *in vivo* chez la souris. Cette combinaison pourrait être utilisée en cas de chirurgie contre indiquée devant un état général altéré, une impossibilité de retirer l'ensemble de la tumeur macroscopique par chirurgie de cytoréduction ou une récurrence après une première chirurgie. Les observations des bactéries par HIS sont à confirmer par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ou séquençage à partir des prélèvements des patients, dans le but d'affiner encore le choix de l'antibiothérapie.

Mots clés : Pseudomyxome péritonéal, bactéries, antibiotique, anti-angiogénique, modèles *in vivo*.