

Gaëlle Salaün<sup>1,2</sup>, Eléonore Eymard-Pierre<sup>1,2</sup>, Delphine Voisin<sup>1,2</sup>, Céline Pebrel-Richard<sup>1,2</sup>, Combes Patricia<sup>1,2</sup>, Carole Goumy<sup>1,2</sup>, Philippe Vago<sup>1,2</sup>, Laetitia Gouas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Service de Cytogénétique Médicale, CHU Estaing, Clermont-Ferrand, <sup>2</sup>UMR1240 Imost Inserm/UCA, Clermont-Ferrand, France

## Contexte et objectif

Le cancer du sein triple-négatif (TNBC) est un cancer très invasif associé à un profil clinique défavorable chez les femmes jeunes, avec un haut risque de rechute métastatique précoce. La matrice extracellulaire (MEC), composant clé du microenvironnement stromal, intervient dans l'invasion locale des carcinomes initiée par la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Figure 1, 2). Les tumeurs du sein triple-négatives se caractérisent par un fort potentiel migratoire et invasif pour lequel la TEM joue un rôle important.

Le profil tumoral des patients porteurs d'une trisomie 21 (T21) se caractérise par une faible incidence des cancers solides, dont le cancer du sein (Hasle et al). Un rôle protecteur de la matrice extra-cellulaire T21 (MEC-T21) a été avancé.

**Objectif du travail :** Evaluer la migration des cellules tumorales triple-négatives (MDA-MB468) sur une MEC-T21 sécrétée *in vitro*.

## Matériels et Méthodes

**Matériel biologique :** Fibroblastes trisomiques 21 (F-T21) (Coriell Institute, GB) pour la synthèse de la MEC «Trisomique 21» (MEC F-T21); Fibroblastes euploïdes (F-Eup) (Coriell Institute, GB) pour la MEC « euploïde » (MEC F-Eup); Lignée d'adénocarcinome mammaire triple négative MDA-MB 468 (ATCC, USA)

**Sécrétion de la Matrice extra-cellulaire :** 200 000 F-T21 ou F-Eup ont été mis en culture dans des plaques 24 puits de culture (20 mm) pendant 1 semaine. La décellularisation de la MEC a été réalisée par du Triton X-100 2% et de l'ammoniac 0,025 N.

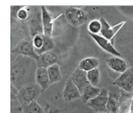
La validation du protocole de sécrétion de MEC a été réalisée par immunofluorescence indirecte anti-coll6A1 (Figure 3). 200 000 cellules MDA-MB-468 ont ensuite été ensemencées sur les MEC-T21 (n=2 puits de culture), MEC-Eup (n=2 puits de culture) ou sur le support plastique de culture (contrôle, n=2 puits de culture). Le test de blessure a eu lieu après 6 jours de contact des MDA-MB468 sur les MEC ou le support contrôle.

**Analyse du test de blessure:** les blessures ont été réalisées par *scratch* manuel à l'aide d'un cône de pipette (10 µL). Des photographies des blessures ont été faites après la réalisation de la blessure (H0), à 2 heures (H2), 4 heures (H4) et 6 heures (H6) à partir du même champs microscopique (Figure 4). La mesure de l'aire de blessure a été réalisée à partir des photographies grâce au logiciel ImageJ®. Les résultats obtenus ont été normalisés à partir des données obtenues à H0. L'expérience a été renouvelée 4 fois.

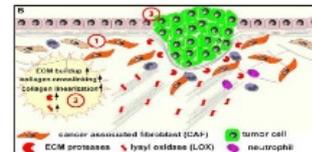
## Résultats et conclusions

Il n'y a pas de différence significative de migration entre les MDA-MB 468 ayant poussées sur MEC-Eup et MEC-T21 quels que soient les temps observés. Cependant, les cellules ayant poussées sur support plastique (contrôle) semblent avoir migrées plus rapidement que celles sur MEC (Eup ou T21).

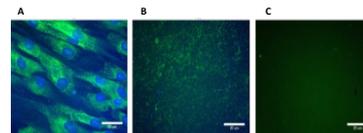
**En conclusion,** ces résultats ne semblent pas en faveur d'un rôle de la MEC-T21 sur la capacité migratoire des MDA-MB 468 mais démontrent que la présence d'une MEC *in vitro* modifie les propriétés de migration des cellules. Les études mécanistiques s'intéressant à la migration et à l'adhérence de cellules tumorales en culture monocouche (2D) pourraient donc bénéficier de la présence d'une MEC sécrétée *in vitro* pour s'approcher des conditions du microenvironnement tumoral présent *in vivo*.



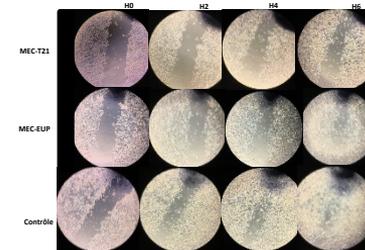
**Figure 1:** Cellules triple-négatives basal-like MDA-MB468 *in vitro*, les flèches montrent des cellules de morphologie fusiforme (phénotype mésenchymateux) (contraste de phase, X40)



**Figure 2:** Rôle de la matrice extracellulaire (MEC) dans le processus métastatique. 1 : stimulation par les cellules cancéreuses des fibroblastes environnants qui deviennent des fibroblastes associés aux cellules cancéreuses (cancer associated fibroblasts CAF). 2 : sécrétion par les CAF et les cellules tumorales d'enzymes de remodelage de la MEC à l'origine d'une accumulation et d'une linéarisation des fibres de collagène au front de la masse tumorale. 3 : Prolifération continue des cellules épithéliales tumorales et processus de transition épithélio-mésenchymateuse des cellules en périphérie qui pourraient franchir la membrane basale et migrer à travers la MEC. (D'après Lu et al, J cell Biol. 2012)



**Figure 3 :** Immunofluorescence indirecte (anti-COLVIA1, FITC, contre-marquage DAPI). A: avant décellularisation, B: après décellularisation, C: sans ensemencement de fibroblastes.



**Figure 4 :** Photographies du test de blessure sur les MDA-MB468 mises en culture sur une MEC-T21, MEC-Eup et condition contrôle au cours des temps (H0, H2, H4 et H6)

