

Interactions entre des cellules cancéreuses et l'endothélium

V. M. LAURENT^a, A. DUPPERRAY^{b,c}, C. VERDIER^a

a. CNRS- Université Grenoble I (UMR5588) LIPhy, 140 rue de la physique, 38041 Grenoble cedex (France)

b. Université Joseph Fourier-Grenoble I, Faculté de Médecine, Institut d'oncologie/développement, Albert Bonniot et Institut Français du Sang, UMR-S823, Grenoble (France)

c. INSERM U823, Grenoble (France)

Résumé :

Les cellules cancéreuses interagissent avec l'endothélium au cours du processus de formation des métastases [1]. Ce travail s'intéresse aux propriétés adhésives entre ces types cellulaires. Grâce à un AFM, nous pouvons avoir accès aux forces de rupture, qui dépendent des liaisons récepteur-ligand en présence, et aussi de la vitesse de chargement. Un modèle est proposé pour cette analyse. Les résultats sont analysés pour différentes lignées de cellules cancéreuses plus ou moins invasives.

Abstract :

Cancerous cells adhere to the endothelium during the metastasis process [1]. This work focuses on the adhesive properties between these two cell types. By use of an Atomic Force Microscope, we can measure the rupture forces which depend of receptor-ligand bonds and study them as a function of the loading rate. A model is proposed for this analysis. Results are analysed for different cancer cell lines with different invasiveness.

Mots clés : AFM, cellules cancéreuses, adhésion cellulaire

1 Introduction

Durant le processus métastatique, les cellules cancéreuses échappées d'une tumeur principale vont circuler dans le système sanguin pour aller envahir d'autres tissus (extravasation). Cette étape exige que la cellule tumorale adhère et migre au travers de l'endothélium vasculaire du tissu-cible. Bien que l'adhésion de la cellule tumorale à la monocouche de cellules endothéliales soit cruciale dans le processus d'extravasation, les forces d'adhérence en présence n'ont jamais été mesurées jusqu'à maintenant. L'objectif de cette étude est précisément d'évaluer les forces d'adhérence impliquées dans cette interaction et de mesurer ces forces pour des cellules cancéreuses qui présentent des degrés d'invasivité différents. La technique de choix pour réaliser ces mesures d'adhésion cellule-cellule est la technique de Microscopie à Force Atomique (AFM). Cette technique sophistiquée nous a permis de mesurer des forces de l'ordre de la dizaine de pN sur des systèmes biologiques vivants tout en faisant varier la vitesse de chargement. Cette technique a été plus particulièrement mise en œuvre dans le cas des lymphocytes T au contact avec des cellules endothéliales [2], ainsi que des travaux connexes par les mêmes auteurs [3], mais nous ne connaissons d'études portant sur des cellules cancéreuses à ce jour.

Dans la partie qui suit, nous détaillons les matériels et méthodes utilisés, puis nous montrons quelques résultats obtenus, ainsi qu'une discussion sur la comparaison des cellules. Enfin une brève conclusion résume les principales nouveautés de ce travail.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Culture cellulaire

Les cellules étudiées sont des cellules du cancer de la vessie humaine : lignées T24 très invasive et RT112 moins invasive, ainsi que des cellules endothéliales HUVEC (Human Vascular Umbilical Endothelial Cell). Trois jours avant l'expérience, les cellules endothéliales sontensemencées sur des lamelles en verres collées au fond d'une boîte de Pétri en plastique (diamètre 40 mm). Elles sont ensuite incubées à 37°C avec 5% de CO₂ dans une atmosphère humide. Le milieu de culture utilisé est du M199 avec 10% de SFV et des antibiotiques. Les cellules endothéliales sont alors à confluence au moment des expériences AFM.

Les cellules T24 ont été transfectées avec un plasmide exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein – pEGFP) afin d'être reconnues lorsqu'elles sont en présence des cellules endothéliales. En effet, les T24 ont la capacité de s'insérer dans une monocouche HUVEC [4]. Les cellules RT112 sont marquées par la calceïne qui est un marqueur cytoplasmique fluorescent.

Juste avant les expériences d'AFM, les cellules cancéreuses (T24 ou RT112) sont incubées avec 0,5 ml de trypsine-EDTA pour être mises en suspension puis centrifugées et resuspendues dans du milieu de culture RPMI 1640 contenant des antibiotiques et un tampon HEPES. Elles sont ensuite déposées dans le puits contenant les cellules endothéliales qui a été préalablement installé sur la platine commune du microscope optique et AFM.

2.2 Microscopie à Force Atomique

Nous utilisons un Microscope à Force Atomique JPK Nanowizard (JPK instruments, Berlin, Allemagne) associé à un microscope inversée Zeiss (modèle Observer D1) équipé en contraste de phase et en fluorescence (Carl Zeiss, Jena, Allemagne). L'AFM est utilisé en mode spectroscopie de force et est équipé du module CellHesion. Le module CellHesion, qui fonctionne à l'aide d'un actionneur piézoélectrique, permet de réaliser des déplacements verticaux de la platine du microscope jusqu'à 100 µm, indispensables pour étudier les interactions cellule-cellule. En parallèle de ce module, un PIFOC (Physik Instrumente, Karlsruhe, Allemagne) est monté sur l'objectif du microscope afin de déplacer l'objectif simultanément avec la platine du microscope et ainsi garder le même plan d'observation durant les mesures de spectroscopie de force. Le contrôle de la température est assuré par un module « Petri Dish Heater » (JPK Instruments) qui permet de réaliser toutes les expériences à 37°C. Les cantilevers utilisés pour la spectroscopie de force sont sans pointe (afin d'attraper les cellules), en forme de V, faits en nitrure de Silicium et recouvert d'or pour une meilleure réflexion du laser (MLCTO, Bruker, France). La constante de raideur est d'environ 0,01N/m. La sensibilité du système optique (exprimée en nm/Volts) et la constante de raideur (estimée par la méthode du bruit thermique) sont évaluées au début de chaque expérience.

2.3 Préparation du levier

Pour faire adhérer la cellule tumorale, les leviers sont fonctionnalisés avec la molécule Biotine-ConA (Biotine conjugated Canavalia ensiformis Lectin- Jackbean, Interchim, France). Cette molécule permet de fixer la cellule tumorale au microlevier avec une force supérieure à celle que nous souhaitons étudier : la Biotine-ConA adhère à la membrane cellulaire via des forces > 2-3 nN alors que les forces impliquées dans l'interaction cellule-cellule sont de l'ordre de la centaine de pN [3].

2.4 Spectroscopie de force

Notre approche expérimentale a consisté pratiquement à mesurer les forces d'adhésion entre une cellule tumorale et une cellule endothéliale incluse dans une monocouche cellulaire. Les expériences consistent à positionner le microlevier au dessus d'une cellule tumorale et de venir au contact de la cellule pendant quelques secondes avec une force d'environ 1nN (figure 1a). Le levier (avec la cellule tumorale) est alors rétracté lentement à vitesse constante et la cellule est laissée au repos pendant 15 minutes pour permettre d'établir une forte adhésion.

Les expériences de Spectroscopie de Force consistent à positionner le microlevier au dessus d'une cellule endothéliale, de descendre le levier afin de mettre la cellule tumorale en contact avec le corps cellulaire de la cellule endothéliale, d'appuyer avec une force de 1nN pendant un temps court (10 secondes) et ensuite de retirer la sonde à vitesse constante. La mesure de la déflexion du levier en fonction du déplacement vertical permet ainsi de détecter des événements comme des ruptures potentielles de complexes récepteur-ligand. La

figure 1b présente un exemple de courbe obtenue par cette méthode de spectroscopie de forces adhésives. L'évaluation de la force se fait à partir de la déflexion du levier et de la constante de raideur du levier.

Comme la vitesse de retrait du microlevier joue fortement sur la valeur des forces de rupture, nos expériences ont été réalisées pour des vitesses allant de 0,5 $\mu\text{m/s}$ à 10 $\mu\text{m/s}$ et avec une vitesse d'approche de 1 $\mu\text{m/s}$.

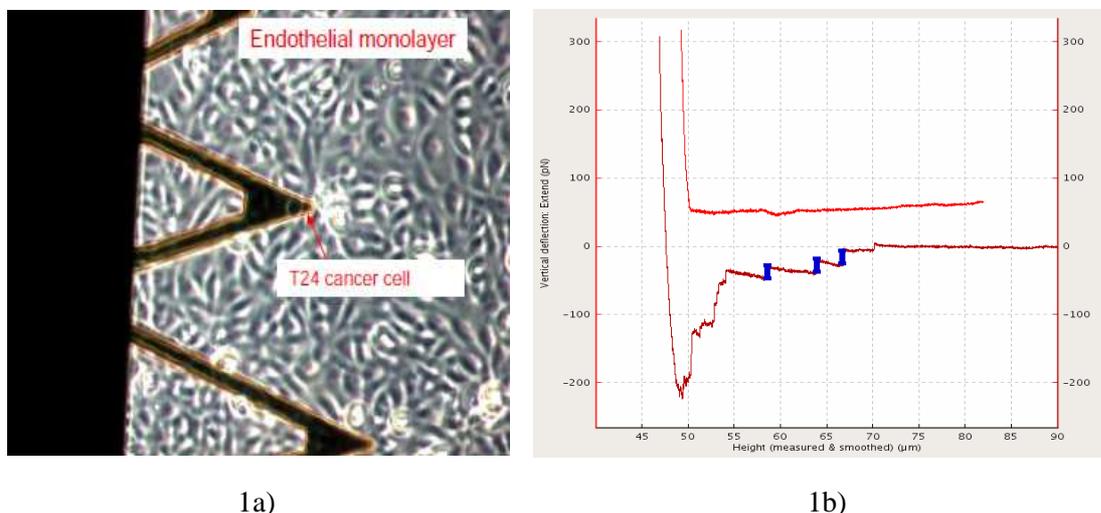


FIG. 1 – **1a)** Image en contraste de phase de la cellule cancéreuse T24 attachée au levier, alors qu'elle est positionnée au dessus d'une cellule endothéliale. **1b)** Courbe de force adhésive entre une cellule tumorale T24 et une cellule endothéliale : cette courbe représente la déflexion du levier en fonction de sa position, au moment de l'approche (courbe rouge) et au moment du retrait (courbe rouge foncé). Sur la courbe de retrait, on observe les ruptures successives des liaisons par des variations brutales de la déflexion (cf. sauts en bleu)

Une même cellule est ensuite utilisée plusieurs fois pour interagir avec d'autres cellules endothéliales. Entre chaque expérience, la cellule est laissée au repos pendant un temps dépendant de la vitesse de sollicitation : plus la vitesse est lente, plus la cellule se repose entre deux tests, comme déjà suggéré [5]. Les résultats sont ensuite collectés pour différentes cellules cancéreuses, au cours d'essais semblables et sont présentés ci-dessous.

3 Résultats et Discussion

La figure 2 présente les variations des forces d'adhésion entre cellules cancéreuses et cellules endothéliales. Il apparaît que les forces d'adhésion augmentent en fonction de la vitesse de rétraction. Les cellules T24 les plus invasives présentent des forces d'adhésion plus élevées avec les cellules endothéliales que les forces impliquées dans le cas des cellules RT112 les moins invasives. Cette différence suppose que les cellules T24 et les cellules RT112 adhèrent aux cellules endothéliales via des liaisons récepteur-ligand différentes. Il a été montré que la coculture de cellules tumorales T24 avec des HUVEC induit la surexpression des protéines membranaires ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine sur les cellules endothéliales alors qu'aucune surexpression n'est observée sur les cellules tumorales après co-culture [4]. L'objectif est donc maintenant d'identifier les complexes récepteur-ligand mis en jeu lors de l'interaction cellule endothéliale-cellule tumorale (T24 ou RT112). Les perspectives expérimentales sont donc de reproduire ces mesures de forces adhésives en ayant au préalable bloqué les récepteurs ICAM-1 des cellules endothéliales avec un anticorps anti-ICAM1 afin d'affirmer ou d'infirmer que le récepteur ICAM-1 est impliqué dans cette interaction. Les mêmes expériences seront également réalisées en ayant au préalable bloqué des récepteurs tels que les intégrines des cellules tumorales comme montré par Haddad *et al.* [1,4].

Sur la figure 2, il apparaît également une augmentation des forces en fonction de la vitesse de rétraction, cette augmentation rejoint le formalisme de Bell [6] qui interprète cette variation selon un modèle cinétique. Lorsqu'un état d'équilibre définissant une interaction récepteur-ligand est perturbé par une force F , alors le paysage énergétique est décalé de la quantité $-F x$, où x désigne la « coordonnée de séparation ». Il est alors plus facile de sortir d'un état stable et l'on peut calculer la probabilité de rupture de la liaison. La constante de

dissociation k_d de la réaction de formation de la liaison entre le récepteur et le ligand $R + L \rightleftharpoons R-L$ est alors donnée par la formule $k_d = k_d^0 \exp(\gamma F/k_B T)$, où γ est une distance, k_d^0 désigne la constante à force nulle, k_B et T représentant la constante de Boltzmann et la température respectivement. Dans ce cas, la relation entre la force de rupture la plus probable F^* et le taux de chargement r_f est une relation semi-logarithmique [6] qui est vérifiée en particulier dans le cas des forces de cisaillement dans un écoulement [7]:

$$F^* = F_0^* \log(r_f) \quad (1)$$

ou F_0^* est une force (N) et r_f est le taux de chargement (N/s) qui vaut simplement $r_f = k V_r$; ici V_r (m/s) est la vitesse de rétraction de la pointe AFM alors que k (N/m) est la constante de raideur. Ainsi la courbe ci-dessous (FIG.2) peut aussi bien être représentée en fonction du taux de chargement r_f .

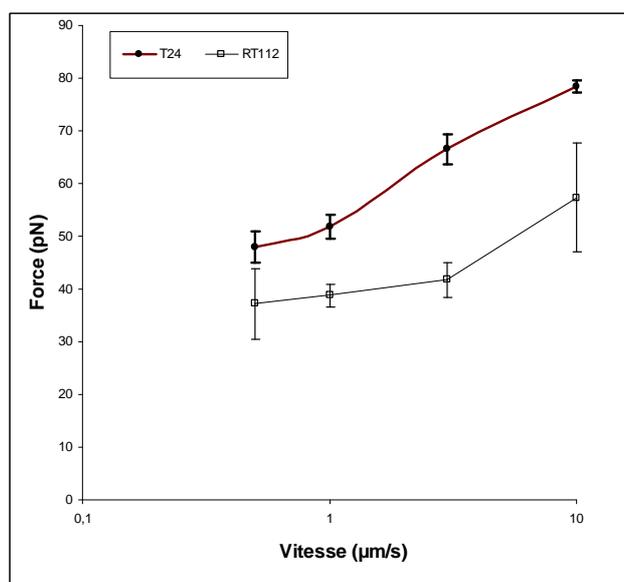


FIG. 2 – Evolution de la force de rupture récepteur-ligand (pN) en fonction du logarithme de la vitesse de rétraction (µm/s)

Il peut ainsi être intéressant de regarder la variation de la force en FIG. 2 en fonction de la vitesse. Il est possible qu'un régime linéaire existe [6] ou bien que deux régimes successifs (deux pentes) soient mis en évidence comme observé par Merkel et *al.* [8] dans les systèmes streptavidine-biotine, mais les données ne sont pas encore suffisantes pour l'affirmer. De plus l'historique de la formation des liaisons peut aussi donner des états métastables conduisant à des valeurs différentes qu'il faut re-analyser avec précaution [9]. Enfin, il est aussi apparu des liaisons de nature différente, les liaisons coincées (« catch bonds ») qui donnent des cinétiques particulières [10], en particulier pour les ligands des sélectines, mais nous ne pensons pas que de telles explications sont possibles. Nous concluons que les évolutions observées montrent clairement la présence de liaisons de type récepteur-ligand entre des molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales, probablement ICAM-1, VCAM-1 ou la sélectine E. Du côté des cellules cancéreuses, les candidats potentiels sont probablement des intégrines comme proposé précédemment [4,11]. Il est clair cependant que les liaisons sont plus fortes dans le cas des cellules plus invasives de type T24 par rapport aux cellules RT112 de moindre invasivité.

Conclusions et perspectives

Dans cette étude, il a été démontré que les interactions entre cellules cancéreuses avec l'endothélium vasculaire sont de nature spécifique et peuvent être identifiées par AFM. La mesure de ces forces d'interaction s'avère un outil très pertinent de caractérisation des cellules cancéreuses, puisque leur invasivité

est liée à une certaine capacité à adhérer à la paroi. Nous avons montré que les interactions concernant des cellules plus invasives sont liées à des forces plus importantes qui apparemment mettent en jeu des molécules d'adhésion différentes. Cette étude se poursuit ainsi par l'identification des récepteurs et des ligands mis en jeu, qui seront testés en utilisant des anticorps bloquant ces molécules d'adhésion.

Références

- [1] Haddad O., Chotard-Ghodsni R., Verdier C., Duperray A., Tumor cell/endothelial cell tight contact upregulates endothelial adhesion molecule expression mediated by NFkB: differential role of the shear stress, *Exp. Cell Res.*, 316, 615-626, 2010.
- [2] Zhang X., Wojcikiewicz E.P. and Moy V.T., Dynamic adhesion of T lymphocytes to endothelial cells revealed by atomic force microscopy, *Exp. Biol. Med.*, 231, 1306-1312, 2006.
- [3] Zhang X; et al., Atomic force microscopy measurement of leukocyte-endothelial interaction., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 286, 359-367, 2004.
- [4] Haddad O., Étude des interactions entre les cellules tumorales et l'endothélium vasculaire : rôles des contraintes de cisaillement, Thèse de l'Université Joseph Fourier, 2007.
- [5] Krieg M., Arboleda-Estudillo Y., Puech P-H., Käfer J., Graner F., Müller D. J., Heisenberg C.-P., Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish, *Nat. Cell Biol.*, 10, 429-436, 2008.
- [6] Bell G.I., Models for the specific adhesion of cells to cells, *Science*, 200, 618-627, 1978.
- [7] Verdier C., Couzon C., Duperray A., Singh P., Modeling cell interactions under flow, *J. Math. Biol.*, 58, 235-259, 2009.
- [8] Merkel R., Nassoy P., Leung A., Ritchie K., Evans E., Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy, *Nature*, 397, 50-53, 1999.
- [9] Pincet F., Husson J., The solution to the streptavidin-biotin paradox: the influence of history on the strength of single molecular bonds, *Biophys. J.*, 89, 4374-4381, 2005.
- [10] Yago T., Wu J., Wey C. D., Klopocki A.G., Zhu C., McEver R.P., Catch bonds govern adhesion through L-selectin at threshold shear, *J. Cell Biol.*, 166, 913-923, 2004.
- [11] Mierke C.T., Frey B., Fellner M., Herrmann M., Fabry B., Integrin $\alpha 5 \beta 1$ facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces, *J. Cell Sci.*, 124, 369-383, 2011.