

09h30	Accueil des participants
10h15	Ouverture Anne-Marie GUE & Gilles FAVRE
10h30	OncoDevice : une rencontre réussie entre techno & cancer
10h30	Présentation du projet et de sa conception – Anne-Marie GUE (LAAS) & Pierre CORDELIER (CRCT)
10h45	#OncoDevice : Développement de nouveaux micro dispositifs basés sur la nanofluidique et l'imagerie en fluorescence pour la détection et la quantification des microARNs – Pierre CORDELIER (CRCT), Thierry LEICHLÉ (LAAS)
11h00	Session 1 – Imagerie
11h00	Imagerie 3D en profondeur par microscopie à feuille de lumière – Jacques ROUQUETTE (ITAV)
11h10	Echographie opto-acoustique de la cellule – Bertrand AUDOIN (I2M)
11h20	Dispositif d'imagerie polarimétrique déporté par fibre optique – Dominique PAGNOUX (Xlim)
11h30	L'IRM et la séquence MP2RAGE pour la détection et la caractérisation rapide de métastases et de tumeurs – Emeline RIBOT & Thibaut FALLER (CRMSB)
11h40	Assemblage de copolymères diblocs à l'aide de gadolinium: vers de nouveaux agents de contraste pour l'IRM – Jean-Daniel MARTY (IMRCP)
11h50	Session 2 – Autres technologies
11h50	Vaccination antitumorale par pIRE amplifié par transfert d'IL12 par électrotransfert cutané – Justin TEISSIE (IPBS)
12h00	Modèles 3D d'organoïdes intestinaux – Audrey FERRAND (IRSD)
12h10	Recherche de nouveaux bio-marqueurs diagnostiques du cancer de la prostate : étude du profil LC-MS de métabolites oxygénés d'acides gras polyinsaturés urinaire – Claire VIGOR (IBMM)
12h20	Plateforme de Métabolomique et de Fluxomique de Toulouse – Floriant BELLVERT (MetaToul)
12h30	Capteur sans contact pour la mesure de vibration et d'écoulement sanguin : Application à la cornée et au cancer de la peau – Adam QUOTB (LAAS)
12h40	A genetic algorithm to classify cancer samples – William RITCHIE (IGH)
13h00	Déjeuner
14h00	#OncoDevice : Développement de microenvironnements 3D mimant la crypte intestinale par Bioimpression – Laurent MALAQUIN (LAAS), Arnaud BESSON (CRCT)
14h15	Session 3 – Problématiques biologiques et cliniques
14h15	Modélisation des relations stroma-épithélium lors des pathologies intestinales – Audrey FERRAND (IRSD)
14h30	Étude de faisabilité d'un caryotype moléculaire par séquençage très haut débit selon la technique "Massive Parallel sequencing" sur ADN tumoral circulant (ADN Tc) – Jean CHIESA (CHU Nîmes)
14h45 à 16h30	Rencontres entre participants (sur inscription préalable)

Prénom	Nom	Laboratoire / Société	Statut	Ville
Pauline	ASSEMAT	Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse	Chargé de Recherche	TOULOUSE
Sandrine	ASSIÉ-SOULEILLE	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Ingénieur de Recherche	TOULOUSE
Bertrand	AUDOIN	Institut de Mécanique et d'Ingénierie	Professeur des Universités	TALENCE
Florian	BELLVERT	Plateforme MetaToul	Ingénieur d'Etudes	TOULOUSE
Christine	BEZOMBES	Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse	Chargé de Recherche	TOULOUSE
Charline	BLATCHE	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Assistant Ingénieur	TOULOUSE
Colman	BUCKLEY	XLIM	Doctorant	LIMOGES
Florian	BUGARIN	Institut Clément Ader	Maître de Conférences	TOULOUSE
Florence	CABON	Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse	Directeur de Recherche	TOULOUSE
Jean	CACHEUX	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Doctorant	TOULOUSE
Franck	CARCENAC	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Ingénieur de Recherche	TOULOUSE
Jean	CHIESA	Laboratoire de Cytogénétique et Génétique Médicale / CHRU CAREMEAU	Praticien hospitalier	NIMES
Pierre	CORDELIER	Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse	Directeur de Recherche	TOULOUSE
Rémi	COURSON	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Ingénieur de Recherche	TOULOUSE
Sylvain	CUSSAT-BLANC	Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant	Maître de Conférences	TOULOUSE
Fabienne	DE TONI-COSTES	Cancer-Bio-Santé Pôle de compétitivité	Chargé de mission	TOULOUSE
Thibaut	FALLER	Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques	Doctorant	BORDEAUX
Audrey	FERRAND	Institut de Recherche en Santé Digestive	Chargé de Recherche	TOULOUSE
Loïc	FIÉVET	STROMALab	Interne	TOULOUSE
Camille	GIRONDE	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes, société LED	Technicien	TOULOUSE
Anne-Marie	GUE	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Directeur de Recherche	TOULOUSE
Dimitri	HAMEL	Institut de Recherche en Santé Digestive	Master	TOULOUSE
Lionel	HAVION	Fondation Toulouse Cancer Santé	Chargé de mission	TOULOUSE
Alejandro Kayum	JIMENEZ ZENTENO	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Doctorant	TOULOUSE
Laurent	MALAUQUIN	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Chargé de Recherche	TOULOUSE
Jean-Daniel	MARTY	Laboratoire des IMRCP	Maître de Conférences	TOULOUSE
Claire	METAIS	Toulouse Tech Transfer	Business Developer	TOULOUSE
Dominique	PAGNOUX	XLIM	Chargé de Recherche	LIMOGES
Julie	PANNEQUIN	Institut de Génomique Fonctionnelle	Directeur de Recherche	MONTPELLIER
Carine	PESTOURIE	Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et de Ressources Expérimentales	Ingénieur de Recherche	TOULOUSE
Adam	QUOTB	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Maître de Conférences	TOULOUSE
William	RITCHIE	Intelligence artificielle et regulation genique / Institut de Génétique Humaine	Chargé de Recherche	MONTPELLIER
Marie-Pierre	ROLS	Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale	Directeur de Recherche	TOULOUSE
Jacques	ROUQUETTE	Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant	Ingénieur de Recherche	TOULOUSE
Aude	RUBIO	Institut de Recherche en Santé Digestive	Ingénieur d'Etudes	TOULOUSE
Stéphane	SEGONDS	Université Toulouse 3 Paul Sabatier	Maître de Conférences	TOULOUSE
Pascal	SWIDER	Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse	Professeur des Universités	TOULOUSE
Justin	TEISSIE	Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale	Directeur de Recherche	TOULOUSE
Emmanuelle	TREVISIOL	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes	Chargé de Recherche	TOULOUSE
Laurence	VAYSSE	CHU Purpan	Ingénieur de Recherche	TOULOUSE
Claire	VIGOR	Institut des Biomolécules Max Mousseron	Maître de Conférences	MONTPELLIER

OncoDevice 1

Développement de nouveaux micro dispositifs basés sur la nanofluidique et l'imagerie en fluorescence pour la détection et la quantification des microARNs

Thierry LEICHLÉ¹, Pierre CORDELIÉ²

¹ Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

² Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Les microARNs sont des ARNs courts non codants régulateurs de l'expression génique. Les microARNs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, et font figures de biomarqueurs candidats compte tenu de leur expression différentielle et de leur grande stabilité. Notre équipe a démontré que les microARNs sont impliqués dans la carcinogenèse pancréatique.

De plus, nous avons démontré que les microARNs salivaires peuvent aider au diagnostic du cancer, alors que les microARNs présents dans le plasma sont prédictifs de réponse au traitement. A l'heure actuelle, plusieurs technologies sont disponibles pour la détection des microARNs circulants, mais il n'existe pas à notre connaissance de kit diagnostique compatible avec une utilisation clinique.

Nous présenterons nos principaux résultats concernant le développement d'un dispositif original couplant nanofluidique et microscopie en fluorescence, pour la détection sensible, spécifique et en temps réels de microARNs candidats.

1-1

Imagerie 3D en profondeur par microscopie à feuille de lumière: exemple d'application sur des modèles de lymphome

Jacques ROUQUETTE¹, Christine BEZOMBES²

¹ Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant

² Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

La microscopie à feuille de lumière (SPIM) est une méthode polyvalente et puissante pour l'imagerie 3D d'organismes entiers et d'échantillons multicellulaires. Le SPIM combine deux trajets optiques séparés, un pour l'illumination par la feuille de lumière, et l'autre perpendiculaire au premier, pour la détection, ce qui en fait un microscope champ large à sectionnement optique rapide. Cette configuration originale et spécifique fait du SPIM une technologie de choix pour visualiser sur plusieurs centaines de μm voire quelques mm des organismes entiers ou des modèles multicellulaires en 3D avec une faible phototoxicité. Une des applications est l'imagerie en temps réel n'altérant pas la croissance et l'organisation 3D des modèles. Une autre application est l'imagerie d'organe/tissu/tumeurs transparisés en 3D sur plusieurs mm voir cm. La plateforme d'imagerie photonique de l'ITAV dispose de plusieurs prototypes de SPIM permettant de couvrir des échelles d'échantillon allant du μm au cm. De plus, elle possède une expertise dans la manipulation, préparation et analyse post-acquisition de ces échantillons en 3D. Une collaboration a été initiée avec l'équipe 9 du CRCT portant sur l'étude des lymphomes folliculaires qui est un des plus fréquents lymphomes non Hodgkiniens. Son traitement a bénéficié de l'introduction des anticorps monoclonaux (ACM) anti-CD20 qui sont utilisés seuls ou en association avec la chimiothérapie. On constate cependant que: i) la maladie reste incurable avec des rechutes fréquentes; et ii) des patients restent réfractaires au traitement. Pour comprendre ces échecs, il est nécessaire d'étudier et de quantifier la distribution et la diffusion des ACM au sein des modèles 3D de lymphome folliculaire (MALC, multicellular aggregates of lymphoma cells) sans altérer leur structure. Pour ce projet, nous avons imagé des MALCs par microscopie à feuille de lumière après traitement par des ACM thérapeutiques et mis en place des outils d'analyses performants et automatisés permettant de caractériser les paramètres d'intérêt sur ces modèles 3D de lymphomes folliculaires. Ce projet de recherche interdisciplinaire a pour but de permettre la modélisation par imagerie à feuille de lumière des observations cliniques et potentiellement d'expliquer la faible efficacité des ACM chez les patients atteints de LF et présentant de fortes masses tumorales.

Echographie opto-acoustique de la cellule

Bertrand AUDOIN

Institut de Mécanique et d'Ingénierie

Single cell optical ultrasonography

Nuclear mechanics and structural integrity have been shown to be critical for a variety of cellular functions, and their alteration is correlated to many diseased conditions, such as cancer or degenerative diseases.[1-3] Understanding nuclear mechanics is thus essential for the analysis of the physical mechanisms underlying fundamental biological processes involved in several diseases of high societal impact.

It was reported recently that measuring the speed and attenuation of sound in cells with the conventional acoustic microscopy can differentiate malignant cancer cells from benign cells.[4] However, owing to the frequencies in play (up to ~400MHz) this conventional acoustic microscopy can not resolve nuclear features spatially.

Picosecond ultrasonics is an optical technique that offers the possibility to generate and detect acoustic waves remotely with an unequalled frequency bandwidth and with sub micron resolution. After decades of developments and applications for researches in solid-state physics, a vast application field was recently demonstrated for the picosecond ultrasonic technique in biology and medicine. The opto-acoustic team at I2M indeed has achieved the pioneering applications of the picosecond ultrasonic technique to the investigation of cell mechanics.[5] We have obtained experimental data for the stiffness of single animal cell nuclei in the previously unexplored GHz frequency range and we notably have shown sensitivity of our experiments to the stiffness of an elastic network of chromatin fibres.[6]

When coupled with convenient scanning devices and fast acquisition systems the technique offers several solutions for single cell microscopy with a resolution equal to that provided by standard optics and with the mechanical properties as the contrast mechanism. We have demonstrated an inverted pulsed opto-acoustic microscope (iPOM) that probes mechanical properties with a micron resolution. It allows mapping quantitatively cell structures as thin as 10 nm and resolving the fibrillar details of cells.[7]

With the inverted pulsed opto-acoustic microscope we have built we could also measure and map the sound velocities in single cell nuclei, thus yielding direct and remote access to the mapping of single nuclei mechanical stiffness. For several cells of the same samples, we could collect large numbers of velocity measurements within the nucleus of each cell. The statistics reveals the inhomogeneity of the nucleus nanostructure. The ability of the remote and label free opto-acoustic technique to scrutinize the relation of the nucleus inhomogeneity with the cell activity during biologic processes will be commented.

1. P. Isermann and J. Lammerding, "Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease", *Curr. Biol.*, 23, R1113 (2013)
2. S. Suresh, "Biomechanics and biophysics of cancer cells", *Acta Materialia* 55, 3989 (2007)
3. G. Bao and S. Suresh, "Cell and molecular mechanics of biological materials", *Nature materials* 2, 715 (2003)
4. K. Miura and S. Yamamoto, "A scanning acoustic microscope discriminates cancer cells in fluid", *Scientific Reports* 5, 15243 (2015)
5. C. Rossignol et al., "In Vitro picosecond ultrasonics in a single cell", *Appl. Phys. Lett.* 93, 123901 (2008)
6. O. Zouani et al., "Universality of the network-dynamics of the cell nucleus at high frequencies", *Soft Matter*, 10, 8737 (2014)
7. T. Dehoux, et al., "All-optical broadband ultrasonography of single cells", *Scientific Reports* 5, 8650 (2015)

1-3

Dispositif d'imagerie polarimétrique déporté par fibre optique

Colman BUCKLEY, Marc FABERT, **Dominique PAGNOUX**

Institut Xlim

Au cours des 15 dernières années, de nombreuses études ont montré que la polarimétrie optique permettait une analyse structurale de tissus biologiques à l'échelle micronique, pouvant déboucher sur une détection précoce de lésions pré-cancéreuses. Mais jusqu'à présent, la technique la plus prometteuse (polarimétrie de Mueller) n'a pu être mise en œuvre que pour imagier des organes accessibles en visée directe, comme avec le nouveau colposcope polarimétrique de Mueller développé récemment au LPICM à Palaiseau. La caractérisation polarimétrique de tissus internes (bronches, côlon, ...) nécessite un déport de la lumière par fibre optique, ce qui pose un grave problème puisqu'une fibre modifie fortement la polarisation des faisceaux transportés, tant à l'aller qu'à retour, d'une manière totalement incontrôlable et variable au cours du temps. Malgré tout, dans une thèse récente, nous avons pu montrer pour la première fois la faisabilité d'une telle mesure grâce à une méthode différentielle utilisant simultanément deux longueurs d'onde proches (la première mesurant la fibre seule et la seconde mesurant l'ensemble fibre plus tissu visé).

Mais plusieurs problèmes importants restent à résoudre avant d'envisager une application pratique. D'abord, les images que nous avons produites n'ont pu être réalisées qu'en déplaçant les échantillons sous test devant la fibre immobile (assemblage de mesures ponctuelles (= "pixels") ce qui n'est pas réaliste. D'autre part, la construction d'une image demande un temps de mesure considérable (plusieurs heures) du fait que, pour chaque pixel, 16 acquisitions successives, avec des configurations de générateurs/analyseurs d'états de polarisation différentes, sont requises. Enfin, la fibre qui doit être monomode se comporte comme un filtre spatial très sélectif, ce qui empêche une mesure directe du taux de dépolarisation du faisceau réfléchi par le tissu, alors que ce paramètre s'avère très informatif pour les applications au diagnostic.

Pour réaliser des images sur une cible fixe et dans un temps acceptable (on vise une image de 126X126 pixels /seconde), il faut impérativement intercaler un microscanner neutre vis-à-vis de la polarisation entre la sortie de la fibre et le tissu analysé, ou trouver le moyen de soustraire sa contribution polarimétrique s'il en a une. Il faut aussi repenser entièrement la stratégie d'acquisition des données qui doit se faire à la volée pendant le balayage. L'étude en cours porte sur ces deux points. En premier lieu, un programme Labview pilotant et synchronisant un scanner x-y galvanométrique avec tous les éléments actifs du dispositif a été mis au point. Dans un deuxième temps, nous avons mené une étude expérimentale approfondie sur la réponse polarimétrique de scanners disponibles sur le marché, en fonction de la nature de leurs miroirs. Nous avons ainsi pu montrer qu'il était possible de s'affranchir de la réponse polarimétrique (faible) de scanners à miroirs métalliques en Ag. Des images polarimétriques obtenues en quelques secondes avec un tel scanner seront présentées lors du séminaire.

En parallèle nous poursuivons l'étude de faisabilité d'un microscanner à fibre résonnante qui présentera le double avantage de ne nécessiter aucun composant perturbateur de polarisation en aval de la fibre et d'être de très petites dimensions (35mmX2,2 mm). Pour ce scanner, un réseau de Bragg spécifique ($R=100\% @ 633\text{nm}$ et $T=100\% @ 638\text{nm}$) doit être photoinscrit en extrémité de la fibre. Bien que cela soit techniquement faisable, nous avons des difficultés à trouver le partenaire prêt à se lancer dans sa fabrication. Enfin, nous allons engager une étude statistique à partir des données recueillies à l'aide du scanner massif ou du microscanner, qui permettra de remonter aux valeurs de la dépolarisation spatiale du faisceau réfléchi par le tissu analysé afin de disposer, à terme, d'informations polarimétriques aussi complètes que celles fournies par les polarimètres en espace libre.

L'IRM et la séquence MP2RAGE pour la détection et la caractérisation rapide de métastases et de tumeurs

Thibaut FALLER, Aurélien TROTIER, Jean-Michel FRANCONI, Sylvain MIRAUX, Emeline RIBOT

Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques

En IRM, la plupart des tumeurs sont caractérisées par un temps de relaxation longitudinal (T1) des spins différent de celui des tissus sains. L'obtention de cartes paramétriques T1 doit donc permettre d'identifier et de caractériser les tumeurs, suivre leur évolution et également évaluer l'efficacité d'un traitement. Pour cela, il est nécessaire de quantifier le T1 rapidement, en 3D et avec des résolutions spatiales élevées pour ainsi pouvoir réaliser un suivi longitudinal des patients ou de modèles animaux.

Les séquences de mesure de T1 sont cependant soit précises mais coûteuses en temps, soit rapides mais imprécises. La séquence MP2RAGE comportant un module d'inversion et l'acquisition de deux images à 2 temps d'inversion peut donc être un bon compromis. Elle a prouvé son efficacité en IRM clinique pour obtenir, en 10 minutes, une cartographie T1 dans le but de segmenter la matière grise de la matière blanche. En revanche, ces temps d'acquisitions restent trop longs pour du suivi longitudinal de patients fragiles, et cette séquence n'est pas compatible avec l'analyse d'organes sujets aux mouvements respiratoires. Par ailleurs, son intérêt en oncologie clinique pour la détection et la caractérisation de tumeurs ou de métastases n'a pas encore été démontré.

Une séquence MP2RAGE à haut champ magnétique (7T) a été développée et utilisée chez la souris. Les premiers résultats sur des métastases cérébrales montrent un très fort contraste de ces tumeurs par rapport au tissu sain et une sensibilité de détection de métastases de moins de 1mm de diamètre. De plus, les T1 mesurés sont très proches de ceux obtenus avec une séquence standard.

Pour réduire le temps d'acquisition, nous avons modifié l'encodage des échos pour être compatible avec une reconstruction de type Compressed Sensing. Les premiers résultats semblent montrer que cette technique permet de réduire le temps d'acquisition d'un facteur 2 et de conserver une détection de métastases de faible taille.

Dans un but d'appliquer cette séquence pour la détection et caractérisation de métastases disséminées dans le corps entier, l'encodage cartésien de la séquence a été modifié en un encodage radial et pseudo-aléatoire. Les premiers résultats montrent que la séquence est beaucoup moins sensible aux mouvements respiratoires et a permis de détecter des métastases hépatiques sans nécessité de synchroniser l'acquisition avec la respiration de l'animal.

Le but du projet est désormais de transférer ces deux séquences sur un système d'imagerie clinique et de les combiner dans le but de détecter et caractériser rapidement des tumeurs primaires ou des métastases sur le corps entier de patients, notamment sur des zones en mouvement.

1-5

Assemblage de copolymers diblocs à l'aide de gadolinium: vers de nouveaux agents de contraste pour l'IRM

Christophe MINGOTAUD, **Jean-Daniel MARTY**, Stéphane GINESTE

Laboratoire des IMRCP

Visualiser des structures anatomiques et détecter des anomalies tissulaires par imagerie par résonance magnétique (IRM) est nettement amélioré par l'utilisation d'agents de contraste dont l'efficacité et la biocompatibilité restent cependant perfectibles. Les composés utilisés en IRM, souvent à base de gadolinium, sont choisis en fonction de leurs propriétés magnétiques. Ces produits sont très rapidement éliminés par l'organisme, nécessitant l'injection de fortes doses, parfois mal tolérées. En augmentant le temps de résidence dans l'organisme et l'effet sur le contraste, on peut diminuer fortement les doses administrées, avec une tolérance et des performances améliorées. C'est cet objectif d'amélioration que nous poursuivons au sein de l'équipe IDEAS au Laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique en association avec le groupe du Pr C. Billotey du laboratoire Ciblage Thérapeutique en Oncologie (Université de Lyon, Université Jean Monnet) et l'Université de Floride (USA).

En mélangeant un polymère formé de deux blocs, l'un neutre et l'autre chargé négativement, avec des ions gadolinium, nous sommes parvenus à structurer les polymères entre eux, formant ainsi des nano-agents de 20 à 30 nm de diamètre. Ces objets sont biocompatibles, particulièrement stables dans l'organisme, et présentent des performances bien meilleures que celle des agents de contraste commerciaux, en terme de contraste généré et de propriétés pharmacocinétiques avec une longue rémanence sanguine permettant d'observer un effet de contraste tissulaire sur plusieurs dizaines de minutes, sans captation cellulaire. Des expériences in vivo menées sur le rat montrent que ces composés sont bien tolérés et permettent d'obtenir, en utilisant des doses plus faibles (d'où une moindre toxicité), de meilleurs contrastes que les agents classiques. Enfin, la stratégie de synthèse s'adapte très facilement à d'autres ions métalliques radioactifs permettant ainsi de développer dans l'avenir de nouveaux agents pour l'imagerie médicale moléculaire, comme la tomographie par émission de positrons. Ces nano-objets ouvrent également des perspectives en imagerie multimodale et en radiothérapie interne vectorisée.

Référence : 1) Camille Frangville, Yichen Li, Claire Billotey, Daniel R. Talham, Jacqueline Taleb, Patrick Roux, Jean-Daniel Marty & Christophe Mingotaud. Assembly of double-hydrophilic block copolymers triggered by gadolinium ions: new colloidal MRI contrast agents. *Nanoletters* 25 mai 2016, 16, 4069–4073 DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b00664 2) Brevet: FR3043330 - 2017-05-12 (BOPI 2017-19)

2-1

Vaccination antitumorale par pIRE amplifié par transfert d'IL12 par électrotransfert cutané

Justin TEISSIE, Muriel GOLZIO

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale

Nous avons établi la possibilité d'induire une régression tumorale sur un modèle murin cutané (B16 chez B16) en associant une destruction incomplète de la tumeur par application d'impulsions électriques directement sur la peau entourant la tumeur et l'expression cutanée dans la périphérie de la tumeur de l'IL12 suite à son électrotransfert intradermique.

La stratégie repose sur le couplage de la destruction partielle qui va relarguer des antigènes tumoraux dissimulés par l'induction de l'apoptose et la nécrose des cellules tumorales et qui va induire un recrutement de cellules NK, avec une expression sur le long terme de la cytokine qui va amplifier et activer plusieurs classes de cellules dendritiques dans l'environnement tumoral.

la partie biophysiques visait à la destruction partielle sans brûlure (pIRE partial irreversible electropermeabilization) et au transfert d'un plasmide sans motif CpG codant pour l'IL12. Le traitement total est appelé pIRE EIGT (electroimmunogenotherapie).

Après une seule séquence du double traitement, 40% des souris traitées survivent ; les tumeurs distales voient leur croissance ralentie.; un échec de réimplantation des tumeurs est observé sur 50% des cas. L'objectif est d'établir un partenariat avec des cliniciens pour mener un essai clinique chez l'homme.

Nous disposons de la technologie biophysique, des protocoles, de la fabrication des plasmides et avons établi la courte durée de vie du plasmide spécifiquement au site d'injection.

Soutien par des contrats région recherche en transfert clinique, normalisation, et innovation interdisciplinaire en biosanté n° 11052700 et n° 13050740.

Remerciements à Cayla Invivogen, Betatech and CIC partenaires dans le projet de preuve de concept.

Modèles 3D d'organoïdes intestinaux

Audrey FERRAND

Institut de Recherche en Santé Digestive

Une percée majeure au cours de la dernière décennie a été l'établissement des modèles 3D d'organoïdes intestinaux établis à partir de tissus murins ou humains. Ces modèles reposent sur les capacités des cellules souches intestinales à reconstituer la diversité des populations cellulaires de l'épithélium intestinal. Par cela, les cellules souches ont besoin d'une combinaison spécifique de facteurs reconstituant leur niche, et d'être incorporées dans une matrice 3D (Sato et d'autres., 2011). Ces organoïdes 3D représentent un intérêt majeur pour la recherche translationnelle.

Ce système de culture de mini-organe peut être établi à partir des tissus sains ou malades (inflammation et cancer). Il a été montré que ces modèles reflètent les lésions génétiques et les expressions géniques des tissus à partir desquels ils ont été établis. Ainsi, ils représentent un outil de choix pour le criblage de drogues et pour la prédiction de réponse thérapeutique des patients.

Au sein de notre groupe, nous établissons des cultures d'organoïdes colorectaux humains à partir de résection ou biopsies de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), de polypose adénomateuse familiale, de cancer, et de divers modèles murins pour ces maladies ou molécules d'intérêt.

De plus, nous développons une approche de High Content Screening sur ces modèles.

2-3

Recherche de nouveaux bio-marqueurs diagnostiques du cancer de la prostate : étude du profil LC-MS de métabolites oxygénés d'acides gras polyinsaturés urinaires

Claire VIGOR¹, Guillaume REVERSAT¹, Camille OGER¹, Jean-Marie GALANO¹, Grégoire POINAS², Bruno SEGUI², Bruno BONGRAND², Pierre-Jean LAMY², Xavier REBILLARD², Thierry DURAND¹

¹ Institut des Biomolécules Max Mousseron

² Clinique Beausoleil

Ces dernières années, nombres d'études épidémiologiques, expérimentales ou cliniques indiquent un lien étroit entre stress oxydatif (SO) et cancer de la prostate. La plupart des travaux cherchant à rendre compte du SO reposent sur une quantification du malondialdéhyde (MDA), produit terminal de l'oxydation lipidique, à travers un dosage qui manque de spécificité (dérivatisation par l'acide thiobarbiturique). Les isoprostanes (IsoPs) issus de l'oxydation radicalaire des acides gras polyinsaturés et notamment la 15-F_{2t}-IsoP, sont des marqueurs bien plus spécifiques de la peroxydation lipidique in vivo et donc du SO. Leur quantification par LC-MS représente actuellement une méthode sensible, précise, non-invasive d'évaluation de la peroxydation lipidique, et pourrait constituer un outil de diagnostic précoce du cancer de la prostate ou du moins viendrait compléter les outils diagnostiques existants afin d'assurer les prédictions les plus justes. Quelques études conduites ces dernières années, ont cherché à corréliser IsoPs et cancer de la prostate. Si le lien entre 15-F_{2t}-IsoP urinaire et cancer de la prostate semble se dessiner, le choix de dosage de ce métabolite oxygéné des acides gras polyinsaturés ne nous paraît pas des plus pertinents. Ainsi, nous nous proposons de ne plus focaliser sur la quantification d'un seul métabolite, mais sur un ensemble de métabolites oxygénés, dérivant de la peroxydation non-enzymatiques des acides gras polyinsaturés (AGPI), issus des synthèses organiques flexibles développées par le laboratoire SLB.

- Dupuy A et al. Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanoids from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC-MS/MS in various biological samples. *Analytica chimica acta*, 2016. 921: 46-58
- Lee YY et al. Assessment of Isoprostanes in Human Plasma: Technical Considerations and the Use of Mass Spectrometry. *Lipids*, 2016. 51(11):1217-1229
- Schröder FH et al. Prostate-Cancer Mortality at 11 Years of Follow-up. *N Engl J Med*, 2012. 366(11): 981-90

Plateforme MetaToul -MetaboHUB développement des approches de fluxomique pour l'étude du métabolisme des cellules cancéreuses

Florian BELLVERT, Maud HEUILLET, Tony PALAMA, Lindsay PEYRIGA, Justine BERTRAND-MICHEL, Jean-Charles PORTAIS

MetaToul - MetaboHUB

L'étude du métabolisme des cellules cancéreuses est devenu un défi de recherche majeur avec deux objectifs principaux: caractériser les reprogrammations métaboliques associées au cancer et aider au diagnostic et au traitement des patients. Dans le cadre d'un partenariat avec le «Canceropôle Grand Sud-Ouest», la plateforme MetaToul-MetaboHUB (plateforme de métabolomique et fluxomique, Toulouse, France) développe spécifiquement des approches de profilage isotopique et de fluxomique (utilisation du ^{13}C et ^{15}N) afin de caractériser les signatures métaboliques uniques des cellules cancéreuses.

Dans ce contexte, la plate-forme offre une large gamme de services, allant de la conception d'expériences de marquage isotopique, des protocoles d'échantillonnage, du profilage isotopique des métabolites en utilisant la RMN ou la spectrométrie de masse, le traitement et l'interprétation des données isotopiques jusqu'au calcul des flux métaboliques. MetaToul-MetaboHUB fournit également un support et une expertise pour interpréter les données dans un contexte biologique.

MetaToul-MetaboHUB met en place des stratégies analytiques basées sur la spectrométrie de masse et la RMN. La spectrométrie de masse est utilisée pour mesurer à la fois la taille totale des pools de métabolites et leurs profils isotopiques dans les études de marquage isotopique. En raison de sa grande sensibilité, cette technique permet d'analyser le profilage isotopique des métabolites intra cellulaires appartenant au (i) métabolisme central carboné (glycolyse, voie du phosphate pentose, cycle TCA et voies connexes, etc.), (ii) au métabolisme des acides aminés, (iii) au métabolisme énergétique (nucléotides, cofacteurs...) et (iv) depuis peu au métabolisme lipidique. En plus de ces approches ciblées la plateforme développe des approches d'analyses non ciblées permettant des approches sans a priori et une couverture plus grande du métabolisme. La RMN quant à elle permet l'analyse quantitative des métabolites extracellulaires et donne accès au marquage positionnel des métabolites apportant des informations complémentaires à la spectrométrie de masse et permettant par exemple de déterminer rapidement la partition entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate. Ensemble, ces méthodes développées au sein de MetaToul-MetaboHUB permettent une étude très détaillée du fonctionnement de l'ensemble du métabolisme central et de ses connexions au métabolisme des acides aminés et au métabolisme lipidique et peuvent être appliquées de manière routinière pour s'attaquer à la complexité des processus biochimiques impliqués dans la progression du cancer.

Capteur sans contact pour la mesure de vibration et d'écoulement sanguin : Application à la cornée et au cancer de la peau

Adam QUOTB

Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

L'équipe de recherche OSE (Optoélectronique pour les Systèmes Embarqués) du LAAS à Toulouse développe des capteurs basés sur le phénomène de réinjection optique dans une diode laser. Ces capteurs interférométriques permettent, avec un système optique simple et compact d'adresser un très grand nombre de mesure (vitesse, distance, déplacement, etc...). En conciliant l'électronique, le traitement du signal et l'optique, de nombreuses cibles peuvent être étudiées et de nouveaux domaines d'application sont explorés.

L'interaction entre les capteurs à réinjection optique et le vivant fait partie des priorités de l'équipe OSE. Ainsi des projets portant sur la bio-détection, notamment dans le domaine médical et animal sont en cours de développement au sein du laboratoire. Autour de cette thématique, l'ambition de l'équipe OSE est de proposer aux différents partenaires (biologistes et médecins) un nouveau capteur par réinjection optique permettant de faire une mesure de distance, de vitesse ou de vibration sur cible in-vivo.

Le premier exemple d'utilisation du capteur portera sur la mesure de déformation/vibration de la cornée soumit à un jet d'air. Le but final étant de mesurer la pression intraoculaire de l'œil. Des résultats ex-vivo sur œil de cochon et in-vivo sur œil humain seront présentés. La deuxième application portera sur la mesure d'écoulement et insistera notamment sur la capacité du capteur à caractériser précisément des profils d'écoulement, des tailles de micro/nano particules ainsi que des concentrations de particule sanguine. Un exemple de capteur permettant de mesurer la vascularisation d'une tumeur à la surface de la peau sera présenté. Des résultats provenant d'une étude en milieu hospitalier permettra de confirmer l'utilité de ce type de capteur pour le diagnostique du cancer de la peau.

A genetic algorithm to classify cancer samples

William RITCHIE

institut de genetique humaine

Advances in next generation sequencing methods have revealed that transcription is more pervasive, more diverse and more cryptic than expected. Despite the fact that our understanding of transcript and genome architecture is incomplete, bioinformatics analyses of these data are frequently initiated through a common, biased procedure; they are mapped to a reference genome or transcriptome.

We have created a novel unbiased approach to classify cancer samples based on any type of next generation sequencing data. Our approach based on a genetic algorithm and neural networks is capable of determining the smallest set of sequences required to reliably classify samples with close to perfect accuracy. Our approach has been tested on numerous types of sequencing data and experimental designs.

OncoDevice 2

Développement de microenvironnements 3D mimant la crypte intestinale par Bioimpression

Justine CREFF¹, Arnaud BESSON¹, Rémi COURSON², Sandrine ASSIÉ-SOULEILLE², Julie FONCY², Laurent

MALAQUIN²

¹ Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

² Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Il est essentiel, pour comprendre les mécanismes à l'origine de l'évolution du cancer, d'étudier l'influence et la dynamique du microenvironnement tumoral sur les mécanismes métastatiques et d'identifier les voies de communications et les interactions par lesquelles les cellules cancéreuses influencent la construction de la niche tumorale. Un des verrous technologiques majeur reste lié à la réalisation de matrices artificielles qui reproduisent l'hétérogénéité spatiale du microenvironnement et la topologie tridimensionnelle de tissus spécifiques, permettant une croissance contrôlée de cellules jusqu'à la formation de tissus fonctionnels. Les systèmes utilisés actuellement sont loin de présenter toutes les spécificités de l'environnement naturel des cellules qui sont intégrées dans des tissus hautement organisés en 3 dimensions.

Notre objectif est de mettre à profit les derniers développements réalisés au LAAS CNRS dans le domaine de la Bioimpression pour réaliser des modèles de microenvironnements 3D qui reproduisent la topologie, les propriétés mécaniques et l'hétérogénéité cellulaire des tissus *in vivo*. Sur la base du développement de nouveaux matériaux hydrogels photosensibles à base de PEGDA, nous avons démontré la réalisation de supports de culture reproduisant les caractéristiques topologiques et mécaniques de l'intestin. Ces modèles ont été validés pour la culture de lignées de cellules tumorales cancéreuses pour lesquelles nous avons montré la création d'un épithélium cohésif sur la surface de la structure en hydrogel après 7j de mise en culture. Ces résultats confirment également la possibilité de réaliser des étapes de marquage et d'imagerie sans interférence avec la matrice. Notre objectif est de montrer, à partir de cellule souches intestinales de souris isolées par l'équipe d'A. Besson, la formation d'un épithélium fonctionnel, mimétique de l'intestin sur lequel nous pourrions étudier d'une part le rôle inhibiteur de p57 et d'autre part étudier l'influence de paramètres physiques tels que la rigidité, la porosité ou les dimensions des différents compartiments sur la différenciation cellulaire.

Modélisation des relations stroma-épithélium lors des pathologies intestinales

Audrey FERRAND

Institut de Recherche en Santé Digestive

Le débat sur l'origine des cellules souches tumorales (CST) intestinales reste ouvert. Cependant, 2 populations de cellules souches situées dans la crypte intestinale (CSI) seraient susceptibles de devenir des cellules initiateuses de cancer (CIC): Les cellules cylindriques à la base des cryptes (CBC) et des cellules '+4' situées à environ 4 cellules de la base de la crypte. Ces observations ont été faites sur des modèles de souris transgéniques, or les modèles murins ne sont pas relevant de la pathologie humaine, les tumeurs se développant principalement dans l'intestin grêle et non dans le colon comme chez l'homme. Jusqu'à présent, aucune caractérisation de l'évolution supposée d'une cellule souche de la crypte normale vers un phénotype de cellule initiateuse de cancer n'a été décrite dans un modèle humain.

Le phénotype et le devenir des CSI est sous le contrôle de leur niche à laquelle participent les fibroblastes gainant/entourant la crypte colorectale. Lors d'altérations du stroma dues à l'inflammation ou un traitement, les fibroblastes sont activés et sécrètent différents facteurs qu'en condition physiologique modifiant la niche des CSI. Notre hypothèse est que ces fibroblastes 'activés', en modifiant la niche des CSI, favorisent l'acquisition d'un phénotype de cellules initiateuses de cancer par les CSI. En collaboration avec des cliniciens et des physiciens, nous sommes en train de modéliser les contraintes mécaniques et biologiques et caractériser les événements cellulaires et moléculaires pouvant intervenir entre les cellules souches intestinales et les fibroblastes.

Afin d'avancer dans la compréhension de nos modèles, nous souhaitons mettre en place une modélisation numérique et mathématique de nos modèles d'études (culture 3D d'organoides, crypte intestinale en 3D).

Étude de faisabilité d'un caryotype moléculaire par séquençage très haut débit selon la technique "Massive Parallel sequencing" sur ADN tumoral circulant (ADN Tc).

Jean CHIESA

Laboratoire de Cytogénétique et Génétique Médicale/CHRU CAREMEAU/Nîmes

L'Hybridation Génomique Comparative (CGH) permet de visualiser sur l'intégralité du génome la présence de variations de nombre de copies d'ADN (CNV) et de constituer ainsi un véritable caryotype moléculaire à partir d'une simple extraction d'ADN tumoral. Des publications ont montré sur des tumeurs solides et ou des métastases la présence de CNV pathogènes acquis nombreux et complexes. Ces CNV sont les reflets du caractère polyclonal et des dérégulations génétiques multiples des tumeurs solides. Ces anomalies génomiques chaotiques restent cohérentes pour une tumeur donnée et donnent un profil génomique récurrent pour une même histologie qui peut servir d'élément diagnostique, pronostique voire théranostique. L'ADN libre plasmatique dans le sang circulant est libéré par des cellules en apoptose, en nécrose ou par les cellules circulantes dans le sang. Différents types d'ADN circulant peuvent coexister : l'ADN endogène toujours présent provenant des cellules du sujet, l'ADN fœtal issu de cellule placentaire chez une femme enceinte et l'ADN tumoral circulant (ADNTc) chez un patient atteint d'un cancer. Chez un individu atteint de cancer, l'ADN Tc est toujours présent mais sa quantité reste très limitée entre 1ng-40 ng et jusqu'à 1000 ng /ml de plasma en fonction du type et du stade du cancer. De nombreuses publications ont montré qu'il était ainsi possible de faire le diagnostic voire de suivre l'évolution d'un cancer par l'étude de mutations génomiques sur cet ADN Tc à partir d'une prise de sang appelée << biopsie liquide >>.

L'arrivée de séquenceurs de dernière génération permet un séquençage de la totalité du génome et aussi de reproduire jusqu'à plusieurs millions de fois la séquence d'une même molécule d'ADN. Il est possible sur de l'ADNTc par séquençage massif en parallèle (MPS) de mettre en évidence des CNV acquis reconstituant un véritable caryotype moléculaire avec un niveau de résolution quasi équivalent à celui de la CGH conventionnelle et de révéler chez des personnes en apparente bonne santé la présence d'un cancer et d'en déterminer l'origine en fonction du profil génomique observé.

Nous voulons réaliser de manière reproductible sur des ADNTc de biopsie liquide un caryotype moléculaire par séquençage très haut débit avec la technique MPS sur une série de cancers analysés au diagnostic où la tumeur primitive devra être opérable et ou biopsiable d'emblée quelque soit le stade y compris métastatique. Sur les tumeurs retirées et ou biopsiées nous réaliserons dans le même temps une analyse par CGH et nous comparerons les profils à ceux obtenus par MPS sur l'ADNTc pour chaque patient. Nous porterons notre étude sur des cancers connus pour libérer le plus d'ADNTc : colon, sein, cancer lieberkhünien et carcinome canalaire infiltrant pour homogénéiser les résultats.

Notre objectif est de démontrer :

- i) Qu'il est possible de réaliser un profilage des CNV acquis pathogènes par MPS sur l' ADNTc au diagnostic d'un cancer.
- ii) Que les profils génomiques des CNV observés sur les tumeurs primitives sont aussi présents sur l'ADNTc et qu'ils sont comparables.

Pour ce faire, nous sommes à la recherche d'un plateau technique disposant d'un séquenceur très haut débit maîtrisant la technique MPS et d'une équipe bio informatique pour élaborer un algorithme synthétisant les CNV trouvés sous forme d'un profil génomique global comparable à ceux obtenu par CGH.

Si nous démontrons la présence de CNV sur l'ADNTc et que ceux-ci sont comparables à ceux observés sur la tumeur primitive, le caryotype moléculaire sur ADNTc pourra être un test de dépistage et de diagnostic ultra précoce du cancer.