

Sphéroïdes multi-cellulaires

I. Modèles de tumeurs cancéreuses : sphéroïdes, organoïdes, neurosphères, capotels...

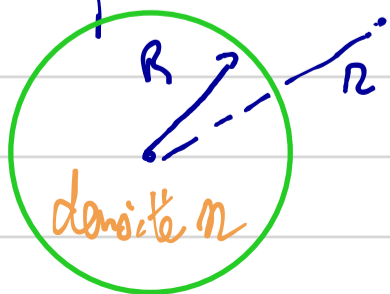
1 - Sphéroïdes

Les sphéroïdes sont des agrégats de cellules (souvent cancéreuses) qui sont considérés comme de bons modèles de tumeurs pour étudier la croissance, la résistance aux drogues, le métabolisme et la mort cellulaire ou les interactions entre cellules cancéreuses et les cellules du système immunitaire. **Montel et al 2011**, **Hirschhausen et al J. Biotechnology 2010**. Slides **Achermann et al 2011**

Sur les images floues propriétés apparaissent. Les sphéroïdes sont sphériques. Ils réagissent comme des fluides quand on les comprime ou qu'ils fuient entre eux **M. Steinberg**! Cela pousse à les considérer comme des gouttelettes de cellules avec une tension de surface σ et une viscosité η . Aujourd'hui nous allons plutôt discuter la viscosité très élevée $\eta \sim 10^6$ Pa.s et dans le coup discuter la tension de surface. La taille des sphéroïdes varie de 100 à 800 μm et ils croissent pendant ~ 15 jours (temp de division cellulaire 1 jour) pour atteindre une taille stationnaire. La croissance est due à la division cellulaire. La division cellulaire n'est pas uniforme **Montel et Hirschhausen** les cellules se trouvent dans une fine couche à l'extérieur ($\sim 70 \mu\text{m}$) et meurent dans le cœur de sphéroïde. Si la taille est stationnaire cela implique qu'il y a un écoulement de cellules de la surface vers l'intérieur qui transporte les cellules vers le cœur où elles meurent souvent par apoptose (mort programmée)

Rq: Formation d'un cœur nécrotique qui croît.

Il y a deux raisons à la division plus facile en surface: les nutriments nécessaires à la division sont absorbés par les cellules de surface et un effet mécanique



$$\text{Pour les nutriments } \frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - \alpha n c$$

diffusion \rightarrow absorption

Rq Les nutriments sont des sucres ou de l'oxygène

Il y a une longueur caractéristique de l'absorption $\lambda = \sqrt{\frac{D}{\alpha m}}$ et si $\lambda \ll R$ ce qui est souvent le cas la concentration en nutriments décroît à partir de la surface sur une distance λ . Pour l'oxygène $\lambda \sim 100 \mu m$. L'effet mécanique opère sur la croissance avant la diffusion. La cellule qui croît doit trouver ses voisins et il y a moins de voisins sur la surface.

2. Autres agrégats cellulaires

- Organoïdes : agrégats reconstitués à partir de cellules souches **H. Clevers**
- Neurosphères formées par aggrégation de progéniteurs de neurones **Spassky**
- Capsules polymériques (alginate) **J. Botte Soft Matter 2010, Aleman du, Nassay et al PNAS 2013**

3. Division cellulaire et Pression homéostatique

Nous avons déjà vu au premier cours de l'ordonnée que l'équation de conservation des cellules s'écrit $\frac{\partial n}{\partial t} + \nabla \cdot n \vec{v} = n(\lambda_d - \lambda_a) + \xi(t)$

λ_d est le taux de division cellulaire et λ_a le taux de mort cellulaire (apoptose) ces taux dépendent de l'environnement de la cellule (nutriments, oxygène et propriétés mécanique). En général λ_d décroît avec la pression des cellules et λ_a croît. Le taux de croissance (ou de prolifération) $\lambda_d - \lambda_a$ décroît avec la pression. Il s'annule à la pression homéostatique P_h . Le tissu croît si $P > P_h$ et décroît si $P < P_h$. (voir expériences ci-dessous) **L. Bieganski JF**

Cours des Mouches 2018 Figure **M. Bagan HFSJ Journal 2009**

P_g Différence entre la pression cellulaire et la pression hydrostatique
 $P \sim 1000 \text{ Pa}$, $P_h \sim 10^5 \text{ Pa}$

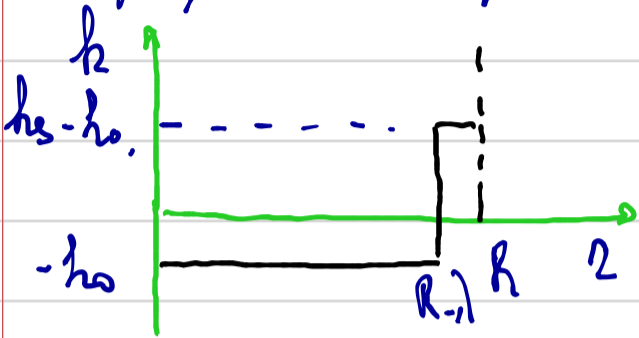
II Dynamique de croissance des sphéroïdes

1. Modèle à 1 composant

On considère un sphéroïde comme un système à 1 composant avec des cellules effectives (qui incluent le fluide extra-cellulaire), de concentration n . (On néglige le bruit.

$\frac{\partial m}{\partial t} + \nabla \cdot (m\vec{v}) = k m$. Nous allons aussi considérer que le trou est incompressible $m = \rho h$ $\nabla \cdot \vec{v} = k = \lambda \frac{dh}{dt}$. Même pour un trou incompressible, la divergence de la vitesse n'est pas nulle. Le système est cylindrique et les propriétés ne dépendent que de r .

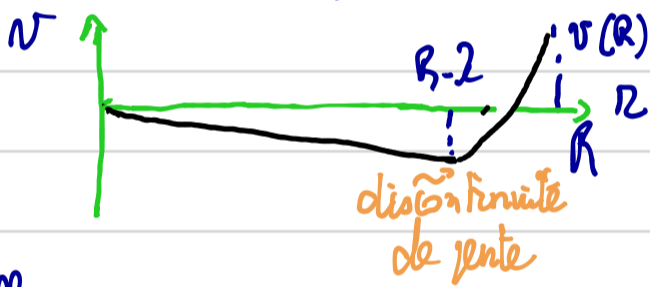
Les cellules se divisent dans la couche externe d'épaisseur λ et meurent au centre où la concentration en nutriments est très faible.



Les cellules se divisent dans la couche externe d'épaisseur λ et meurent au centre où la concentration en nutriments est très faible.

$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} r^2 v = k(r)$ Si k est constant $v = \frac{k r^2}{3} + \frac{A}{r^2}$. Dans la

région centrale $v(r) = -k_0 r/3$ et dans la région extérieure $v = (k_s - k_0) \frac{r}{3} - \frac{k_s (R - \lambda)^3}{3 r^2}$. La vitesse doit être finie au centre et le flux $m v^3$ est continu en $r = (R - \lambda)$. Profil de vitesse



Pendant la croissance $v(R)$ est positif et décroît avec le temps et devient nul dans l'état stationnaire.

avec

A la surface $v(R) = \frac{dR}{dt} = (k_s - k_0) \frac{R}{3} - \frac{k_s (R - \lambda)^3}{3 R^2}$

Le nombre de cellules est $n \frac{4 \pi R^3}{3} = N$, en multipliant par $4 \pi R^2 m$
 $\frac{dN}{dt} = -k_0 N + k_s N_s$ $N_s = m [V - V_2]$ où V_2 est le volume de

la couronne dans laquelle les cellules se divisent $V_2 = \frac{4 \pi R^3}{3} - \frac{4 \pi (R - \lambda)^3}{3}$
 Si $R < \lambda$ $\frac{dR}{dt} = (k_s - k_0) \frac{R}{3}$ croissance exponentielle (seulement région externe)

si $R \gg \lambda$ $\frac{dR}{dt} = k_s \lambda - \frac{k_0 R}{3}$ $R = R_0 \left[1 - e^{-k_0 t / 3} \right]$

La croissance est linéaire au début $t < 1/t_0$ puis sature à $R_0 = \frac{3 \lambda k_0}{k_0}$

Résultats expérimentaux F. Montel M. Delour

On en déduit la variation de h_0 avec la pression et la pression osmotique qui est négative. Mesure du champ de vitesse M. Delanné *Phys Rev Lett* 2012

- Écoulement et pression à l'intérieur du sphéroïde : on considère le tissu comme un fluide newtonien avec la viscosité cisaillement η et la rigidité S de l'ordre de $10^5 - 10^7$ Pa. La divergence de \vec{v} n'est pas nulle
$$\eta \nabla^2 \vec{v} + S \vec{\nabla} \cdot (\vec{\nabla} \vec{v}) - \vec{\nabla} P = 0$$
 Équation de Stokes. Comme $\vec{\nabla} \times \vec{v} = \vec{0}$
on obtient $\nabla [(\eta + S) \nabla \vec{v} - P] = 0$ soit $P = P_0 + (\eta + S) h$.

La pression est constante dans chacune des régions ou h est constant. Elle est plus grande sur la surface et plus petite à l'intérieur, ce qui explique les vitesses radiales négatives.

2. Simulations numériques

Je vais montrer 2 types de simulations numériques

- J. Elgeti (Séminaire l'an dernier). Chaque cellule est représentée par 2 points qui se rejoignent pour simuler la croissance. La cellule se divise quand la taille atteint une valeur critique. (Dissipative Particle Dynamics). Pression extérieure appliquée, Potentiel d'interaction ⁽²⁾ Slides

- D. Decrodo Potentiel d'interaction entre les centres des cellules plus réaliste. Modélisation du cycle cellulaire. Prend en compte les déformations des cellules. Étudie à la fois la croissance des sphéroïdes sous pression et les sphéroïdes dans des capsules d'alginate.

3. Modèles à 2 fluides J. Ranft et al *EPL* (2012)

Pour être plus réaliste, il faut faire un modèle à 2 composants, les cellules et le fluide extracellulaire (eau + protéines + ...) Mon modèle même plus raffiné prend en compte la matrice extracellulaire. Les cellules occupent une fraction ϕ du volume et ont une vitesse \vec{v}_c et le fluide extracellulaire une fraction volumique $1 - \phi$ et une vitesse \vec{v}_f . Le centre de masse a une vitesse $\vec{v} = \phi \vec{v}_c + (1 - \phi) \vec{v}_f$. Le fluide total

est incompressible $\nabla \cdot \vec{v} = 0$ soit $\vec{v}_f = -\frac{\phi \vec{v}_c}{1-\phi}$. En écrivants cela on suppose que les débris dus à la mort cellulaire $1-\phi$ sont inclus dans le fluide extracellulaire. $1-\phi$ est petit si on appelle d la distance entre cellules et

$\left. \begin{array}{l} \uparrow R \\ \uparrow d \end{array} \right\}$ $1-\phi \sim \frac{d}{R}$. Par rapport au modèle à un fluide, le modèle à deux fluides prend en compte la perméation du fluide extracellulaire entre les cellules. Nous suivons l'approche des modèles à 2 fluides pour le système polynémique **M. Doi**.

$$\begin{aligned} -\xi(\vec{v}_c - \vec{v}_f) + (\eta + \zeta) \nabla^2 \vec{v}_c - \nabla P_c &= \vec{0} \\ -\xi(\vec{v}_f - \vec{v}_c) - \nabla P_f &= \vec{0} \end{aligned}$$

cellules

fluides $\eta_s \vec{v}_c \sim \frac{\eta_s}{\eta} \sim 10^{-8}$

Il y a 2 pressions: la pression cellulaire P_c dirigée vers haut et la pression du fluide qui est la pression hydrostatique. Si on suppose les cellules incompressibles, l'équation de conservation des cellules s'écrit $\nabla \cdot \vec{v}_c = h(P_c)$. On réécrit l'équation dynamique des cellules en éliminant $\vec{v}_f = \xi \frac{\vec{v}_c}{1-\phi} + (\eta + \zeta) \nabla^2 \vec{v}_c - \nabla P_c = \vec{0}$

Il y a une longueur caractéristique $\lambda^2 = \frac{(\eta + \zeta)(1-\phi)}{\xi}$. Le coefficient de perméation $\xi \sim \frac{\eta_s}{d^2}$ donc $\lambda^2 \sim d^2 \frac{(1-\phi)(\eta + \zeta)}{\xi}$. Si $d = 0,1 R$ $\lambda^2 \sim R^2 < 10^4$ et $\lambda \sim 100 R$ ce η_s qui est de l'ordre de gradient de la taille des sphéroïdes. A une échelle de taille plus grande que λ la dissipation est dominée par la perméation et aux échelles de taille plus petite que λ la dissipation est dominée par la viscosité: on peut négliger la perméation et on retrouve le modèle à 1 fluide.

Rq: A long terme après une perturbation les cellules se comportent comme un solide et il faut utiliser la théorie de la poroélasticité due à **M. Doi** voir **M. Delgado, P. Redo, G. Cappello 2020**. On peut aussi prendre en compte la matrice extracellulaire.

III. Application des sphéroïdes

1. Effet de la prolifération cellulaire sur l'action des drogues

M. Delaune et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la drogue gemcitabine sur la prolifération de cellules cancéreuses du pancréas en présence de sphaéroïdes **Ruggiti et al PRL 2020**. Il a été montré que l'effet de la drogue est inhibé quand la tumeur est sous pression. Une explication possible est que la pression bloque l'accès de la drogue à la tumeur mais cet effet n'explique pas les données.

L'expérience étudie la croissance dans un gel d'agarose d'un sphaéroïde de cellules cancéreuses du pancréas. La croissance est des contraintes dans le gel qui réduisent le taux de division.

La drogue n'agit que sur les cellules qui prolifèrent après que ces cellules sont entrées en phase S. En reprenant les équations de croissance du sphaéroïde $\frac{dN}{dt} = -k_0 N + k_s N_s + \left. \frac{dN}{dt} \right|_{\text{drogue}}$. On écrit

$$\left. \frac{dN_s}{dt} \right|_{\text{drogue}} = -d N_s k_s$$

apoptose en volume }
croissance en surface }
effet de la drogue $\propto N_s$

Dans les étapes initiales de la croissance, l'apoptose est négligeable $k_0 \approx 0$. Si on introduit la drogue à $t = t_0$, d augmente avec le temps et les auteurs écrivent $d = d_0 [1 - e^{-\lambda(t-t_0)}]$. Le paramètre λ est le temps de retard d'action de la drogue qui correspond au passage des cellules en phase S. Dans une première expérience les auteurs étudiaient un sphaéroïde sans pression mais avec drogue. Ils mesurent le taux de croissance effectif $k_s (P=0) (1-d)$, puis un sphaéroïde sous pression mais sans drogue ils mesurent $k_s (P)$ (voir les expériences plus haut). En ajoutant la drogue ils mesurent un taux de croissance $k_s (P) (1-d)$ d ne dépendant pas de la pression. Ce qui est cohérent avec un accès à la drogue non modifié. Le paramètre d_0 est supérieur à 1 et au bout de quelques jours le sphaéroïde devient plus petit que son rayon initial. On mesure alors la densité d'un sphaéroïde libre (qui ne forme pas le gel). Les auteurs ont observé le même effet avec une autre drogue

2. Sphéroïdes en co-culture cellulaire M. Benamar, J. Ackermann

des sphéroïdes ont aussi été utilisés pour étudier les interactions entre cellules cancéreuses et cellules du système immunitaire qui sont à la base de l'immunothérapie pour traiter le cancer. Avec P. Benaroch et J. Nikolov, nous étudions les interactions entre cellules cancéreuses K₁₂ (cellules cancéreuses de poumon) et macrophages. Les macrophages dans les tumeurs augmentent la division cellulaire et sont un mauvais pronostic.

L'étude de la croissance de sphéroïdes de cellules K₁₂ en co-culture avec des macrophages montre que les sphéroïdes sont plus petits et plus nombreux (figure). Ils favorisent la nucléation. Les sphéroïdes plus petits favorisent l'accès aux nutriments et donc la division cellulaire (ce qui n'exclut pas un mécanisme plus bricardé direct)

Pour essayer de comprendre J. Ackermann étudie la croissance de sphéroïde contenant des macrophages en combinant la cinétique de croissance avec une théorie de type Cahn-Hilliard afin de prédire la distribution de macrophages. Figure de simulation. La figure montre la croissance d'un sphéroïde où les cellules initiales sont toutes identiques mais se divisent de manière asymétrique

(1) Répulsion à courte distance et adhésion à plus grande distance de portée finie → Slide perso de disjonction
Dérivée J.K.R pour le potentiel

