

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE – LILLE II

THESE de DOCTORAT d'UNIVERSITE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE – LILLE II

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée par

Caroline GRONNIER

**Place du modèle de reflux duodéno-œsophagien induit chirurgicalement
chez le rat dans la compréhension de la carcinogenèse œsophagienne.
Vers l'identification d'outils diagnostiques précoces et thérapeutiques.**

Thèse dirigée par le Pr Christophe MARIETTE et le Pr Emmanuelle LETEURTRE

Soutenue le 9 décembre 2013

Jury composé de :

Présidente : Docteur **Isabelle VAN SEUNINGEN**

Rapporteurs : Docteur **Jean-Noël FREUND**
Professeur **Simon MSIKA**

Examineurs : Professeur **Jean-Yves MABRUT**
Professeur **Emmanuelle LETEURTRE**
Professeur **Christophe MARIETTE**

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de
l'équipe 5 de l'unité INSERM n° U 837 –Université Lille 2 - CHRU
« Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliales»,
Directrice d'équipe : Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen

sous la co-direction scientifique de
Madame le Professeur Emmanuelle Leteurtre
et de
Monsieur le Professeur Christophe Mariette

Je remercie pour l'honneur qu'ils me font :

Madame le **Docteur Isabelle Van Seuningen**

en acceptant de présider ce jury

Monsieur le **Docteur Jean-Noël Freund,**

Monsieur le **Professeur Simon Msika,**

En acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse

Monsieur le **Professeur Jean-Yves Mabrut**

Madame le **Professeur Emmanuelle Leteurre**

Monsieur le **Professeur Christophe Mariette**

En acceptant de juger ce travail.

L'année de Master de recherche chirurgicale suivie de ces trois années de thèse passées au sein du laboratoire m'ont permis de découvrir le monde de la recherche fondamentale, d'acquérir de nombreuses connaissances et d'acquérir les bases de la recherche translationnelle.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe 5 de l'UMR837 pour leur accueil, leur encadrement et leur soutien tout au long de ces années.

Je remercie particulièrement :

Monsieur le **Professeur Pierre Formstecher**, directeur de l'INSERM U837, pour m'avoir permis de réaliser mon Master de recherche puis mon doctorat au sein de son unité,

Madame le **Docteur Isabelle Van Seuning**, de m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour son encadrement et ses conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail,

Monsieur le **Professeur Christophe Mariette**, de m'avoir donné sa confiance pour ce travail de thèse, de son aide précieuse et de ses conseils tout au long de ces années, et surtout pour m'avoir donné le goût de la recherche médicale dans tous ses aspects et les meilleurs outils de formation,

Madame le **Professeur Emmanuelle Leteurtre**, d'avoir co-encadré ce travail, pour sa disponibilité et nos discussions enrichissantes,

Monsieur le **Professeur Guillaume Piessen** pour son aide indispensable à la réalisation de ce travail, son soutien et son amitié,

Monsieur le **Professeur Triboulet** pour ses précieux conseils,

Messieurs les **Docteurs Nicolas Briez, Jérôme Bot, Emilie Bruyère, Edouard Vinatier**, pour les heures passées ensemble au laboratoire, leur aide dans la réalisation de ce projet,

Madame le **Docteur Emilie Bruyère** ma coéquipière, je n'aurais pu rêver meilleure partenaire pour faire ce voyage,

Monsieur le **Docteur Gilbert Briand** pour son aide précieuse dans la réalisation d'analyse biochimique,

Monsieur le **Docteur Nicolas Jonckheere** et Madame le **Docteur Audrey Vincent** pour le partage de leur expérience pour soutien et leurs conseils au cours de ces années,

Mesdames **Marie-Hélène Gevaert** et **Rose-Marie Siminsky** pour le temps passé à préparer les lames pour la réalisation de ce travail et pour votre disponibilité,

Mesdames **Wassila Igoudjil, Brigitte Hémon, Bérangère Barbot, Marie-Paule Ducourouble, Belinda Duchêne** pour leur aide technique précieuse, leur disponibilité, leur bonne-humeur et leur gentillesse

Messieurs les Docteurs **Jean-Robert Nzamushe, Mathieu Messenger** et **William Robb** pour m'avoir donné leur soutien et leur amitié

Mes **co-internes, co-chefs** et **mes internes** de m'avoir permis de me libérer du temps pour la recherche,

Mes compagnons de **Master** et de **Thèse** pour les bons moments passés ensemble,

Merci à mes amis, ma famille, bien sûr et surtout à **Thierry** de m'avoir soutenue au cours de cette thèse.

Je remercie :

L'Association de Recherche contre le Cancer,

La Fondation de l'Avenir,

La Fondation pour la Recherche Médicale,

Pour leur soutien financier qui a permis la réalisation de ce travail.

Les travaux effectués lors de cette thèse ont fait l'objet des publications et des communications suivantes :

Publication dans des revues avec comité de lecture

Article I: Operatively-induced chronic reflux in rats: a suitable model for studying esophageal carcinogenesis?

Caroline Gronnier *, Emilie Bruyère*, Guillaume Piessen, Nicolas Briez , Jérôme Bot, David Buob, Emmanuelle Leteurtre , Isabelle Van Seuningen **, Christophe Mariette ** (*in press Surgery 2013*)

*both authors equally contributed to this work

** both authors equally contributed to this work

Article II: Prevention of Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma by smoothed inhibitor in a rat model of gastroesophageal reflux disease

Caroline Gronnier, Christophe Mariette, Emmanuelle Leteurtre, Isabelle Van Seuningen, Guillaume Piessen

Comment on:

Prevention of Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma by smoothed inhibitor in a rat model of gastroesophageal reflux disease. Gibson MK, Zaidi AH, Davison JM, Sanz AF, Hough B, Komatsu Y, Kosovec JE, Bhatt A, Malhotra U, Foxwell T, Rotoloni CL, Hoppo T, Jobe BA. Ann Surg. 2013 Jul;258(1):82-8. doi: 10.1097/SLA.0b013e318270500d.

(*Annals of Surgery 2013 , in press version électronique*)

Article en préparation

Article III: The MUC1 membrane-bound mucin regulates esophageal adenocarcinoma cells biological properties

Caroline Gronnier *, Emilie Bruyère *, Nicolas Jonckheere, Wassila Igoudjil, Mickael Perrais, Bérangère Barbot, Guillaume Piessen, Christophe Mariette, Isabelle van Seuningen

*both authors equally contributed to this work

En rédaction

Communications orales

2012

PhD Day of the Research Center Jean-Pierre Aubert, Lille, France

Caroline Gronnier, Guillaume Piessen, Emilie Bruyère, Nicolas Briez, David Buob, Jérôme Bot, Emmanuelle Leteurtre, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette

Surgically-induced chronic reflux in rats: an accurate model for studying esophageal carcinogenesis?

2011

11th International Workshop on Mucins, Cambridge, England.

Emilie Bruyère, Nicolas Briez, **Caroline Gronnier**, Jérôme Bot, David Buob, Emmanuelle Leteurtre, Guillaume Piessen, Christophe Mariette, Isabelle Van Seuningen

Roles of MUC1 and MUC4 mucins in esophageal carcinogenesis induced by duodeno-gastro-oesophageal reflux.

4ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France. Emilie Bruyère, Nicolas Briez, **Caroline Gronnier**, Jérôme Bot, David Buob, Emmanuelle Leteurtre, Guillaume Piessen, Christophe Mariette, Isabelle Van Seuningen

Impact du reflux sur le développement de l'adénocarcinome oesophagien. Identification de marqueurs associés à la progression tumorale.

1er Forum de recherche de l'académie de chirurgie, congrès de l'association française de chirurgie octobre 2011

Caroline Gronnier, Nicolas Briez, Emilie Bruyère, Guillaume Piessen, David Buob, Jérôme Bot, Emmanuelle Leteurre, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette.

Impact des composantes acide et biliaire du reflux gastro-œsophagien dans la carcinogenèse oesophagienne: identification de marqueurs moléculaires de progression du cancer.

2010

10ème Journée André Verbert - Colloque Annuel des doctorants de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille, France.

Emilie Bruyère, Nicolas Briez, **Caroline Gronnier**, Jérôme Bot, Frédéric Frenois, David Buob, Emmanuelle Leteurre, Christophe Mariette, Isabelle Van Seuningen.

Impact du reflux sur le développement de l'adénocarcinome œsophagien dans un modèle de reflux duodéno-œsophagien chez le rat.

3ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France.

Emilie Bruyère, Nicolas Briez, **Caroline Gronnier**, Guillaume Piessen, Jérôme Bot, David Buob, Emmanuelle Leteurre, Christophe Mariette, Isabelle Van Seuningen.

Impact du reflux sur le développement de l'adénocarcinome oesophagien dans un modèle animal de reflux duodéno-oesophagien chez le rat. Identification de marqueurs associés à la progression tumorale.

PhD Days of the Research Center Jean-Pierre Aubert, Lille, France.

Emilie Bruyère, Nicolas Briez, **Caroline Gronnier**, Guillaume Piessen, Jérôme Bot, David Buob, Emmanuelle Leteurtre, Christophe Mariette, Isabelle Van Seuningen.

Roles of mucins in an animal model of oesophageal carcinogenesis induced by gastro oesophageal reflux in rat: identification of new potential biomarkers.

Communications affichées

2012

13th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus October 15 - 17 2012, Venice, Italy.

Caroline Gronnier, Guillaume Piessen, Emilie Bruyère, Nicolas Briez, Jérôme Bot, David Buob, Emmanuelle Leteurre, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette. Surgically-induced chronic reflux in rats: an accurate model for studying esophageal carcinogenesis?

PhD Days of the research Center Jean-Pierre Aubert, Lille, France 2012

Caroline Gronnier, Guillaume Piessen, Emilie Bruyère, Nicolas Briez, David Buob, Jérôme Bot, Emmanuelle Leteurre, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette.

Role of acid and biliary component in an animal model of oesophageal carcinogenesis induced by gastro-oesophageal reflux in rat?

12^{eme} Journée André Verbert – Colloque annuel des doctorants de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille, France.

Caroline Gronnier, Guillaume Piessen, Emilie Bruyère, Nicolas Briez, David Buob, Jérôme Bot, Emmanuelle Leteurre, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette.

Role of acid and biliary component in an animal model of oesophageal carcinogenesis induced by gastro-oesophageal reflux in rat?

2011

3ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France.

Caroline Gronnier, Emilie Bruyère, Nicolas Briez, Jérôme Bot, David Buob, Emmanuelle Leteurtre, Guillaume Piessen, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette.

Impact du reflux sur le développement de l'adénocarcinome œsophagien dans un modèle animal de reflux duodéno-œsophagien chez le rat. Mise en évidence des étapes précoces d'évolution vers la carcinogenèse œsophagienne.

PHD Days of the Research Center Jean-Pierre Aubert, Lille, France.

Caroline Gronnier, Guillaume Piessen, Emilie Bruyère, Nicolas Briez, David Buob, Jérôme Bot, Emmanuelle Leteurtre, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette.

Impact of components of acid and bile reflux on esophageal carcinogenesis.

Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive. 24 au 27 mars 2011

Caroline Gronnier, Guillaume Piessen, Emilie Bruyère, Nicolas Briez, David Buob, Jérôme Bot, Emmanuelle Leteurtre, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette.

Impact des composantes acide et biliaire du reflux gastro-œsophagien dans la carcinogenèse œsophagienne : identification de marqueurs moléculaire de progression du cancer.

2010

Journée de l'Association pour la Recherche sur le Cancer des jeunes chercheurs, Paris, France.

Caroline Gronnier, Emilie Bruyère, Nicolas Briez, Jérôme Bot, David Buob, Emmanuelle Leteurtre, Guillaume Piessen, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette.

Impact des composantes acides et biliaires du reflux gastro-oesophagien dans un modèle de carcinogenèse chez le rat : Identification de marqueurs moléculaires de prolifération et de progression tumorale.

3ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France.

Caroline Gronnier, Emilie Bruyère, Nicolas Briez, Emilie Bruyère, Jérôme Bot, David Buob, Emmanuelle Leteurtre, Guillaume Piessen, Isabelle Van Seuning, Christophe Mariette.

Impact du reflux sur le développement de l'adénocarcinome oesophagien dans un modèle animal de reflux duodéno-oesophagien chez le rat. Mise en évidence des étapes précoces d'évolution vers la carcinogenèse œsophagienne.

Table des matières

Abréviations	22
Résumé.....	24
1 INTRODUCTION.....	28
1.1 Adénocarcinome de l'œsophage.....	28
1.1.1 Epidémiologie.....	28
1.1.2 Facteurs de risques de l'adénocarcinome de l'œsophage	30
1.1.3 Principaux facteurs protecteurs	35
1.2 Physiopathologie de l'œsophage de Barrett	36
1.2.1 Définition de l'œsophage de Barrett	36
1.2.2 Genèse de l'œsophage de Barrett :.....	38
1.2.3 Progression histologique de la séquence carcinologique	39
1.3 Carcinogénèse œsophagienne et problématique.....	39
1.3.1 Carcinogénèse œsophagienne.....	39
1.3.2 Problématique de prise en charge.....	40
1.4 Altérations moléculaires.....	42
1.4.1 Prolifération cellulaire et apoptose	42
1.4.2 Gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.....	43
1.4.3 Ploïdie et anomalies chromosomiques	43
1.4.4 Gènes supresseurs de tumeur	44
1.4.5 Les proto-oncogènes	44
1.4.6 Adhésion cellule-cellule	45
1.4.7 Les mucines	45
1.4.8 Néoangiogenèse	45
1.4.9 Altérations moléculaires en pratique clinique	46
1.5 Modélisation de la séquence carcinogénétique	47
1.5.1 In vitro	47

1.5.2	Ex vivo.....	47
1.5.3	Modélisation animale	48
1.6	Mécanismes de cytotoxicité du reflux gastro-oesophagien.....	53
1.6.1	Reflux gastrique :	55
1.6.2	Reflux duodéal :	55
1.6.3	Rôle de l'inflammation de la muqueuse œsophagienne et des radicaux libres	56
1.7	Acides biliaires	57
1.7.1	Synthèse	57
1.7.2	Effets biologiques et rôle du pH.....	57
1.8	Les Mucines	58
1.8.1	Généralités	58
1.8.2	Mucines sécrétées et mucines membranaires.....	60
1.8.3	Régulation de l'expression des mucines dans l'œsophage	64
1.9	Buts du travail.....	67
2	RESULTATS.....	68
2.1	Partie I : Apports et limites du modèle chirurgical pour induire et étudier la carcinogenèse œsophagienne induit par le reflux	68
2.1.1	Chapitre I : Le reflux induit chirurgicalement chez le rat est-il un modèle valable pour l'étude de la carcinogenèse œsophagienne ?	69
2.1.2	Chapitre II : Limites de l'article : Prévention de l'œsophage de Barrett et de l'adénocarcinome de l'œsophage par un inhibiteur de la voie Hedgehog dans un modèle de reflux gastro-oesophagien chez le rat.....	105
2.1.3	Chapitre III : Mise au point d'un modèle de reflux induit chez la souris	112
2.2	Partie II : Implication de la mucine MUC1 dans la régulation des propriétés biologiques de l'adénocarcinome de l'œsophage dans un modèle in vitro et in vivo	116
3	DISCUSSION GENERALE	138
3.1	Partie I : Apports et limites du modèle chirurgical pour induire et étudier la carcinogenèse œsophagienne induit par le reflux	138
	139

3.2	Partie II : Implication de la mucine MUC1 dans la régulation des propriétés biologiques de l'adénocarcinome de l'œsophage dans un modèle in vitro et in vivo	143
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	146
4.1	Conclusion	146
4.2	Perspectives de recherche.....	148
5	APPENDICE TECHNIQUE	150
6	REFERENCES	210
7	NOTES.....	224

Abréviations

AO Adénocarcinome de l'œsophage
ADN Acide désoxyribonucléique
AJCC: American Joint committee on Cancer
AP-SA Alkaline Phosphatase-conjugated Streptavidin
ARN Acide ribonucléique
BCA Bicinchonic acid
BCL-2 B-cell Lymphoma 2
BET Bromure d'éthidium
BSA Bovine Serum Albumin
C Cholique
CDX Caudal-related homeobox
CDK: cyclin dependant kinase
Chk2 Checkpoint homolog
CK Cytokératine
COX-2 Cyclo-oxygénase 2
DAB 3,3'-Diaminobenzidine
DER : Duodeno-esophageal reflux
DGER :Duodeno-gastro-esophageal reflux
DGR : Duodeno-gastric reflux
DC Désoxycholique
dNTP Désoxy-Nucléotide Tri-Phosphate
D-PBS Dubelcco's Phosphate Buffered Saline
EBO Endobrachyoesophage
EGF-R Epidermal Growth Factor- Receptor
GAPDH Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase
GC Glycocholique
GNa Glycocholate de sodium
HER : human EGFR-1
HES Hématoxyline-éosine-safran
HNF Hepatocyte Nuclear Factor
IgG Immunoglobuline G
IMC : indice de masse corporelle
JOG : jonction œso-gastrique
Ldha Lactate déshydrogénase A
MAPK Mitogen-Activated Protein Kinase
MCM6 Minichromosome Maintenance 6
MMP Matrix métalloprotéase
NFκB Nuclear factor kappa B
OB : œsophage de Barrett
OR : Odd- ratio
pb Paire de bases
PI3K Phosphatidylinositol-3-kinase
PK Protéine Kinase
PPI: Proton pump inhibitor
Ppia Peptidylpropyl isomerase 1

PVDF Polyfluorure de vinylidène
qRT-PCR Quantitative Retro-transcriptase polymerase chain reaction
rb: rétinoblastome
RGO Reflux gastro oesophagien
Rpl32 Ribosomal protein L32 sequence
RPMI Roswell Park Memorial Institute
SEA Sperm protein Enterokinase and Agrin (Urchin)
SDS Sodium dodécyl sulfate
shARN Short-hairpin ARN
siRNA Small interfering Ribonucleic acid
SVF Sérum de veau foetal
TBE Tris-Borate-EDTA
TBST Tris-Buffered Saline and Tween
TC Taurocholique
TDC Taurodésoxycholique
TEMED NNNN'-tétraméthyléthylènediamine
TFF Trefoil Factor

TGFB Transforming Growth Factor B
Tm Température d'hybridation
TNM Tumor-Node-Metastasis
TSG101: Tumor susceptibility gene 101
UTP Uridine triphosphate
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

Résumé

L'incidence de l'adénocarcinome de l'œsophage (AO) augmente depuis 30 ans dans les pays occidentaux et son pronostic est sombre. Le reflux gastro-œsophagien et les acides biliaires ont été incriminés dans l'apparition de l'œsophage de Barrett (OB), lésion précancéreuse s'accompagnant d'un processus de métaplasie intestinale et dans sa dégénérescence en dysplasie et en AO. Au cours de cette séquence carcinogénétique, a été observée, à partir de tissus humain, une augmentation de l'expression des mucines MUC1 et MUC4. MUC1 et MUC4 sont des *O*-glycoprotéines membranaires impliquées dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire et de signalisation intracellulaire. Les rôles respectifs des différentes composantes du reflux ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de cette séquence carcinogénétique demeurent mal compris.

Nous avons tout d'abord évalué le rôle de la composition du reflux sur le déroulement de la séquence carcinogénétique en utilisant un modèle animal de reflux induit. Pour cela, nous avons randomisé 108 rats Sprague-Dawley en deux groupes expérimentaux en réalisant une anastomose œso-duodénale avec (groupe reflux duodéno-œsophagien RDO, n=63), ou sans gastrectomie (groupe reflux duodéno-gastro-œsophagien RDGO, n=45). La prévalence de l'OB, de la dysplasie et de l'AO dans les groupes expérimentaux était de 41%, 7% et 11% respectivement. Aucune métastase à distance n'a été identifiée. Les caractéristiques moléculaires de l'OB identifié chez le rat étaient similaires à celles de l'homme. L'OB était plus fréquent, la dysplasie et l'AO moins fréquent dans le groupe RDO que dans le groupe RDGO (44% vs 24% [P = 0,038] et 7% vs 25% [P =0,012], respectivement). Il a été mis en évidence une surexpression des gènes de mucines Muc1 et Muc4 dans les zones les plus exposées au reflux.

Nous avons étudié les propriétés biologiques de cellules issues d'un AO humain et mis en évidence que la perte d'expression de MUC1 dans les cellules OE33 (i) diminue fortement leurs propriétés de prolifération, migration et invasion *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo*, suggérant un rôle majeur de MUC1 dans la tumorigenèse épithéliale si MUC1 est surexprimée (ii) est corrélée avec une diminution de l'expression de NFκB et PI3K peut-être corrélé à l'altération des propriétés biologiques, notamment de prolifération (iii) avec une diminution de l'expression de TSG 101 et MCM6 potentiels marqueurs mis en évidence dans le modèle murin.

En conclusion malgré des différences patho-physiologiques avec l'homme, le modèle de reflux œso-gastro-duodéal reproduit les lésions histologiques et moléculaires de la séquence carcinogénétique de Barrett et a permis d'identifier des protéines associées à la tumorigenèse et dont l'impact sur les propriétés biologiques des cellules tumorales a été confirmé *in vitro* et qui pourraient être de potentiels biomarqueurs et cibles thérapeutiques dans l'AO.

Mots clés : adénocarcinome - œsophage - modèle animal - séquence carcinogénétique - mucines - biomarqueurs

Abstract

Incidence of oesophageal adenocarcinoma developed on Barrett esophagus increases since 30 years and its prognosis remains poor. Gastro-esophageal reflux and biliary acids have been incriminated in Barrett esophagus metaplasia and its degeneration in adenocarcinoma according to the sequence metaplasia/dysplasia/adenocarcinoma. During the carcinogenic sequence, was observed an increase of expression of the mucins MUC1 and MUC4. MUC1 and MUC4 are membrane bound *O*-glycoproteins implicated in cell recognition and intracellular signaling. The mechanisms of esophageal reflux leading to esophageal adenocarcinoma (EA) remain poorly understood. In a first part we appraised critically an operatively induced chronic reflux rat model. We randomized 108 Sprague-Dawley rats into 2 experimental groups: one was performing esophago-duodenal (ED) anastomosis with or without gastrectomy to induce duodeno-esophageal reflux (DER group; n = 63), and the other involved duodeno-gastro-esophageal reflux (DGER group; n = 45). The prevalence of Barrett's esophagus (BE), dysplasia, and EA in the experimental groups was 41%, 7%, and 11%, respectively. No distant metastases were identified. The molecular characteristics of both BE and EA were similar to humans. BE was more common, and dysplasia and EA less frequent in the DER group when compared with the DGER group (44% vs. 24% [P = 0.038] and 7% vs. 25% [P = 0.012], respectively). It was highlighted an overexpression of MUC1 and MUC4 genes in the areas most exposed to reflux. Cell biological properties studies were carried out *in vitro* in OE33 oesophageal adenocarcinomatous cells. We showed that loss of expression of MUC1 in OE33 cells (i) induced a reduction of their proliferation, migration and invasion *in vitro* properties, tumor growth *in vivo* suggesting a major role of MUC1 in epithelial tumorigenesis if MUC1 is overexpressed, (ii) is linked with a diminution of the expression of NFκB and PI3K and can be correlated with an alteration of the biological

properties especially proliferation (iii) is lined with a diminution of expression of TSG101 and MCM6 , potential biomarkers highlighted in the rat model.

In conclusion, despite physiopathological differences with humans, the rat model of esophago-duodenostomy reproduces accurately histological and molecular lesions in the carcinogenetic sequence of BE and allowed us to identify novel, tumor-associated proteins that may be potential biomarkers and new therapeutic targets in EA.

Keywords: adenocarcinoma – esophagus – animal model- carcinogenetic sequence- mucins – biomarkers

1 INTRODUCTION

1.1 *Adénocarcinome de l'œsophage*

1.1.1 Epidémiologie

Le cancer de l'œsophage se situe dans le monde au 9^{ème} rang des cancers et au 7^{ème} rang des décès par cancer selon la base de données GLOBOCAN (Ferlay J Cancerbase 2010). Le nombre de nouveaux cas en 2008 est voisin de 480000 dont 400000 chez l'homme et 80000 chez la femme. En France, le cancer de l'œsophage touche chaque année près de 4300 personnes (TNCD 2013). Son pronostic tous traitements et tous stades confondus est **extrêmement sombre** avec une survie à 5 ans qui ne dépasse pas 10% (Mariette, Piessen et al. 2007). Certaines études suggèrent que les tumeurs diagnostiquées dans le cadre d'un programme de surveillance ont un stade plus précoce avec une meilleure survie (Streitz, Andrews et al. 1993; Wright, Gray et al. 1996; van Sandick, van Lanschot et al. 1998; Corley, Levin et al. 2002).

Les deux principaux types histologiques des cancers de l'œsophage sont le carcinome épidermoïde et l'adénocarcinome (Daly, Fry et al. 2000). L'**adénocarcinome** représentait il y a peu en France 25% des cancers de l'œsophage contre près de 65% aux Etats-Unis (Faivre, Lepage et al. 2005; Holmes and Vaughan 2007). Il existe au cours de ces 30 dernières années, une forte augmentation de l'incidence de l'AO (x6) (Whiteman DC Gut 2008), dans l'ensemble des pays occidentaux (Watson 2000; Faivre, Lepage et al. 2005; Pohl and Welch 2005; Holmes and Vaughan 2007) (Pera state of the art 2000) dans tous les groupes démographiques et plus particulièrement chez les hommes caucasiens (Edgren Gut 2012; Cook br j cancer 2009) **(Figures 1 et 2).**

Dans une série récente de cancer de l'œsophage opérés en France, l'adénocarcinome représentait 50% des cancers de l'œsophage (Collet D 2013).

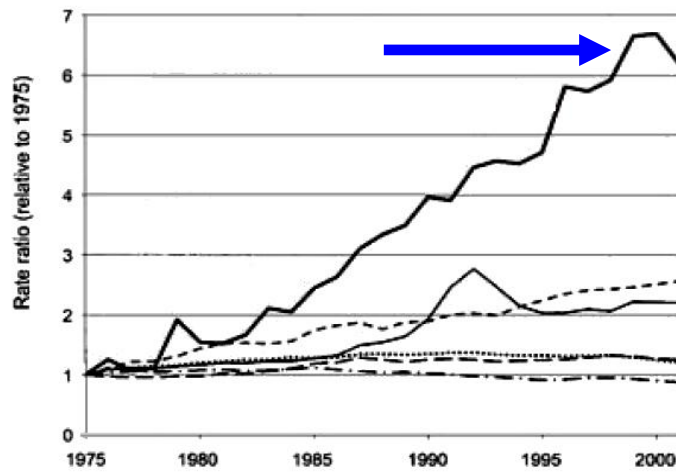


Figure 1 : Incidence du cancer de l'œsophage aux Etats-Unis : L'augmentation de l'incidence du cancer de l'œsophage par rapport au autres cancers fréquents (poumon, sein, colon, mélanome) (Pohl *et al.*, 2005).

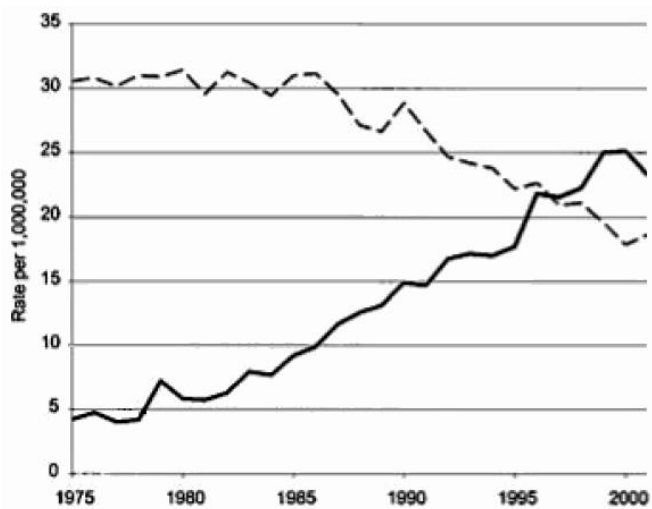


Figure 2 : Evolution des types histologiques aux Etats-Unis : L'incidence de l'adénocarcinome (ligne pleine) augmente, contrairement à celle du carcinome épidermoïde (Pohl *et al.*, 2005)

Une étude récente a démontré que la date de début d'augmentation d'incidence de l'AO variait en fonction des pays et avait débuté de façon brutale au milieu des années 1970 aux Etats-Unis ((Hur, Miller et al. 2013; Edgren, Adami et al. 2013). Cette augmentation d'incidence contraste avec la stabilité voire la diminution de l'incidence du carcinome épidermoïde de l'œsophage et explique que l'AO est en train de devenir le type histologique prédominant dans les pays occidentaux. Certaines études ont suggéré que l'augmentation de l'incidence de l'AO avait atteint un plateau (Pohl, Sirovich et al. 2010; Lagergren and Mattsson 2011), néanmoins, des études récentes suggèrent que l'augmentation de l'incidence de l'AO se poursuit à un taux similaire (Edgren, Adami et al. 2013).

1.1.2 Facteurs de risques de l'adénocarcinome de l'œsophage

De nombreux facteurs de risque d'AO ont été identifiés parmi lesquels le reflux gastro-œsophagien (RGO) et l'OB, l'obésité, le tabac, le sexe masculin, le type caucasien, l'âge avancé (Ochs-Balcom, Falk et al. 2007). Outre ces facteurs environnementaux, une prédisposition génétique a été identifiée dans 13% des cas dans une étude récente (Orloff, Peterson et al. 2011). Néanmoins, l'interaction entre les facteurs de risques génétiques et environnementaux reste mal élucidée.

1.1.2.1 Reflux gastro-œsophagien

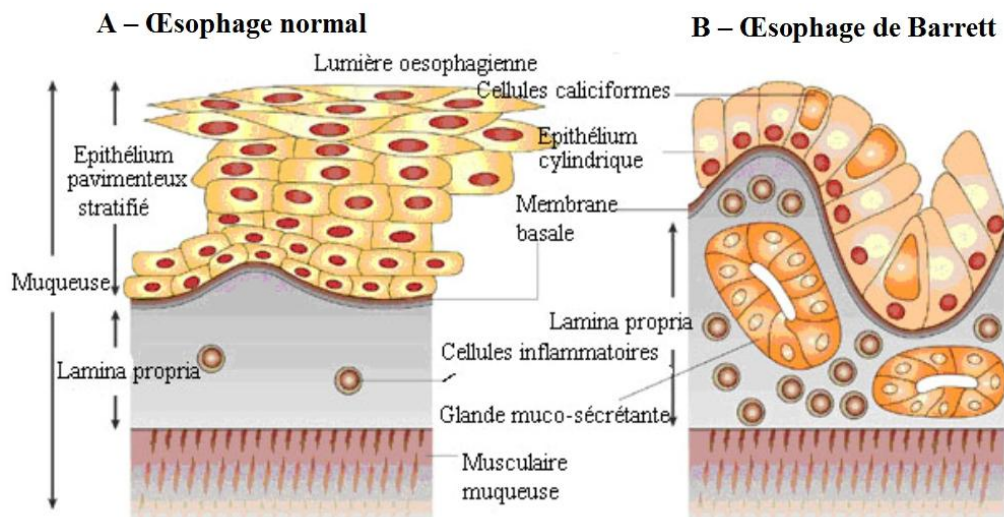
Le reflux gastro-œsophagien a été identifié en clinique comme étant un facteur de risque majeur d'AO (Mayne and Navarro 2002; Wild and Hardie 2003). L'incidence de l'AO a augmenté ces dernières années de façon parallèle à l'incidence du RGO (Lagergren, Bergstrom et al. 1999). Même si 40% des patients présentant un AO n'ont pas de symptômes de RGO (Lagergren, Bergstrom et al. 1999), celui-ci constitue un facteur de risque dose-dépendant (Rubenstein and Taylor 2010). La séquence carcinogénétique de l'adénocarcinome de

l'œsophage médiée par le reflux est initiée par le développement d'une inflammation de l'œsophage (œsophagite) suivi par le développement de l'œsophage de Barrett.

1.1.2.2 Œsophage de Barrett

L'OB se caractérise par le remplacement de la muqueuse malpighienne œsophagienne normale par une métaplasie glandulaire. Actuellement, la définition retenue par le Collège Américain de Gastroentérologie implique pour un diagnostic positif d'OB une languette de muqueuse anormale visible en endoscopie au-dessus de la jonction œsogastrique et correspondant en histologie à de la métaplasie intestinale (Sampliner 2002). Seul ce type de métaplasie est exposé à un risque de dégénérescence (Wild and Hardie 2003). **(Figure 3).**

Figure 3: Illustration de la métaplasie intestinale : Comparaison d'un épithélium œsophagien normal (A) avec un épithélium d'un œsophage présentant une métaplasie intestinale, ou œsophage de Barrett (B), caractérisé par la présence de cellules muco-sécrétantes et une augmentation du nombre de cellules inflammatoires (Wild and Hardie 2003).



La muqueuse de « type spécialisé » ou métaplasie intestinale est caractérisée par la présence de cellules caliciformes qui sont identifiées par la présence d'une large vacuole de mucus. La plupart des adénocarcinomes se développent sur OB selon la séquence métaplasie/dysplasie de grade croissant/ adénocarcinome (Schmidt, Riddell et al. 1985; Jaskiewicz, Louwrens et al. 1989; Prach, MacDonald et al. 1997). En cas d'OB, le risque relatif de développer un adénocarcinome par rapport à la population générale oscille entre 30 et 125 (Jenkins, Doak et al. 2002; Solaymani-Dodaran, Logan et al. 2004).

1.1.2.3 Obésité

L'obésité est associée à une augmentation du risque de plusieurs cancers, au premier rang desquels on trouve l'AO (Renehan, Tyson et al. 2008). Plusieurs mécanismes explicatifs ont été proposés, parmi lesquels la résistance à l'insuline, l'augmentation des taux de leptine et de stéroïdes sexuels endogènes, la diminution du taux d'adiponectine et l'inflammation chronique (van Kruijsdijk, van der Wall et al. 2009). Concernant l'AO, un mécanisme plus spécifique d'organe pourrait s'ajouter. En effet, l'adiposité augmente la pression intra-abdominale favorisant ainsi le RGO (Lagergren and Lagergren 2013). Une méta-analyse récente suggère que le RGO et l'obésité ont un rôle synergique mais distinct dans la survenue de l'AO (Hoyo, Cook et al. 2012)

L'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) est associée à une augmentation du risque d'AO, quelque soit le sexe (Hoyo, Cook et al. 2012). Les résultats de deux méta-analyses récentes suggère que par rapport à un patient avec un $IMC \leq 25$, le risque d'AO est 2,7 et 4,8 fois plus important en cas d' $IMC \geq 30$ et 40, respectivement (Hoyo, Cook et al. 2012; Turati, Tramacere et al. 2013). Plus que l'IMC, c'est la présence d'une adiposité à prédominance centrale et intra-abdominale qui a une grande influence sur le risque d'AO,

puisque le sur-risque existe même pour des patients ayant un IMC normal (Edelstein, Farrow et al. 2007; Corley, Kubo et al. 2008; O'Doherty, Freedman et al. 2012).

1.1.2.4 Tabac

Le tabagisme constitue un facteur de risque de développer un AO avec un risque relatif de 2,3 par rapport à un non fumeur (Engel, Chow et al. 2003). Ce sur-risque modéré n'explique pas l'augmentation récente de l'incidence de l'AO d'autant qu'il existe une tendance à une diminution de la consommation de tabac à l'heure actuelle. (Cook, Kamangar et al. 2010; Lubin, Cook et al. 2012);(van Meijgaard and Fielding 2012) La consommation de tabac a été montrée comme potentialisant le risque d 'AO chez les patients porteurs d'un RGO clinique (Pandeya, Webb et al. 2010).

1.1.2.5 Facteurs alimentaires

La consommation d'une alimentation hypercalorique, riche en cholestérol et d'un excès de viande rouge a été identifiée comme facteurs de risque majeur des adénocarcinomes œsogastriques (Mayne and Navarro 2002; Engel, Chow et al. 2003). Une alimentation pauvre en fruits et légumes augmente également le risque d'AO (Kubo, Corley et al. 2010). L'association du RGO, du surpoids, du tabagisme, et d'une faible consommation de fruits et légumes serait responsable de 76 à 79% des AO survenant en Australie et aux Etats-Unis (Engel, Chow et al. 2003; Olsen, Pandeya et al. 2011).

1.1.2.6 Acides biliaires

Plusieurs études ont suggéré un rôle majeur des acides biliaires dans l'initiation et la progression de la métaplasie intestinale en adénocarcinome (Wild and Hardie 2003; Fein, Maroske et al. 2006). Une transformation de la muqueuse de Barrett en adénocarcinome a été décrite chez plusieurs patients porteurs d'un reflux biliaire en l'absence de reflux acide

(Jankowski, Hopwood et al. 1993; Debruyne, Bruyneel et al. 2001; Piessen, Jonckheere et al. 2007).

1.1.3 Principaux facteurs protecteurs

1.1.3.1 Infection à Helicobacter pylori

L'infection à Helicobacter pylori est associée à une réduction significative du risque d'AO avec un Odd ratio de 0,27 (IC à 95% / 0,12-0,59) (Hansen, Vollset et al. 2007), Cette association inverse résulterait de l'atrophie gastrique liée à l'infection à Helicobacter pylori, qui en réduisant l'acidité et le volume de sécrétion gastrique, diminuerai le risque de RGO. Cette hypothèse est supportés par une étude cas-témoin démontrant que le taux de pepsinogène I, marqueur sérique d'atrophie gastrique est inversement proportionnel au risque de développer un AO (Anderson, Murphy et al. 2008).

1.1.3.2 Facteurs alimentaires

Plusieurs études mettent en évidence le rôle protecteur d'une alimentation riche en légumes, fruits et de la prise d'antioxydants tels que les vitamines C, E, bêta-carotène/vitamine A) sur la survenue d'un AO (van den Brandt and Goldbohm 2006; Kubo and Corley 2007).

1.1.3.3 Médicaments

L'augmentation de l'incidence de l'AO débutée il y a 30 ans est concomitante à l'augmentation de la disponibilité et de l'utilisation des médicaments inhibiteurs de la sécrétion acide gastrique. Un lien entre ces deux phénomènes a été évoqué (Lagergren, Bergstrom et al. 1999; Garcia Rodriguez, Lagergren et al. 2006). Il n'a pas été mis en évidence de lien entre l'augmentation de l'incidence de l'AO et l'utilisation d'inhibiteurs de la pompe à protons (Wild and Hardie 2003).

Les médicaments diminuant la contraction du sphincter inférieur de l'œsophage et favorisant le RGO comme certains anti-cholinergiques ont été associés à une augmentation du risque d'AO (Lagergren, Bergstrom et al. 2000; Fortuny, Johnson et al. 2007).

Le rôle des anti-inflammatoires dans la prévention de la carcinogénèse œsophagienne est controversée. Certaines études mettent en évidence un effet protecteur (Fortuny, Johnson et al. 2007), d'autres non (Abnet, Freedman et al. 2008). Une revue de la littérature récente s'intéressant aux facteurs de risque et à la prévention de l'OB suggère que l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens pourraient avoir un rôle protecteur sur l'apparition de l'OB (Winberg A 2012).

1.2 Physiopathologie de l'œsophage de Barrett

1.2.1 Définition de l'œsophage de Barrett

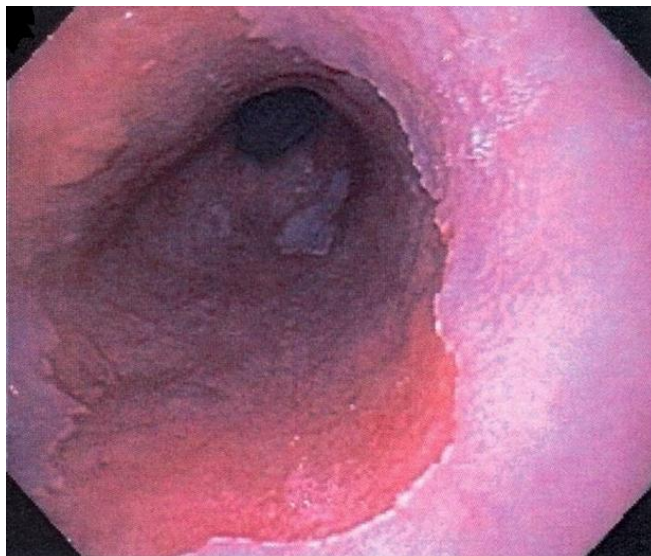
L'OB se caractérise par des languettes de muqueuse anormale de couleur saumon, se développant à partir de la jonction gastro-œsophagienne vers la muqueuse œsophagienne normale de couleur rose pâle (**Figure 4**). Microscopiquement il s'agit d'un remplacement de la muqueuse malpighienne par un épithélium de type glandulaire. Ce remplacement est appelé métaplasie, avec trois types décrits, de manière isolée ou diversement associée:

- un « type jonctionnel » ayant l'aspect d'une muqueuse cardiale,
- un « type fundique », semblable à celle du corps gastrique,
- un « type spécialisé » ou lésion de métaplasie intestinale, caractérisé par la présence de cellules caliciformes (cellules à mucus ou « goblet cells »), et identifié sur une coloration classique hématoxyline - éosine - safran (Daly, Fry et al.) par la présence d'une large vacuole de mucus optiquement vide (ou bleutée en cas d'utilisation de bleu alcian).

Seules les lésions de métaplasie intestinale peuvent dégénérer en adénocarcinome (Wild and Hardie 2003), et ce quelque soit la longueur du segment œsophagien concerné.

Figure 4 : Œsophage de Barrett en endoscopie

Aspect de languettes foncées correspondant au remplacement de l'épithélium malpighien normal par un tissu glandulaire. (Flèche noire)



1.2.2 Genèse de l'œsophage de Barrett :

La pathogénie exacte de l'OB n'est pas connue. Quatre théories existent à propos de son origine tissulaire (Jankowski, Harrison et al. 2000):

- **la théorie de la métaplasie *de novo*** : des cellules souches sont localisées dans le compartiment basal de l'épithélium œsophagien normal, en particulier au sommet des papilles.

La destruction des cellules du compartiment superficiel de l'épithélium œsophagien par le RGO rendrait ces cellules souches plus exposées et sensibles aux carcinogènes contenus dans le reflux ou ingérés, favorisant ainsi la constitution d'une muqueuse de Barrett,

- **la théorie de la métaplasie transitionnelle** : les cellules de la jonction œso-gastrique (zone transitionnelle) coloniseraient la muqueuse cardiale et œsophagienne distale en réponse à l'agression par le reflux gastro-œsophagien. Le caractère multipotent de ces cellules de la zone transitionnelle a en effet été rapporté, celles-ci pouvant exprimer un phénotype glandulaire dans l'œsophage ou malpighien dans le cardia en fonction des conditions locales,

- **la théorie de la métaplasie d'origine canalaire** : les cellules multipotentes situées au niveau des glandes œsophagiennes sous muqueuses coloniseraient sélectivement l'œsophage en cas d'atteinte de la muqueuse stratifiée,

- **la théorie des cellules souches** : la métaplasie dériverait des cellules souches de la moelle osseuse. Une étude menée chez le rat (Sarosi, Brown et al. 2008) a démontré que les cellules progénitrices de la moelle osseuse participaient à la régénération de la muqueuse œsophagienne et à l'initiation d'un OB en réponse au RGO. Des rates ont bénéficié d'une irradiation corporelle totale (900 cGy) puis ont été reçu une injection de cellules souches de moelle osseuse de rats mâles. Les rates ont ensuite subi une chirurgie induisant un RGO chronique et des lésions d'OB. L'analyse de ces lésions retrouvaient la présence de

chromosomes Y dans les noyaux des cellules épithéliales œsophagiennes et également dans les cellules constituant les zones de métaplasie.

1.2.3 Progression histologique de la séquence carcinologique

Le développement d'un AO sur OB résulte de modifications cellulaires et architecturales successives désignées sous le terme de dysplasie (Jaskiewicz, Louwrens et al. 1989). La séquence carcinogénétique a été documentée dans des études de cohorte qui ont montré une aggravation progressive de la sévérité des lésions dysplasiques (bas grade puis haut grade) avant l'apparition du cancer (Schmidt, Riddell et al. 1985).

Ces modifications histologiques sont les seules à être utilisées en pratique courante pour définir et surveiller les patients à risque de dégénérescence (Sampliner 2002). En effet, la réalisation de biopsies étagées par quadrant, selon les recommandations actuelles, pose des problèmes de représentativité de l'échantillonnage. Du fait de la mise en défaut de ces modifications histologiques dans la prédiction de l'évolutivité vers l'adénocarcinome, il serait intéressant d'identifier des altérations moléculaires qui permettraient de prédire l'apparition des différents éléments de la séquence carcinogénétique.

1.3 Carcinogenèse œsophagienne et problématique

1.3.1 Carcinogenèse œsophagienne

Cette carcinogenèse se fait selon une séquence bien identifiée où se succèdent métaplasie/dysplasie de grades croissants/ adénocarcinome (Prach, MacDonald et al. 1997). Les patients présentant une muqueuse de Barrett ont un risque relatif de développer un adénocarcinome de 30 à 125 fois supérieur comparé à la population générale (Jenkins, Doak et al. 2002). Pour un patient donné, le taux de transformation maligne est de 0,5 à 1% par an (Jankowski, Provenzale et al. 2002; Shaheen and Ransohoff 2002).

1.3.2 Problématique de prise en charge

Le développement d'un AO sur OB résulte de modifications cellulaires et architecturales successives de la métaplasie intestinale désignées sous le terme de dysplasie (Jaskiewicz, Louwrens et al. 1989). La séquence carcinogénétique a été parfaitement documentée dans des études de cohorte qui ont clairement montré une aggravation progressive de la sévérité des lésions dysplasiques (bas grade puis haut grade) avant l'apparition du cancer (Schmidt, Riddell et al. 1985).

Ces modifications histologiques sont les seules à être utilisées en pratique courante pour définir et surveiller les patients à risque de dégénérescence (Sampliner 2002). Le but de cette surveillance est de détecter des lésions précancéreuses ou cancéreuses débutantes afin de les traiter précocement et d'en améliorer le pronostic. Le risque de dégénérescence d'un OB étant faible avec un risque annuel de dégénérescence dans des études de cohorte récentes variant entre 0,12 et 0,14% et une incidence entre 1,2 et 1,4 pour 1000 personnes-années, 5% des patients développant un OB décèderont d'un AO (Jankowski, Provenzale et al. 2002; Shaheen and Ransohoff 2002; Lepage 2013). Ainsi, le rapport coût bénéfice de cette surveillance a été remis en question (Williams, Guernsey et al. 2006). Des études rétrospectives suggèrent néanmoins que les tumeurs détectées dans le cadre d'un programme de surveillance sont de stade tumoral moins avancé avec un meilleur pronostic (van Sandick, van Lanschot et al. 1998; Corley, Levin et al. 2002).

Cependant, les écueils d'une surveillance uniquement basée sur des critères histologiques sont les suivants: (i) variabilité intra- et inter-observateur de l'examen anatomo-pathologique (la concordance inter-observateur pour le diagnostic positif de dysplasie est de 72%), (ii) problèmes d'échantillonnage (coexistence de lésions d'ancienneté et de gravité différentes), et (iii) histoire naturelle des différents grades de dysplasie mal connue (Flejou 2005; Williams, Guernsey et al. 2006). Les lésions de dysplasie de bas grade étaient

habituellement réputées avoir un faible potentiel évolutif avec des cas de régression décrits (Flejou 2005). Deux études dont une incluant une double relecture anatomopathologique, font état d'une évolution vers la dysplasie de haut grade et l'adénocarcinome dans respectivement 15 et 30% des cas (Skacel M; Petras RE 2000; Montgomery 2001). L'évolution de la dysplasie de haut grade vers l'adénocarcinome n'est pas inéluctable ; ce type de lésion peut demeurer stable pendant des mois, voire plusieurs années (Kahrilas, Dodds et al. 1987; Schnell TG 2001).

En cas d'oesophagectomie pour dysplasie de haut grade, les séries chirurgicales récentes font état de la coexistence d'un adénocarcinome dans 30 à 40% des cas, malgré des protocoles systématisés de biopsies (Falk GW 1999; Tseng EE 2003). Pour cette raison, certains auteurs proposent une oesophagectomie en cas de dysplasie de haut grade. Cependant ; l'exérèse chirurgicale de l'oesophage même pour des états précancéreux ou des petites tumeurs reste un geste lourd grevé d'une mortalité de 3 % et d'une morbidité de 30%(Mariette C 2004) . L'ablation endoscopique des zones dysplasiques constituent une alternative à l'oesophagectomie en cas de risque chirurgical (Tokar et al 2006). Cette destruction des lésions muqueuses peut néanmoins aboutir à la persistance d'ilots de muqueuse glandulaire anormale sous l'épithélium malpighien qui repousse. Ces ilots échappent ainsi à la surveillance endoscopique avec le risque de découvrir cette lésion à un stade tumoral tardif (Maley 2007).

Ainsi actuellement la découverte lors de la surveillance endoscopique de lésions d'EBO constitue un tournant évolutif dans le suivi du RGO. A partir du stade de dysplasie de haut grade, un traitement par ablation ou destruction de l'EBO est justifié et une oesophagectomie sera envisagée lorsque le risque ganglionnaire le justifie, c'est-à-dire lors que la musculaire muqueuse est envahie (Mabrut J.-Y. 2013).

Il existe donc un intérêt à l'identification de nouveaux marqueurs de risque afin d'identifier le sous-groupe de patients à risque de dégénérescence. Ces événements histologiques seuls ne permettant pas une stratégie de prévention efficace et sûre, de nombreux auteurs se sont attachés à identifier les événements moléculaires correspondants.

1.4 Altérations moléculaires

En effet, des modifications chromosomiques ainsi que des altérations génétiques s'accumulent aboutissant à des anomalies d'expression de certains gènes et à une dérégulation du cycle cellulaire. Bien que la fréquence et la chronologie de ces événements ne soient pas aussi bien identifiées qu'au cours de la carcinogenèse colorectale, des schémas de progression carcinogénétique ont été proposés (Jankowski, Wright et al. 1999; Wijnhoven, Tilanus et al. 2001). Certaines de ces altérations moléculaires pourraient être utilisées afin de prédire ou d'identifier précocement les malades à risque de dégénérescence (Williams, Guernsey et al. 2006). Elles pourraient également permettre de prédire le stade tumoral, le pronostic, et la radio-chimio-sensibilité et de définir une cible en vue de l'administration d'une biothérapie (Williams, Guernsey et al. 2006).

1.4.1 Prolifération cellulaire et apoptose

L'augmentation de la prolifération cellulaire au cours de la progression de la séquence carcinogénétique est bien établie (Wijnhoven, Tilanus et al. 2001). Selon les études, l'apoptose est augmentée ou diminuée, notamment via le protooncogène bcl-2 ou le système Fas-Fas ligand, dont les membres sont surexprimés au cours de la progression de la séquence (Souza RF 2001; Jenkins, Doak et al. 2002; Raouf AA 2003). La télomérase est une enzyme qui empêche le raccourcissement des télomères. Par ce biais, elle réprime l'apoptose et provoque l'apparition de populations cellulaires immortelles dans lesquelles peuvent s'accumuler les mutations génétiques (Morales CP 1998; Wijnhoven, Tilanus et al. 2001; Morales CP 2002).

La télomérase ne s'exprime que peu ou pas dans les cellules somatiques et augmente dans les cellules cancéreuses. Son expression augmente dès le stade de métaplasie puis tout au long de la séquence carcinogénétique (Morales CP 1998).

1.4.2 Gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire

Au cours du cycle cellulaire, la phase G1 peut être bloquée par la p27 mais c'est surtout la transition de la phase G1 à la phase S (point R) qui est l'objet d'une intense régulation médiée par les interactions entre la protéine du rétinoblastome (rb), les cyclines, les « cyclin dépendant kinase » (CDKs), ainsi que les inhibiteurs des CDKs (comme p21) (Souza RF 2001; Wijnhoven, Tilanus et al. 2001). De nombreuses modifications ont été décrites au cours de l'évolution de la séquence aboutissant à un emballement du cycle cellulaire (Souza RF 2001; Morales CP 2002).

1.4.3 Ploïdie et anomalies chromosomiques

1.4.3.1 Ploïdie

La tétraploïdie ou l'aneuploïdie déterminées par cytométrie de flux augmente avec le degré de dysplasie, et sont associées au risque de progression vers l'AO (Montgomery E 1996; Wijnhoven, Tilanus et al. 2001) et à un plus mauvais pronostic en cas d'adénocarcinome constitué.

1.4.3.2 Anomalies chromosomiques

Les études cytogénétiques et une étude sur puces à ADN ont montré que l'anomalie chromosomique la plus fréquente était la perte du chromosome Y (Helm J 2005). Plusieurs autres anomalies impliquant des réarrangements ou un nombre aberrant de chromosome ont été mises en évidence sans qu'il ait été possible de déterminer si elles pouvaient aider à prédire la progression de la séquence carcinogénétique (Wijnhoven, Tilanus et al. 2001).

1.4.4 Gènes suppresseurs de tumeur

La perte d'une région chromosomique dans le tissu tumoral en comparaison du tissu sain suggère l'existence dans cette région ou à proximité d'un gène suppresseur de tumeur.

Les zones chromosomiques 3p, 5q, 9p, 13q, 17p et 18q sont fréquemment perdues dans l'AO. Certaines de ces zones sont porteuses de gènes suppresseurs de tumeur comme les gènes « adenomatous polyposis coli », p16, du rétinoblastome (rb), ou bien encore p53 qui interviennent directement ou indirectement dans la régulation du cycle cellulaire (Wijnhoven, Tilanus et al. 2001; Keswani, Noffsinger et al. 2006; Maley 2007).

1.4.5 Les proto-oncogènes

Ces gènes codent des protéines impliquées dans la transduction de signal et la régulation d'autres gènes. La survenue d'une mutation activatrice peut aboutir à la formation d'un oncogène qui va alors provoquer une sur-stimulation de la croissance cellulaire. Cette activation peut être secondaire à une mutation ponctuelle, une translocation chromosomique ou une amplification génique.

-Facteurs de croissance et récepteurs tyrosine kinase

L' « epidermal growth factor » (EGF), le « transforming growth factor-alpha » (TGF- α) et leur récepteur transmembranaire l' « epidermal growth factor receptor » (EGFR ou « human EGFR-1 » HER1 ou c-erbB1) et HER2 (ou c-erbB2) sont surexprimés de façon progressivement croissante au cours de la séquence carcinogénétique (Wijnhoven, Tilanus et al. 2001; Lagarde, Reitsma et al. 2007). Le Trastuzumab est une thérapie ciblée inhibitrice de HER2 (Trastuzumab) qui fait maintenant partie de l'arsenal thérapeutique validé en association avec une chimiothérapie pour les adénocarcinomes œsogastriques métastatiques surexprimant HER-2 (Okines and Cunningham 2012), mais un grand nombre de patients dont la tumeur est HER-2 positif ont toutefois une résistance primaire au Trastuzumab.

-Des mutations de gènes codant pour les kinases κ -ras (Sommerer, Vieth et al. 2004) et Src (Wijnhoven, Tilanus et al. 2001; Jenkins, Doak et al. 2002), ainsi que pour le facteur de transcription c-myc (Tselepis, Morris et al. 2003) ont été mises en évidence au cours de la séquence carcinogénétique.

1.4.6 Adhésion cellule-cellule

La diminution des interactions cellule-cellule supprime l'inhibition de contact et permet un échappement aux mécanismes contrôlant la croissance tissulaire, favorisant l'invasion et l'apparition des métastases. Ces événements semblent survenir tardivement au cours de la séquence carcinogénétique (Wijnhoven, Tilanus et al. 2001). Des anomalies du complexe E-cadhérine β -caténine ou de la protéine transmembranaire d'adhésion CD44 ont ainsi été rapportées (Maley 2007).

1.4.7 Les mucines

Les mucines sont des *O*-glycoprotéines impliquées dans la formation du mucus (mucines sécrétées) et dans les phénomènes de transduction de signal et de reconnaissance cellulaire (mucines membranaires). Ces dernières jouent des rôles clé dans les propriétés prolifératives, invasives et métastatiques des cellules tumorales (Moniaux N 2001). La spécificité de leur profil d'expression au cours de la séquence carcinogénétique en fait des marqueurs phénotypiques.

1.4.8 Néoangiogenèse

La néoangiogenèse est essentielle pour le développement, la progression, et la dissémination tumorale. Les « Vascular Endothelial Growth Factors » (VEGFs) sont une famille de facteurs de croissance angiogéniques surexprimés dans de nombreuses tumeurs dont l'AO et constituent une nouvelle cible thérapeutique (Morales CP 2002; Lagarde SM 2007).

1.4.9 Altérations moléculaires en pratique clinique

L'utilisation de ces altérations moléculaires en pratique clinique se heurte aux limites suivantes :

- La plupart des observations proviennent d'études transversales et non d'études longitudinales
- Les variations intra- et interindividuelles concernent les données moléculaires et histologiques (Brabender J 2004)
- L'hétérogénéité génétique et clonale joue probablement un rôle dans la progression de l'OB (Maley 2007)

Des études de microdissection laser sur OB ont montré que le profil mutationnel des cellules variait d'une crypte à l'autre (Maley 2007). Cette multiplicité des clones cellulaires est en faveur de l'évolution complexe de plusieurs lignées plutôt que de la progression linéaire d'une seule lignée (Wijnhoven, Tilanus et al. 2001).

La dysplasie de haut grade reste actuellement le marqueur prédictif de progression vers l'AO le plus fiable mais des modifications moléculaires comme l'aneuploïdie, les altérations des gènes p53 ou p16 et la surexpression de la cycline D1 sont prometteuses (Williams, Guernsey et al. 2006). De nombreux potentiels biomarqueurs dans différentes étapes de la carcinogénèse oesophagienne ont été mis en évidence par approche globale de screening transcriptomique et protéomique (Huang Q 2010; Illig, Klieser et al. 2013).

Il est probable compte tenu de la complexité et de la multiplicité des altérations moléculaires observées au cours de la séquence carcinogénétique qu'un panel de biomarqueurs soit nécessaire en vue d'une application clinique.

1.5 Modélisation de la séquence carcinogénétique

Le but de cette modélisation est d'étudier les différents stades de la séquence carcinogénétique afin de mieux comprendre les mécanismes régulateurs impliqués dans la dégénérescence.

1.5.1 In vitro

Les modèles *In vitro* d'épithélium malpighien sont soit des cellules épithéliales œsophagiennes natives (Kazumori, Ishihara et al. 2006) ou immortalisées par transfection virale SV-40 comme la lignée Het-1A (stoner et al 1991, hu 2007) soit des cellules de carcinome épidermoïde de l'œsophage, comme les lignées TE1, TE13 ou KYSE30 (Kazumori, Ishihara et al. 2006). Afin de mimer la jonction oeso-gastrique, l'utilisation d'une co-culture de cellules d'adénocarcinome OE21 et de carcinome épidermoïde TE7 de l'œsophage a été décrite (Fitzgerald RC 2002). Pour modéliser le stade de métaplasie intestinale, des lignées d'adénocarcinome colique sont le plus souvent utilisées comme les lignées Caco-2 ou HT-29 (Kazumori, Ishihara et al. 2006). La réalisation de cultures primaires de cellules d'OB transfectées par un rétrovirus contenant la sous-unité catalytique humaine de la télomérase reverse transcriptase (tERT) a également été décrite (Jaiswal K 2007).

1.5.2 Ex vivo

Afin de pallier les inconvénients du modèle cellulaire (monoculture, absence d'architecture tissulaire), la culture primaire d'explants tissulaires obtenus par biopsies a été proposée. Une analyse biologique et un dosage des lacto-déshydrogénases dans le milieu de culture permettent de s'assurer de l'intégrité morphologique et de la viabilité tissulaire (Shirvani VN 2000).

La majorité des expériences ont été menées sur des explants d'OB prélevés en endoscopie (Kaur, Ouatu-Lascar et al. 2000; Shirvani VN 2000; Fitzgerald RC 2002; Tselepis,

Morris et al. 2003). Ces études visaient à étudier l'effet de la composition du reflux sur la prolifération et la différenciation cellulaire. Une équipe a rapporté l'utilisation d'explants d'adénocarcinome dans le but de tester l'efficacité antitumorale de vecteurs adénoviraux (Marsman WA 2004). La viabilité tissulaire semblait toujours moins bonne que celle d'explants d'épithélium malpighien, d'OB ou de carcinome épidermoïde, possiblement du fait d'une plus forte activité métabolique.

1.5.3 Modélisation animale

De nombreux modèles animaux ont été développés dans le but de comprendre la pathogénie de l'OB chez l'homme. Certains modèles ont permis de reproduire la séquence carcinogénétique en induisant de manière expérimentale un reflux. L'utilité de la modélisation animale se justifie car elle permet (i) d'étudier les mécanismes carcinogénétiques et de tester l'effet thérapeutique de certaines molécules, (ii) l'adénocarcinome humain sur OB est un événement rare et imprévisible à l'échelon individuel, les travaux chez l'homme nécessitant donc de grandes cohortes et un suivi de plusieurs années, enfin (iii) les limites des modèles *in vitro* et *ex vivo*, ont été soulignées précédemment.

Le modèle animal idéal pour comprendre la pathogénie de l'OB devrait avoir des caractéristiques anatomiques, physiopathologiques et génétiques similaires à l'homme. Il a été proposé un modèle avec développement spontané d'une métaplasie intestinale au niveau de la JOG avec présence de glandes œsophagiennes sous-muqueuses qui pourraient mimer au mieux l'œsophage humain (Macke, Nason et al. 2011). Cependant hormis chez les primates aucun modèle animal ne présente de développement spontané d'AO sur OB.

Cependant l'induction d'AO a pu être réalisée par manipulation chirurgicale dans différents modèles.

Ainsi, le premier modèle décrit a été réalisé chez le chien (Bremner, Lynch et al. 1970). Il s'agissait d'une cardioplastie associée à une mucoséctomie permettant de créer un reflux. Les résultats témoignaient de la formation d'un épithélium glandulaire, avec des cellules caliciformes dans la zone d'œsophage exposée au reflux, permettant de démontrer le caractère acquis de lésion de métaplasie et de renforcer la théorie transitionnelle (les glandes sous muqueuse étant emportées par la mucoséctomie).

1.5.3.1 Modélisation chez le rat

Les études de modélisation de la séquence carcinogénétique ont été principalement développées chez le rat (Ireland, Peters et al. 1996; Miwa, Sahara et al. 1996; Goldstein, Yang et al. 1997; Moore, Barry et al. 2001; Pera, de Bolos et al. 2007) et donnent des résultats hétérogènes.

La réalisation d'une cardioplastie a été proposée afin de reproduire un RGO mais avec des résultats inconstants (Melo, Krueel et al. 1999). Les deux principaux types d'interventions utilisés ont été les anastomoses œso-duodénales et les anastomoses œso-jéjunales (Mirvish 1997). L'adjonction ou non d'une gastrectomie permet d'exposer l'œsophage à un reflux uniquement biliaire (avec gastrectomie) ou acido-biliaire (sans gastrectomie).

Dans ces modèles de rat, l'analyse du liquide de reflux retrouvait la présence des principaux acides biliaires et de l'acide gastrique. Il existait une œsophagite constante, témoin de l'agression chronique par le reflux. On retrouvait les différents stades de la séquence carcinogénétique qui surviennent dans le même ordre que chez l'homme au fur et à mesure de l'allongement du délai d'exposition au reflux (Jang, Min et al. 2004).

La présence de lésions de métaplasie intestinale chez le rat est en faveur de la théorie de la métaplasie *de novo* (Goldstein, Yang et al. 1997; Kumagai, Mukaisho et al. 2003; Su,

Chen et al. 2004). En effet, l'œsophage de rat ne comporte pas de glandes sous muqueuses, écartant donc l'hypothèse de la théorie de la métaplasie d'origine canalaire (Pera 2000).

Selon les études, les délais d'apparition de ces lésions différaient. Les lésions de métaplasie étaient constatées généralement à partir de 20 semaines. Les lésions de dysplasie et de cancer apparaissaient dans des délais plus variables, s'échelonnant de 10 à 30 semaines et de 10 à 50 semaines, respectivement (Pera 2000; Oyama, Fujimura et al. 2005; Miyashita, Ohta et al. 2006). Ces variations s'expliquent possiblement par l'administration de cocarcinogènes dans certaines de ces études (Ireland, Peters et al. 1996; Goldstein, Yang et al. 1997; Melo, Krueel et al. 1999; Bonde, Sui et al. 2007).

L'utilisation de cocarcinogènes comme la 2,6-di-méthyl-nitrosamine et la méthyl-n-nitrosamine permet de raccourcir la durée d'expérimentation de moitié (Attwood, Smyrk et al. 1992; Ireland, Peters et al. 1996; Miwa, Sahara et al. 1996). Leur utilisation est controversée car :

- les co-carcinogènes induisent des cancers en l'absence de reflux (Melo, Krueel et al. 1999; Sakuramoto, Sasako et al.) et favorisent l'apparition de cancers de type épidermoïde ou muco-épidermoïde (forme mixte d'adénocarcinome et de carcinome épidermoïde),
- l'existence d'OB dans ces modèles avec co-carcinogène a été fortement remise en question (Melo, Krueel et al. 1999)
- ils sont à l'origine d'une toxicité hépatique et rénale des taux de mortalité pouvant atteindre 20% des cas (Balansky 2002, Sallet 2002).

Le fer par voie parentérale a été décrit comme un cocarcinogène efficace (Goldstein, Yang et al. 1997), avec comme avantages :

- l'absence de toxicité propre démontrée, (Sakuramoto, Sasako et al.)

- l'absence d'impact direct sur les types histologiques des cancers induits (Goldstein, Yang et al. 1997; Buttar, Wang et al. 2002; Chen, Mukaisho et al. 2007), et, -

la lutte contre l'anémie postopératoire induite par le saignement peropératoire et la malabsorption induite par le montage chirurgical. C'est d'ailleurs dans ce but qu'il avait été initialement utilisé par Goldstein et al, (Goldstein, Yang et al. 1997).

- les caractéristiques des tumeurs ne semblent pas modifiées par la prise de fer avec la constatation d'adénocarcinomes mucineux bien différenciés développés au contact d'une zone d'OB et associées à des zones de dysplasie (Goldstein, Yang et al. 1997) .

Cet effet co-carcinogène du fer semble être imputable à son pouvoir oxydatif, et n'est pas modifié par l'ajout de N-nitrosamines (Goldstein, Yang et al. 1997; Chen, Yang et al. 1999; Su, Chen et al. 2004).

Au total, les résultats de ces études menées chez le rat sont variables et ne sont pas strictement similaires à ceux observées chez l'homme. En effet la fréquence des lésions de métaplasie et d'adénocarcinomes varie de 22 à 100% et 15 à 87% respectivement. Un taux aussi élevé de cancérisation est surprenant étant donné la rareté de sa survenue chez l'homme soumis au RGO. Les adénocarcinomes chez le rat sont habituellement de type mucineux, un type histologique rarement rencontré chez l'homme avec dans certaines études la description de carcinomes adénosquameux voire de carcinomes épidermoïdes. L'adjonction de cocarcinogènes ne permet pas d'individualiser l'effet du reflux dans la genèse des lésions. Les effectifs étudiés sont souvent faibles sans analyse statistique. Enfin l'authenticité des cancers observés a rarement été vérifiée et étudiée de façon approfondie sur le plan moléculaire. L'ensemble de ces constatations nous a incité à développer un modèle d'étude de la séquence carcinogénétique œsophagienne chez le rat en se basant sur des calculs d'effectifs précis avec

plusieurs groupes contrôles et une analyse de biologie moléculaire complète, afin d'en réaliser une approche critique. C'est l'objet de la **première partie de notre travail**.

1.5.3.2 Modélisation chez la souris

La modélisation animale de la séquence carcinogénétique chez la souris a également été rapportée de façon plus limitée dans la littérature. Les inconvénients principaux sont que : (i) le risque de développer une tumeur est plus faible que dans le modèle de rat, et (ii) la chirurgie est techniquement plus difficile du fait de la petite taille de l'animal avec un taux de mortalité postopératoire plus important (Xu, LoCicero et al. 2000; Garman, Orlando et al. 2012). Cependant les modèles de souris offrent l'opportunité de l'étude d'animaux transgéniques notamment mutés pour des gènes d'intérêt dans la carcinogenèse œsophagienne et constituent donc un axe de recherche intéressant.

1.6 Mécanismes de cytotoxicité du reflux gastro-oesophagien

Les mécanismes de cytotoxicité aboutissant à l'initiation et à la progression de l'OB sont encore mal élucidés. La composition du reflux est très hétérogène avec des composés oro-oesophagiens (salive, ingestats, sécrétions œsophagiennes), gastriques (acides, pepsine) et duodénaux (acides biliaires, cholestérol, sécrétion pancréatiques de contenant de la trypsine et de la lipase) (**Figure 5**).

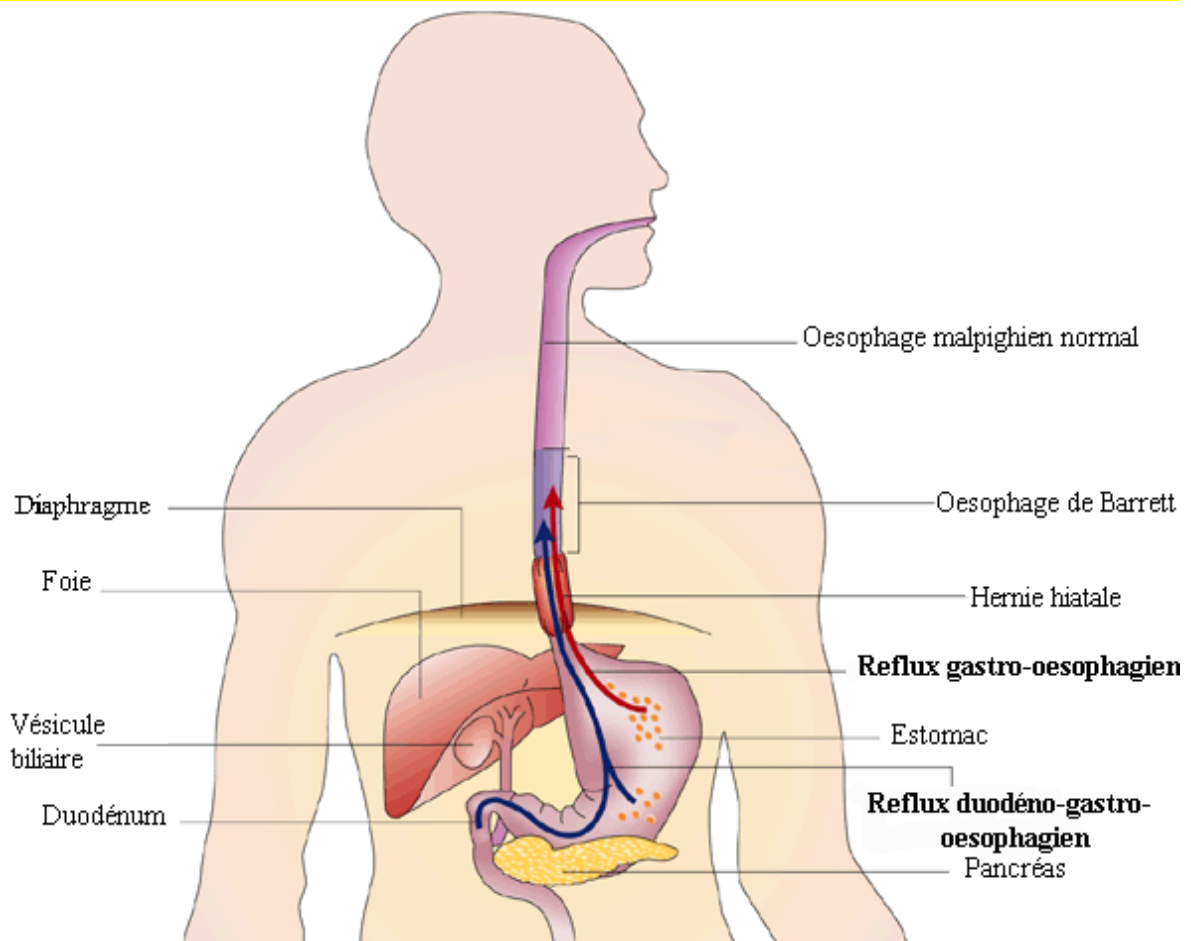


Figure 5: Différents types de reflux : Le reflux gastro-oesophagien (flèche rouge), le reflux duodéno-gastro-oesophagien (flèche bleue) (Wild and Hardie 2003).

1.6.1 Reflux gastrique :

L'**acidité gastrique et la pepsine** ont longtemps été considérés comme les seuls responsables des lésions d'œsophagite (Richter 2000). Cependant, les traitements antiacides, comme les IPP, bien qu'efficaces sur les symptômes cliniques du reflux, ne permettent ni la régression, ni l'arrêt de la progression des lésions de métaplasie (Triadafilopoulos 2000; Tack, Koek et al. 2004). Par ailleurs, l'apparition d'un OB chez certains patients présentant une achlorhydrie gastrique ou après gastrectomie suggère un rôle de la composante duodénale du reflux dans l'apparition de ces lésions.

1.6.2 Reflux duodéal :

Le reflux duodéal dans l'estomac est un phénomène physiologique, survenant principalement la nuit, qui peut en cas d'excès, provoquer des lésions muqueuses (Richter 2000). Plusieurs observations ont suggéré **un rôle majeur des acides biliaires** dans l'initiation et la progression des lésions de métaplasie intestinale en adénocarcinome (Kauer, Peters et al. 1997; Nehra, Howell et al. 1998) :

- la gravité des lésions d'œsophagite et d'OB est liée à l'existence d'une composante biliaire du RGO (Fein, Maroske et al. 2006),
- parmi les patients ayant un RGO, le reflux biliaire est plus fréquent chez ceux présentant un OB (Wild and Hardie 2003),
- une transformation de la muqueuse de Barrett en adénocarcinome a été décrite chez plusieurs patients porteurs d'un reflux biliaire sans reflux acide (Jankowski, Hopwood et al. 1993),
- les acides biliaires ont été impliqués dans la prolifération des cellules à mucus (Tselepis, Morris et al. 2003),

- dans des modèles animaux, le reflux duodéal a été identifié comme étant un carcinogène suffisant pour induire un AO sur lésions de métaplasie intestinale (Miwa, Sahara et al. 1996; Martin Fein 1998); le potentiel mutagène du reflux duodéal a été mis en évidence (Theisen, Peters et al. 2005).

1.6.3 Rôle de l'inflammation de la muqueuse œsophagienne et des radicaux libres

L'infiltrat inflammatoire est un phénomène commun au niveau de la muqueuse œsophagienne après agression par l'acide et la bile, en particulier autour des cellules souches au niveau du compartiment basal et de la papille (Goldblum JR 1998). Un infiltrat modéré persiste même après suppression de la composante acide du reflux par des médicaments anti-acides (Goldblum JR 1998). COX2 est surexprimée au cours de la séquence carcinogénétique et en cas d'exposition aux acides biliaires ou à l'acide (Kaur, Ouatu-Lascar et al. 2000; Shirvani VN 2000; Fitzgerald RC 2002; Wild and Hardie 2003).

Une inflammation, secondaire à des corps étrangers ou des parasites, peut induire la prolifération des cellules à mucus (Ishikawa N 1997; Lee HM 2000). L'infiltrat cellulaire inflammatoire observé dans l'œsophagite et l'OB pourrait contribuer aux lésions de l'ADN par le biais du stress oxydatif et de la production de radicaux libres (Wild and Hardie 2003); Des taux élevés de radicaux libres ont été identifiés dans la muqueuse œsophagienne ulcérée (Naya MJ 1997), et peuvent induire la production de cytokines. Les cytokines induisent la prolifération épithéliale, la migration cellulaire. Plusieurs d'entre elles sont produites par les cellules inflammatoires et l'épithélium dans la métaplasie de Barrett (Harrison RF 2000), comme le TGF- β , l'interleukin1 β (IL-1 β), l'interféron- γ (IFN- γ) et le « tumor necrosis factor- α » (TNF- α).

1.7 Acides biliaires

1.7.1 Synthèse

Les acides biliaires sont synthétisés à partir du cholestérol et participent à l'absorption des lipides contenus dans l'alimentation. Les acides biliaires primaires synthétisés dans le foie sont : l'acide cholique (C) et l'acide chénodésoxycholique (CDC). Avant leur excrétion dans le tractus biliaire, 90-95% d'entre eux sont conjugués et forment ainsi l'acide taurocholique (Buttar, Wang et al.), l'acide glycocholique (GC), le glycocholate de sodium (GNa), l'acide taurochénodésoxycholique (TCDC) et l'acide glyochénodésoxycholique (GCDC). Cette conjugaison favorise la solubilité des acides biliaires (hydrophilie). Près de 85% sont ensuite réabsorbés dans l'intestin grêle. Les 15% restant sont convertis en acides biliaires secondaires par la flore bactérienne intestinale. Ainsi, les acides désoxycholique (DC), taurodésoxycholique (TDC) et lithocholique (LC) proviennent respectivement de C et TC par déconjugaison et de CDC par déshydroxylation (Podevin, Rosmorduc et al. 1999; Debruyne, Bruyneel et al. 2001).

1.7.2 Effets biologiques et rôle du pH

A **pH acide** (2-5), les acides biliaires conjugués, constituants prédominants du reflux duodéno-gastro-oesophagien (Richter 2000), sont partiellement **ionisés**. Ils sont alors susceptibles de pénétrer dans les cellules épithéliales et de provoquer des lésions de l'ADN et des mitochondries (DeMeester 2001). Les **acides biliaires secondaires**, également présents dans le reflux duodéno-gastro-oesophagien (Nehra, Howell et al. 1999), semblent être responsables des lésions muqueuses à **pH plus élevé** (5-8) (Richter 2000). Les médicaments de type inhibiteur de la pompe à protons pourraient jouer un rôle aggravant sur les lésions muqueuses provoquées par les acides biliaires. En effet, l'augmentation du pH favorise la croissance de la flore bactérienne, qui génère des acides biliaires secondaires délétères à pH élevé, et des composés nitrosaminés carcinogènes (Wild and Hardie 2003). Les **acides**

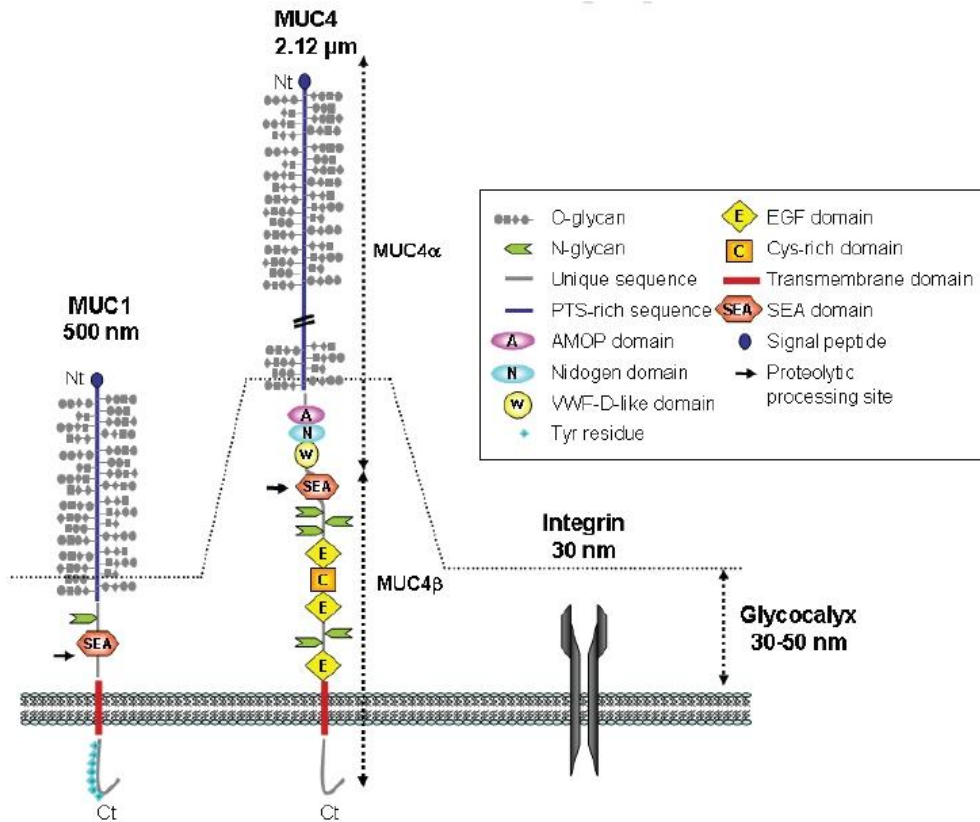
biliaires secondaires sont capables d'induire, **in vitro** sur des cellules œsophagiennes en culture, l'expression de marqueurs de lésions de **métaplasie intestinale** (Hu, Jones et al. 2007).

1.8 Les Mucines

1.8.1 Généralités

Les mucines constituent une famille d'*O*-glycoprotéines de masse moléculaire élevée. Elles sont caractérisées par la présence, au sein de leur domaine peptidique (apomucine) de séquences répétitives, disposées en tandem, riches en sérine et en thréonine (Jonckheere and Van Seuningen 2008), sur lesquelles viennent se fixer des chaînes glycaniques, par l'intermédiaire d'un résidu de N-acétylgalactosamine (**Figure 6**). Les mucines sont impliquées dans la formation du mucus (mucines sécrétées) (Corfield, Carroll et al. 2001) et dans les phénomènes de transduction de signal et de reconnaissance cellulaire (mucines membranaires) (Jonckheere and Van Seuningen 2008). Elles jouent des rôles clés dans les propriétés biologiques des cellules tumorales (prolifération et adhésivité) et dans la progression tumorale (Hollingsworth and Swanson 2004).

Figure 6: Structure des mucines : Représentations schématiques des squelettes protéiques des mucines transmembranaires les mieux caractérisées : MUC1 et MUC4. (Jonckheere and Van Seuningen, 2008).



1.8.2 Mucines sécrétées et mucines membranaires

Deux classes de mucines sont individualisées:

- les **mucines sécrétées** : MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC9, MUC19 (Porchet and Aubert 2004). Elles sont sécrétées à la surface épithéliale par les glandes spécialisées ou cellules à mucus. Les mieux caractérisées (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) sont localisées au sein d'un même cluster en 11p15.5 (Pigny, Guyonnet-Duperat et al. 1996). Leur capacité à s'oligomériser en fait un des constituants principaux du gel de mucus. Elles lui confèrent ses propriétés hydrophiles et rhéologiques et jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie des épithélia.

- les **mucines membranaires**: MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20, MUC21 (Jonckheere and Van Seuningen 2008). Elles possèdent un domaine hydrophobe trans-membranaire leur permettant de s'ancrer à la surface cellulaire et sont le plus souvent monomériques. Elles jouent un rôle dans les interactions cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire, dans la signalisation cellulaire, et le **processus métastatique** ce qui suggère l'importance de leur implication dans les propriétés des cellules cancéreuses (Porchet and Aubert 2004) .

1.8.2.1 La mucine MUC1

La mucine membranaire MUC1 est localisée au pôle apical de certaines cellules épithéliales polarisées. L'apomucine contient un domaine central O-glycosylé répété en tandem (TR) et une queue cytoplasmique de 72 acides aminés. MUC1 possède également un site potentiel de clivage, le domaine SEA, situé à la suite du domaine TR, contenant cinq sites potentiels de N-glycosylation (Jonckheere and Van Seuningen 2008).

Les tissus exprimant MUC1 réalisent des interactions spécifiques avec leur environnement grâce à la glycosylation de son domaine extracellulaire. Il est connu que MUC1 peut subir un épissage alternatif, ses épitopes variant dans de nombreux cancers tels que le cancer du côlon ou du sein. Son profil de glycosylation, ainsi que sa distribution, sont altérés dans les cellules épithéliales malignes : avec une distribution de MUC1 circonférentielle et non plus seulement apicale (Hollingsworth and Swanson 2004). Ce phénomène, ainsi que l'augmentation de la glycosylation, entraînent un encombrement stérique des cellules cancéreuses qui aide à leur détachement des cellules voisines et de la matrice extracellulaire. Parallèlement à ceci, dans les cellules cancéreuses, MUC1 va séquestrer la B-caténine et donc empêcher la formation de jonctions adhérentes, contribuant ainsi à leur migration (Kufe 2009). L'ensemble de ces changements a de lourdes conséquences sur les propriétés métastatiques des cellules cancéreuses.

Il a été montré que MUC1 joue également un rôle important dans la transduction du signal cellulaire (Schroeder, Thompson et al. 2001; Carraway, Ramsauer et al. 2002), la différenciation et la prolifération des cellules épithéliales. La fonction de MUC1 dans les voies de signalisation est due à la queue cytoplasmique qui interagit avec diverses protéines participant à la néoplasie, l'adhésion cellulaire, et également les quatre membres de la famille de récepteurs ErbB (Carraway, Ramsauer et al. 2002; Singh and Hollingsworth 2006). Toutes ces propriétés biologiques cellulaires sont altérées et subissent des modifications dans les cas de carcinomes, conférant à MUC1 un rôle majeur dans la progression tumorale et dans la formation de métastases (Hollingsworth and Swanson 2004; Carraway, Funes et al. 2007).

Tout ceci fait de la mucine membranaire MUC1 un outil attractif pour de nouveaux systèmes diagnostiques et également pour des thérapies immunologiques et/ou géniques des cancers (Jonckheere and Van Seuningen 2008; Jonckheere and Van Seuningen 2010).

Le profil d'expression des gènes de mucines épithéliales chez l'adulte sain varie selon le type cellulaire et tissulaire (Corfield, Carroll et al. 2001) Il est soumis à des variations au cours du développement, de la différenciation cellulaire, des processus inflammatoires et de la carcinogenèse (Van Seuning, Pigny et al. 2001) (**Figure 7**).

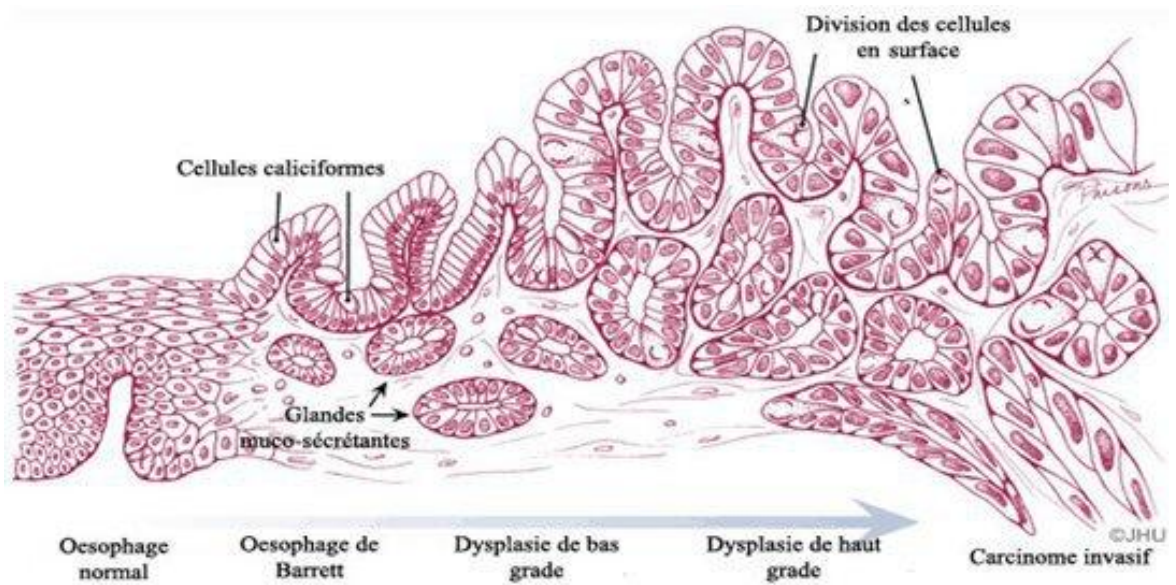
Au cours de ces modifications, il suit le phénotype tissulaire (Corfield, Carroll et al. 2001). Dans l'œsophage sain, MUC1 et MUC4 sont les deux principales mucines exprimées dans l'épithélium stratifié, alors que MUC5B est exprimée au niveau des glandes sous-muqueuses (Arul, Moorghen et al. 2000; Guillem, Billeret et al. 2000). La muqueuse de Barrett exprime fortement MUC5AC et MUC3 dans l'épithélium de surface, MUC2 dans les cellules à mucus et MUC6 dans les glandes. Par ailleurs, l'expression de MUC5B disparaît dès le stade des lésions de métaplasie intestinale (Arul, Moorghen et al. 2000).

Dans les lésions de dysplasie de haut grade et dans l'adénocarcinome sur OB, il y a une diminution de l'expression protéique de MUC2, de MUC5AC et de MUC6, alors qu'il existe une surexpression des mucines MUC1 et MUC4 (Arul, Moorghen et al. 2000; Glickman, Blount et al. 2006).

Figure 7: Variation d'expression des mucines au cours de la séquence carcinogénétique oesophagienne chez l'homme

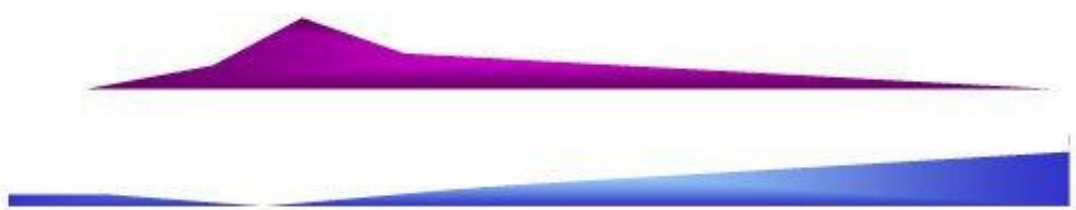
Les mucines sécrétées sont absentes dans l'œsophage normal, fortement exprimées au stade de métaplasie et leur expression décroît avec la progression dans la séquence.

Les mucines membranaires, sont présente dans l'œsophage normal, leur expression décroît au stade de métaplasie puis augmente avec la progression dans la séquence.



Sécrétées : *MUC2, MUC5AC, MUC6*

Membranaires : *MUC1, MUC4*



Les mucines semblent être des marqueurs phénotypiques adaptés au suivi de la séquence carcinogénétique conduisant à l'adénocarcinome (Arul, Moorghen et al. 2000; Guillem, Billeret et al. 2000; Warson, Van De Bovenkamp et al. 2002; Kyrgidis, Kountouras et al. 2005). De plus les apports récents sur les mécanismes de régulation de l'expression des mucines ouvrent des perspectives pour l'étude de la carcinogenèse œsophagienne et la définition de cibles thérapeutiques. En effet il a été montré que, suite à l'agression de l'œsophage par le reflux et notamment les acides biliaires, l'activation de l'expression des mucines est médiée par : la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pour les mucines membranaires (Mariette, Perrais et al. 2004; Mariette, Piessen et al. 2008), et le facteur de transcription CDX-2 pour les mucines sécrétées (Hu, Jones et al. 2007).

Notre équipe a porté son choix sur l'étude des mucines MUC1, MUC2 et MUC4 car (i) leur niveau d'expression varie au cours de la séquence carcinogénétique de l'AO, (ii) ce sont les mucines membranaires les plus étudiées et les mieux caractérisées et (iii) elles sont impliquées dans de nombreux cancers (Carraway, Ramsauer et al. 2003; Mariette, Piessen et al. 2007).

1.8.3 Régulation de l'expression des mucines dans l'œsophage

1.8.3.1 In vitro

Dans notre laboratoire, des travaux portant sur la régulation de l'expression des gènes de mucines, *MUC1* et *MUC4* par les acides biliaires dans la lignée cellulaire OE33 d'AO ont été effectués (Mariette, Perrais et al. 2004; Piessen, Jonckheere et al. 2007; Mariette, Piessen et al. 2008).

Les principaux résultats étaient les suivants:

- parmi différents acides biliaires testés TC, TDC, TCDC, GC et GNa augmentaient l'expression de *MUC1* et *MUC4*, via une régulation transcriptionnelle et traductionnelle. - en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des voies de signalisation PI3K, Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), Protein Kinase A (PKA) ou Protein Kinase C (PKC), il a été montré que la sur-expression de *MUC1* et de *MUC4* par les acides biliaires mettait en jeu principalement les voies PI3K pour *MUC4*, et les voies PI3K et MAPK pour *MUC1*,
- enfin, par des expériences de transfections cellulaires transitoires, il a été montré que la régulation de l'expression de *MUC4* par les acides biliaires était promoteur-dépendante -et que la régulation de l'expression de *MUC4* par les acides biliaires TDC et TCDC était médiée par le facteur nucléaire hépatocytaire 1 α (HNF1 α) (Piessen, Jonckheere et al. 2007).

1.8.3.2 Ex vivo

Dans un modèle *ex vivo* d'explants tissulaires humains de tissu sain, d'OB et d'AO remis en culture avec traitement par acides biliaires (selon un protocole mis au point dans le laboratoire), les résultats suivants ont été obtenus :

- les traitements par TC, TDC, TCDC, GC, GNa ou DC augmentaient le taux d'ARNm de *MUC1* en tissu adénocarcinomateux.
- seuls les traitements par TC, TCDC, GNa ou DC augmentaient le taux d'ARNm de *MUC4* en tissu sain et adénocarcinomateux,
- aucune variation de l'expression protéique de *MUC4* et *MUC1* en immunohistochimie n'a pu être mise en évidence dans les mêmes conditions de traitements.

1.8.3.3 Corrélation clinique

Nous avons précédemment étudié le profil d'expression des mucines *MUC1* et *MUC4* par analyses immuno-histochimiques dans l'AO associé à l'OB et des lésions co-existantes de

métaplasie, dysplasie et muqueuse normale afin d'évaluer leur valeur pronostique (Piessen, Wacrenier et al. 2009). Cette analyse a été réalisée à partir d'échantillons issus d'oesophagectomies pour adénocarcinome de l'œsophage chez 52 patients consécutifs entre 1997 et 2002. Les paramètres histo-pathologiques, de récurrence et survie à long terme étaient corrélés avec le nombre de cellules marquées. MUC1 et MUC4 étaient exprimés chez 52 et 41 patients avec adénocarcinome (soit 100 et 78%), respectivement.

Tous les échantillons surexprimaient fortement MUC1. La prévalence de MUC4 était significativement diminuée dans la métaplasie en comparaison avec la muqueuse normale (53 vs 92%, $p < 0,001$). Cependant aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre le niveau d'expression de MUC1 et MUC4 dans l'adénocarcinome de l'œsophage et les variables histo-pathologiques, la récurrence ou la survie. Il n'a donc pas été démontré de valeur pronostic pour MUC1 ni pour MUC4.

1.9 Buts du travail

Les travaux antérieurs de notre équipe ont donc démontré que les mucines MUC1 et MUC4 étaient impliquées dans la carcinogenèse œsophagienne et que leur expression était régulée par les acides biliaires.

Nous nous sommes fixés comme objectifs de :

1. Mettre au point un modèle animal de reflux gastro-duodéno-œsophagien chez le rat afin de pouvoir (i) étudier le rôle respectif de la composante acide et biliaire du reflux sur la carcinogenèse œsophagienne, (ii) de tester sa capacité à reproduire de façon fiable la séquence carcinogénétique chez l'homme, (iii) réaliser des analyses moléculaires afin d'étudier les voies de signalisation impliquées dans l'initiation et la progression de la séquence et de rechercher d'éventuels biomarqueurs et cibles thérapeutiques , (iv) tester de nouvelles thérapeutiques préventives ou curatives de l'AO ,
2. Poursuivre l'étude du rôle des mucines dans la carcinogenèse œsophagienne en focalisant notre attention sur l'étude du rôle de MUC1 sur les propriétés biologiques des cellules d'adénocarcinome de l'œsophage..

2 RESULTATS

2.1 Partie I : Apports et limites du modèle chirurgical pour induire et étudier la carcinogenèse œsophagienne induit par le reflux

Article I:

Operatively-induced chronic reflux in rats: a suitable model for studying esophageal carcinogenesis?

Caroline Gronnier*, Emilie Bruyère*, Guillaume Piessen, Nicolas Briez, Jérôme Bot, David Buob,

Emmanuelle Leteurtre, Isabelle Van Seuningen and Christophe Mariette (*both authors participated equally to this work)

Surgery, 2013 (sous presse)

Article II:

Suitability of surgically-induced chronic reflux in rats for studying esophageal carcinogenesis

Caroline Gronnier, Guillaume Piessen, Emmanuelle Leteurtre, Isabelle Van Seuningen, Christophe Mariette

Comment on:

Prevention of Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma by smoothed inhibitor in a rat model of gastroesophageal reflux disease. Gibson MK, Zaidi AH, Davison JM, Sanz AF, Hough B, Komatsu Y, Kosovec JE, Bhatt A, Malhotra U, Foxwell T, Rotoloni CL, Hoppo T, Jobe BA. *Ann Surg.* 2013 Jul;258(1):82-8.

Annals of Surgery ANNSURG-D-13-01361R1 in press

2.1.1 Chapitre I : Le reflux induit chirurgicalement chez le rat est-il un modèle valable pour l'étude de la carcinogenèse œsophagienne ?

Les mécanismes cytotoxiques du reflux qui conduisent à l'initiation puis à la progression d'OB en AO restent mal compris. En raison du délai long et du caractère aléatoire de la progression de la séquence carcinogénétique chez l'homme, une modélisation animale reproduisant cette séquence à une fréquence élevée et de façon non aléatoire serait utile afin de pouvoir étudier les mécanismes impliqués dans la dégénérescence de l'OB en AE. Dans la littérature différents modèles chirurgicaux de rats ont été publiés avec des résultats discordants sur (i) l'authenticité des lésions observées (type histologique et caractère tumoral), (ii) le délai d'apparition des différents éléments de la séquence carcinogénétique, et (iii) le rôle des différentes composantes du RGO sur le déroulement de la séquence (Ireland, Peters et al. 1996; Miwa, Sahara et al. 1996; Goldstein, Yang et al. 1997; Moore, Barry et al. 2001; Pera, de Bolos et al. 2007).

Nous avons donc adopté une approche critique du modèle animal avec induction chirurgicale d'un reflux chronique duodénal ou gastro-duodénal et avons étudié la survenue des différents éléments de la séquence carcinogénétique. Une analyse histologique et moléculaire a été réalisée afin d'authentifier les lésions observées et d'identifier de potentiels nouveaux marqueurs diagnostiques ou cibles thérapeutiques.

Le but de cette étude prospective expérimentale est : (i) une approche des mécanismes physiopathologiques au niveau histologique et moléculaire, (ii) une approche critique du modèle animal de reflux gastro-duodénal chirurgicalement induit afin d'en apprécier les limites, et (iii) l'identification de nouvelles protéines potentiellement impliquées dans la carcinogenèse œsophagienne.

Title: Operatively-induced chronic reflux in rats: a suitable model for studying esophageal carcinogenesis?

Caroline Gronnier ^{*1,2,3}, Emilie Bruyère ^{* 1,2,3}, Guillaume Piessen ^{1,2,3}, Nicolas Briez ^{1,2,3}, Jérôme Bot ^{1,2,3}, David Buob ^{1,2,4}, Emmanuelle Leteurtre ^{1,2,4}, Isabelle Van Seuningen ^{**1,2}, Christophe Mariette ^{**1,2,3}

¹Inserm, UMR837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Team 5 «Mucins, epithelial differentiation and carcinogenesis», Rue Polonovski, 59045 Lille, France

²Université Lille Nord de France, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France

³Department of Digestive and Oncological Surgery, University Hospital Claude Huriez, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, 59037 Lille, France

⁴Centre de Biologie-Pathologie, Department of Pathology, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Boulevard du Professeur Jules Leclercq, 59037 Lille, France

* Both authors equally contributed to the work.

** Both authors equally contributed to the work.

Corresponding author: Christophe Mariette, MD, PhD - Professor of Surgery - Department of digestive and oncological surgery, University Hospital Claude Huriez – Centre Hospitalier régional et Universitaire - Place de Verdun F-59037 Lille France Tel: +3320444407; Fax: +33320444385;

E-mail : christophe.mariette@chru-lille.fr

Financial support: This work was supported by La Fondation pour l’Avenir and La Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM 2009). Emilie Bruyère is the recipient of a PhD Fellowship from Le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille and Région Nord-Pas de Calais. Isabelle Van Seuningen is the recipient of a “Contrat Hospitalier de Recherche Translationnelle”/CHRT 2010, AVIESAN.

No financial disclosure

Article type: original article, experimental paper

Background

The mechanisms of reflux leading to esophageal adenocarcinoma (EA) remain poorly understood. This study critically appraises a surgically-induced chronic reflux rat model.

Methods

We randomised 108 Sprague Dawley rats into two experimental groups, performing esophago-duodenal (ED) anastomosis +/- gastrectomy, to induce duodeno-esophageal reflux (DER group, n = 63) and duodeno-gastro-esophageal reflux (DGER group, n = 45). Control groups included (i) Roux-en-Y esophago-jejunal anastomosis, (ii) laparotomy alone, (iii) subtotal gastrectomy to induce duodeno-gastric reflux (DGR group), and (iv) the same procedure as in the DGER group plus proton pump inhibition (PPI group). The esophagus underwent histological and molecular analyses.

Results

The prevalence of Barrett's esophagus (BE), dysplasia and EA in the experimental groups was 40.7%, 6.5% and 11.1% respectively. Histological and molecular analyses in groups DER, DGER and DGR suggested BE occurred through *de novo* intestinal metaplasia and proximal migration of duodenal cells. No distant metastases were identified. The molecular characteristics of both BE and EA were similar to humans. BE was more frequent, and dysplasia and EA less frequent, in the DER group when compared to the DGER group (44.4% vs. 23.8%, $P = 0.038$ and 6.7% vs. 25.4%, $P = 0.012$, respectively). When compared to the DGER group, carcinogenic sequence occurred less frequently in the PPI treated group ($P = 0.019$).

Conclusion: Despite pathophysiological dissimilarities with human, the rat ED model accurately reproduces histological and molecular lesions of the BE carcinogenic sequence and allowed us for identifying potential new tumor-associated proteins that may be new biomarkers and new therapeutic targets in EA.

Keywords: animal model; Barrett esophagus; duodenogastric reflux; esophageal cancer; surgery.

INTRODUCTION

Despite advances in multimodal therapy, the prognosis for invasive esophageal adenocarcinoma (EA) remains poor.¹ EA is thought to develop on Barrett's esophagus (BE), via low to high grade dysplasia sequence under the influence of duodeno-gastric-esophageal reflux (DGER).²

The cytotoxic mechanisms of reflux leading to initiation and progression of BE remain poorly understood. It is hypothesized that DGER pH changes caused by PPI may induce bile acid cytotoxicity through bile acid conjugation and may play a role in the raise of EA incidence in Western Countries.³

Due to long delay in the progression of the carcinogenic sequence in humans, an efficient animal model of BE and EA would be fundamental to the better understanding of the mechanisms involved. Various surgical models of BE/EA have been reported.⁴⁻¹⁰ None showed a superiority. Discrepant results have been reported regarding the time of development in each step in the sequence of carcinogenesis.¹¹ Whether the metaplasia in these models is *de novo*, originating from the esophageal glands, is derived by entrapment (stitching of duodenal mucosa to the esophageal wall during surgery) or occurs by creeping substitution (proximal migration of duodenal cells through the anastomosis) remains unclear.^{8,12,13} Doubt has been cast on whether these models reflect the development of BE and EA.⁸ Moreover, authors have reported adeno-squamous or pure squamous cell carcinoma, questioning the model's ability to elucidate mechanisms of tumorigenesis.^{9,13} Finally, the respective roles of duodenal and gastro-duodenal reflux in the model remain unsolved.^{5,7} These questions raise the validity of the animal model as a valuable tool in understanding the human carcinogenic sequence.^{8,12,13}

The aims of our study were consequently to evaluate at histological and molecular levels the (i) value of the rat model, and (ii) respective roles of the duodenal and gastro-duodenal reflux, in studying the BE/EA carcinogenetic sequence.

MATERIAL AND METHODS

Rat model – Surgery

Six week-old male Sprague-Dawley rats (Charles River, France), were housed under standard laboratory conditions. Operations were performed under general anesthesia, using xylazine (12 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg). Through a midline laparotomy, surgical procedures were performed to induce esophageal reflux. The experimental protocol received agreement from the Veterinary Ethics Committee (CREEA, authorisation no.59-350177).

1/ Experimental groups

- DGER group (duodeno-gastro-esophageal reflux): performing an esophago-duodenal (ED) anastomosis without gastrectomy, to study the impact of the combination of gastric and duodenal reflux on esophageal mucosa. The esophagus was transected proximal to the gastroesophageal junction, anastomosed to a duodenotomy with mucosal to mucosal apposition with 8 interrupted stitches of 7.0 polypropylene suture.
- DER group (duodeno-esophageal reflux): performing an ED anastomosis with gastrectomy, to evaluate the impact of the duodenal reflux on esophageal mucosa. A total gastrectomy was performed after ligation of left gastric vessels, short gastric vessels, and duodenum distal to the pylorus. The distal esophagus was anastomosed as in DGER group .

2/ Control groups

- RY (Roux-en-Y) group: performing an esophago-jejunal (EJ) anastomosis with jejunal loop without reflux (internal control). The proximal jejunum was ligated 4cm distal to the Treitz ligament and sectioned proximal to the ligature. The distal segment was anastomosed to the distal esophagus constructing a Roux-en-Y esophago-jejunostomy and entero-entero anastomosis at least 15cm distal to the esophago-jejunostomy using a one-layer running 7.0 polypropylene suture.
- LAP (laparotomy) group: performing a laparotomy only (external control).

- DGR (duodeno-gastric reflux) group: performing a partial gastrectomy respecting the gastroesophageal junction, with a gastro-duodenal anastomosis on the proximal body of the stomach. This group, in which the esophagus was adjacent to but not part of the anastomosis, acted as a control for the DER group to evaluate if the origin of esophageal intestinal metaplasia was *de novo*, originating from the esophagus, or originating from the duodenum through entrapment (stitching of duodenal mucosa to the esophageal wall during surgery) or creeping (proximal migration of duodenal cells through the anastomosis as a healing process).

The stomach was anastomosed to the duodenum performing a gastro-duodenostomy with 10 interrupted stitches of 7.0 polypropylene suture.

- PPI (proton pump inhibitor) group: rats who underwent the same procedure as in the DGER group received Esomeprazole (Astra-Zeneca, France), at a dose of 5µmol/kg, daily gavage from day 1 after the surgical procedure. This group was undertaken to obtain the suppression of the acidic component of the gastric reflux in surgically induced DGER rats to evaluate its role on reflux induced lesions.

Sacrifices and management of operative specimen

All animals were weighed on a weekly basis. Rats that became ill or lost >15% weight were euthanized. Rats that died before the scheduled date were autopsied.

Animals were sacrificed under general anaesthesia to recover tissue samples at 20 weeks for BE lesions, 30 weeks for dysplasia and 50 weeks for EA.¹¹ As a consequence of the intermediate results obtained, sacrifices were delayed to 60, 70 and 80 weeks, for the last 55 rats who were operated in order to test the hypothesis that longer exposure to reflux could increase the incidence of each step of the carcinogenic sequence.¹ After an injection of euthanizing agent T61, the thoracic and abdominal cavities were inspected with an en bloc removal of the esophagus. After longitudinal opening, the esophagus was sectioned into slices of 2-3mm

thickness. In rats with visible esophageal tumor growth, the liver and the lungs were removed in order to perform a histological analysis looking for the presence of micrometastasis.

Histological analysis

Histological analyses were performed by two expert pathologists in a double blinded manner (EL, DB). Tissues were fixed in 10% (w/v) buffered formaldehyde, embedded in paraffin, cut at 4µm thickness and finally applied on SuperFrost® slides (Menzel-Glaser, Germany). Slides were then stained with Hematoxylin-Eosin-Safran-Astra-blue. Lesions were defined as (i) BE: specialised columnar epithelium with structures mimicking human BE (intestinal-like cells and alcian-blue positive goblet cells) (ii) Dysplasia: lesions with an increase of the nuclear-cytoplasmic ratio, nuclear atypia, partial loss of cell polarity and increase in mitotic figures, and (iii) EA: predominant component or pure EA with an invasion through the basement membrane to surrounding tissues, tumor stroma reaction, increase in nuclear atypia, and mitotic figures.

pH-metry

A measurement of intragastric pH was performed, using a pH meter orion 2 star (Thermoscientific, France), in ten randomly selected rats of the DGER, LAP, and PPI groups, after aspiration through a gastrotomy, to assess the persistence of acid secretion (DGER group) or its suppression (PPI group).

RNA extraction and purification

Total RNA was isolated and purified from tissues using the NucleoSpin® RNA L kit (Macherey-Nagel, Germany) as described in manufacturer's protocol. The RNA quantity was determined by measuring the optical density at 260nm with a NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Total RNA (0.5µg) was used to prepare cDNA using the RT² First Strand Kit (SABioscience, USA). qRT-PCR was performed on cDNA (1 µl), using specific primers for TFF2

(PPR48691A), TFF3 (PPR52672A), Muc1 (PPR51463A), Muc4 (PPR47950A), Nfkb1 (PPR42746A), and Pik3cg (PPR56854A) synthesized by SABioscience and the RT² Fast SYBR Green Master Mixes/ fluorescein qPCR Master Mixes. For each of those primers, the standard curve was made in order to determine the best concentration of cDNA to use. Amplification was made in triplicate for each sample and the internal control used was the Lactate dehydrogenase A (Ldha) gene (PPR56603B). Amplification was made using the CFX96 thermocycler (BioRad, France): 1 cycle of 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C.

RT-PCR

Total RNA (1µg) was used to prepare cDNA using oligod(T) (1µl) and recombinant Retro-Transcriptase Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (1µl) (Promega, France). PCR was performed on cDNA (5µl), using specific pairs of primers: β actin (s: ATATCGCTGCGCTCGTCGACAA ; as: AACACAGCCTGGATGGCTACGTACAT), Cyclin D1 (s: TGACTGCCGAGAAGTTGTG ; as: GAGGGTGGGTTGGAAATG), ErbB1 (s: AGTGGTCCTTGCAAACCTTGG ; as: TTAACTCAAGCTGCCTCGCC), Cox2 (s: AGTATCAGAACCGCATTGCC ; as: TAAGGTTTCAGGGAGAAGCG), PI3K (s: GAAGCCATTGAGAAGAAAGGA ; as: GAGGTGTTTCAGTATTATCAGAGC), NF κ B (s: GAAGAAGCGAGACCTGGAG ; as: TCCGGAACACAATGGCCAC), Smad4 (s: CATTCTGTGGCTTCCACAA ; as: GACTGATGGCTGGAGCTATT) and VEGF (s: ACG AAA GCG CAA GAA ATC CC; as: TTA ACT CAA GCT GCC TCG CC) (MWG-Biotech, Germany). For each gene, analyses were made from at least three different rats. Rat β actin was used as the internal control. PCR products (20µl) were separated on a 1.5% (w/v) agarose gel containing ethidium bromide run in 1X Tris Borate EDTA buffer. The gene of interest/ β actin ratio was calculated after scanning DNA bands with GelAnalyst-GelSmart software (ClaraVision, France).

Microarray analysis

Complementary RNA was synthesized from total RNA and purified using the TrueLabeling-AMP 2.0 Kit and the ArrayGrade™ cRNA Cleanup Kit respectively (SABioscience), together with biotin-UTP (Roche, Neuilly-sur-Seine, France), according to the manufacturer's instructions. Complementary RNA (2µg) was incubated with Oligo GEArrays® (SABioscience): Rat Cancer PathwayFinder, Rat Tumor Metastasis, Rat Cell Cycle and Rat PI3K-AKT Signalling Pathway Microarrays, all designed for profiling the expression of 113 genes. Expression level of each gene was detected by chemoluminescence using ECF™ substrate on a Storm® 860 scanner (GE Healthcare Buckinghamshire, England). Signals were finally analyzed with the GEArray® Expression Analysis Suite (SABioscience).

Immunohistochemistry

Protein expression was studied using either manual or automatic immunohistochemistry (IHC). Automatic IHC with an automated 8 immunostainer (ES, Ventana Medical System, France). Antibodies were purchased from Cell Signaling [Cyclin D1 (2926 at 1/50e)], Santa Cruz Biotechnology [MCM6 (sc-9845 at 1/100e) [Mmp3 (sc-31074 at 1/100e), Mmp7 (sc-8832 at 1/50e), Mmp10 (sc-6842 at 1/200e) and Timp1 (sc-6834 at 1/100e)]. Positive controls were included by staining normal rat tissues known to express the protein of interest and negative controls were run with 1X D-PBS instead of primary antibodies.

Cell culture

The OE33 esophageal adenocarcinomatous cells were purchased from the European Collection of Cell Culture (ECACC) and cultured as described in Mariette *et al.*¹⁴

siRNA (Small interfering RNA) assays

Parental OE33 cells were transfected with siRNA from Dharmacon (Epsom, United Kingdom) following the protocol described in Piessen *et al.*¹⁵

Proliferation

Cell proliferation was analysed by counting cells on a Malassez counting chamber. OE33 cells transfected with siRNA were plated on 24-well plates then counted during 3 days after transfection.

Migration

Cell migration was studied by a wound healing test. Cells were plated on 96-well plates until confluence, a wound was then performed using the 96-pin WoundMaker (Essen Bioscience). Plates were finally placed in an incubator with 5% of CO₂ at 37°C into the Incucyte™ (Essen Bioscience). Every other hour a picture of the wound was taken. The wound closure percentage was then measured every 12h, from 0 to 48h.

Statistical analysis

The primary objective was the occurrence of at least one element of the carcinogenetic sequence (either BE, dysplasia or EA). Based on preliminary experiments and literature results, we hypothesized that with a power of 80% and an α value of 5%, at least 45 animals per experimental group (DGER and DER groups) were required to observe an incidence of 40% in one group versus 75% in the other group (bilateral comparison of two binomial proportions). Since intermediate analysis showed a mortality rate up to 60%, the number of rats required per group was 120. Statistical analysis was performed using SPSS version 15.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Data are shown as prevalence and means (standard deviation). Continuous data were compared by means of the Mann-Whitney *U* test and ordinal data by the chi-square test or Fisher exact test as appropriate. All statistical tests were two-sided with the threshold of significance set at $P < 0.050$.

RESULTS

Global evaluation

Among 285 rats operated on, 120 were included in the DGER group and 120 in the DER group. The overall mortality rate was 53.0% and decreased during the study period from 67.8% to 36.9%. 55 rats died from respiratory failure due to massive aspiration (none in the no-reflux groups). Other causes of death were malnutrition (loss of weight > 15%) (n = 62), peritonitis (n = 9), intra-operative complications (n = 20) and unknown causes (n = 5). Number of survivors analyzed was 63 in the DGER group, 45 in DER the group, 6 in the DGR group, 10 in the PPI group, 7 in the RY group, and 3 in the LAP group.

Nutritional status

The mean body weight loss was 10% (+/- 4) and was maximal after 3 weeks. After an initial postoperative decrease, the animal body weight curve progressively joined the one of the control group (not shown). This result suggests that nutritional status did not interfere with the results that we observed.

pH-metry

The mean values of the intragastric pH were 2.7 (+/-0.35), 2.8 (+/- 0.4) and 5.05 (+/-0.35) in the DGER, LAP and PPI groups, respectively. This underlines the expected persistence of acid gastric secretion in the DGER group and a significant reduction after PPI administration ($P=0.019$). These results validate the surgical approaches to generate both duodenal and gastro-duodenal refluxes, in a similar way as observed in humans.

Macroscopic and histological results

Reflux lesions

In the LAP and RY groups, all rats had normal esophagus on macroscopic (Figures 1A and 1B) and microscopic examination (Figure 2A). In the DGER (Figure 1C) , DER, DGR and PPI groups (not shown), the esophagus was dilated and markedly shortened in all rat and microscopic analysis showed esophagitis (Figure 2B). These results attest the efficacy of this chronic reflux model to induce esophagitis.

Steps of the carcinogenetic sequence

In the LAP and RY groups (Figures 1A and 1B), no lesions of the carcinogenetic sequence were found. In the reflux groups, 32 animals exhibited a visible tumor growth localised on the external surface of the esophagus (Figure 1C).

Histological analysis in the experimental groups showed at least one step of the carcinogenetic sequence in 50% of rats (Table 1). Prevalence of BE, dysplasia and cancer were 40.7% (n = 44), 8.3% (n = 9), and 11.1% (n = 12), respectively. Histological lesions were always observed in the distal esophagus, which was the region with maximal exposure to reflux. Among 32 macroscopic tumors, only 12 were histologically proven carcinomas (Figure 1E), the 20 remaining cases showing only an inflammatory granulomatous reaction. The positive predictive value of a macroscopic examination in predicting a cancerous lesion was only 37.5%.

This suggests that exposure to chronic reflux promotes the development of elements of the carcinogenic sequence in half of the animals in comparison with 5-20% in men.¹⁶

Histological tumor characteristics

Among the proven carcinomas, 8 were well-differentiated mucinous adenocarcinomas (malignant infiltrating glands associated with lakes of extracellular mucus) (Figure 1E). Five rats developed adeno-squamous carcinomas combining components of squamous carcinoma and adenocarcinoma, but in all cases adenocarcinoma was the major tumoral component. Some of these cases exhibited endovascular invasion, confirming their malignant nature. Neither lymph node nor distant metastases were identified macroscopically during sacrifices. In rats with visible esophageal tumor growth, a systematic histological analysis of the liver and the lungs did not exhibit any micrometastatic dissemination. Even if sometimes features of local malignancy were observed, these results challenge the ability of these tumors to disseminate.

Characterization of the Intestinal Lesions

The IHC analysis showed that intestine-specific markers such as Villin, Cdx-2 and Muc2, were expressed in BE, whereas they were never expressed in normal esophagus (not shown). Expression of cytokeratins 4 (CK4) and 14 (CK14), known to participate in the cytoskeleton formation and usually found in normal esophageal epithelium, in the cytoplasm of the supra-basal cells for CK4 and of the basal cells for CK14, was also assessed. They were expressed in the histologically normal rat esophagus without expression in BE lesions.

These results confirm the differentiation of normal esophageal cells submitted to reflux into an intestinal-type phenotype mimicking human BE.

Origin of the Intestinal Mucosa

In order to investigate the origin of BE lesions observed in the reflux groups, we went further in the histological analysis. We observed the presence of numerous villi and Brünner glands in the esophageal wall, two histological characteristics of normal duodenum, that are usually not present in human BE (Figure 2 B and 2C). These results suggest that BE lesions in the ED rat model may not be true BE lesions originating *de novo* from the esophagus but be caused mechanically induced through entrapment or creeping (Figure 2). To validate these hypotheses, additional experimentations were handled. Firstly, a histological reassessment of rats with BE was performed. A short segment of BE surrounded by squamous mucosa corresponding to a typical aspect of entrapment was found in one rat (Figure 2D). Secondly, another control group was constructed by performing a subtotal gastrectomy and gastro-duodenal anastomosis (DGR group) in which the esophagus did not form part of the anastomosis. As presented in Table 1, esophagitis was present in all cases confirming the presence of an actual reflux. One rat developed a massive mucinous adenocarcinoma coming directly from the anastomotic site and located between the remaining stomach and lower esophagus with surrounding BE lesions. In the absence of histological lesions solely developed in the esophagus, this group did not allowed us to eliminate the hypothesis of creeping. Expression pattern of genes encoding trefoil factors

(TFF) in BE has been previously shown to differ significantly from that in normal jejunal mucosa in an EJ rat model,¹⁷ suggesting that BE lesions represented de novo BE and not creeping. We therefore undertook to study the expression of TFF-2 and TFF-3 mRNA by qRT-PCR in BE and normal duodenum. The expression of TFF-2 was elevated more in BE compared with duodenum (1030 folds) whereas expression of TFF3 was more uniform in the tissues and was not discriminant (1.6 folds) (not shown).

Altogether, these data suggest that, in this ED model, BE lesions may occur through various concomitant mechanisms including *de novo* intestinal metaplasia and proximal migration of duodenum (entrapment and creeping that could not be eliminated).

Characterization of the Esophageal Adenocarcinomatous lesions (Figure 3)

We sought to evaluate the similarities of tumors found in humans and in this model. The expression of genes and proteins associated with EA tumorigenesis,^{18,19} and/or implicated in mediation of bile acid effects in EA²⁰ was compared in normal esophageal mucosa (no-reflux control groups) and in EA. Having previously shown that membrane-bound mucins MUC1 and MUC4 are overexpressed in human EA and that they are regulated by bile acids,^{15,20} we undertook to confirm their altered pattern of expression in the rat model. We showed that genes encoding Muc1 and Muc4 mucins were overexpressed in EA (figure 3A), as well as at the protein level (not shown). Expression of transcription factors associated with esophageal tumorigenesis²¹ or implicated in MUC1 or MUC4 regulation by bile acids,^{15,20} was also studied (figure 3B, 3C, 3D). A neo-expression of Smad4 (TGF β pathway) and Cox2 (inflammation) was observed in EA when compared to RY controls (Figure 3B). An increase of cell-cycle actor Cyclin D1 and EGF receptor ErbB1 (cell proliferation), NF κ B (cell signaling), VEGF (angiogenesis) was also found (Figure 3C). By qRT-PCR, we confirmed the activation of two central signalling pathways in EA tumor progression: NF κ B and PI3K (Figure 3D) Hnf-1 α and Hnf-4 α transcription factors were not expressed in the esophagus of the RY and LAP groups

whereas nuclear expression was found in EA lesions. Nuclear expression of P63 protein was found in the esophageal epithelium of RY and LAP groups and was lost in EA. Nuclear expression of Ki-67 (proliferation) was observed in the basal layer of the normal esophageal epithelium in the RY and LAP groups and in EA lesions (not shown). After studying genes known to participate in esophageal carcinogenesis, we then searched for new actors using a transcriptomic approach (Figure 4). As above, genes known to participate in proliferation (cyclin D1) and metastasis formation or invasion (Mmp3, -7, -9, -10, -13, the metalloproteinase-inhibitor Timp1) were up-regulated in EA. Conversely, tumor suppressor (Tp53, Tsg101, Pten), and genes participating in cell death (CHEK2, Caspase 9) were down-regulated (Figure 4A). Alteration of gene expression was confirmed at the protein level by IHC for some of the markers (Figure 4B). We then focused our attention on three genes, CHEK2, TSG101 and MCM6, not known yet to participate in esophageal tumor progression. Using a siRNA approach, those genes' expressions were knocked-down in OE33 cells (Figure 5). Decreased proliferation was observed for the three deficient cells lines and was significant as soon as day 2 for MCM6 deficient cells (D2: $p = 0.0309$; D3: $p = 0.0019$) and as of day 3 for CHEK2 and TSG101 (D3: $p = 0.0056$ and D3: $p = 0.0009$ respectively). No difference in cell migration was found in CHEK2, TSG101 or MCM6 deficient cells compared to controls (Figure 5).

These data indicate that tumor progression is induced by chronic reflux, with activation of signalling pathways and expression of tumor-associated proteins in a similar way in both the DGER and DER groups. These results demonstrate that BE and EA present similar molecular characteristics in both experimental groups when compared to humans.

Role of time exposure on esophageal carcinogenesis

The prevalence of histological lesions did not differ between the different times of exposure to reflux (esophagitis $P = 0.612$, BE $P = 0.195$, dysplasia and EA: $P = 0.741$). No significant differences were found when comparing time of reflux exposure to promote at least one step of

the carcinogenetic sequence between the DGER and DER groups (median times 50 [22-68] vs. 50 [22-83] weeks, $P = 0.789$) (Table2). Subgroup analysis in the DGER and the DER groups found similar results ($P=0.741$). This suggests that esophageal carcinogenesis is not clearly linked to time exposure to reflux and that delaying the sacrifice after 50 weeks is useless.

Role of the reflux composition on esophageal carcinogenesis

The proportion of rats who developed at least one step of the carcinogenic sequence did not differ significantly between the two groups (49.3 vs. 51.2%, respectively $P = 0.841$). BE lesions were more frequent in the DER group when compared to the DGER group (44.4 vs. 23.8%, $P = 0.038$). Prevalence of dysplasia and/or EA lesions was less in the DER group (6.7%, vs. 25.4%, $P = 0.012$).

These results suggest that the duodenal component of the reflux may play an initiating role in the carcinogenic sequence whereas duodenogastric juice may lead to progression of the carcinogenic sequence to EA.

Impact of acid component of gastric reflux

In order to determine the role of acid component in these findings, a control PPI group ($n = 10$) was constructed. Macroscopic and histological results are presented in Table. At 30 weeks, the esophageal macroscopic appearance was similar in the PPI ($n = 10$) and in the DGER groups ($n = 19$), with esophagitis present in all rats. At least one step of the carcinogenetic sequence was observed more frequently in the DGER group (57.9%) when compared to the PPI group (10.0%) ($P = 0.019$). These results suggest that the acidic reflux may favour progression of the carcinogenic sequence toward EA.

DISCUSSION

The rat surgical model using either ED or EJ anastomosis is considered the most promising in reproducing histological lesions mimicking the human EA carcinogenic sequence.³ However,

few have characterized the lesions which develop at both histological and molecular levels.^{8,13,21,22} This has led to the urgent need to resolve whether the rat model reliably and accurately reproduces the carcinogenic sequence as it occurs in humans.^{8,12}

We demonstrate here that an ED rat surgical model of reflux allows the development of metaplasia-like lesions (BE) and its degeneration into dysplasia and EA with similar histological and molecular characteristics as described in humans. We show that the duodenal component of the reflux may play a significant role in initiating the carcinogenic sequence, whereas duodenogastric juice may lead to its progression to EA. However, many discrepancies have been highlighted in the literature when comparing human observations to previous animal models.^{1,5-10} It includes the development of benign tumor and adeno-squamous tumors rarely observed in humans, a low rate of EA tumorigenesis despite deliberate esophageal exposure to intensive gastroesophageal reflux disease and no impact of the exposure duration on the incidence of BE/EA. The absence of tumoral dissemination to regional lymph nodes or distant organs also questions whether the induced tumors behave in a truly malignant manner. It has also been questioned whether creeping substitution of the esophageal mucosa or entrapment of the jejunal mucosa may be the mechanisms to be involved in the development of BE rather than a *de novo* process. As reported by others^{8,9} the high postoperative mortality rate despite wellknown expertise of the surgical team, raised ethical concerns and questioned the reproducibility of such modeling.

In humans, BE metaplasia is thought to result from the abnormal differentiation of esophageal stem cells or from the transdifferentiation of one mature esophageal cell type into another type of mature cell.²³ Gene expression profile of TFF in a rodent model with EJ anastomosis may indicate that BE occurs *de novo* and is not due to proximal migration of jejunal mucosa.¹⁷ However, presence of numerous intestinal villi and Brunner glands in the DRG group and observation of short segment of BE surrounded by squamous mucosa suggest that BE-like

lesions in the rat model also may arise from duodenal mucosa through entrapment or creeping in accordance with previous studies.^{8,9} only a formal lineage tracing could allow us to definitely enlighten this point. Contrary to our results, some authors^{7,9,11} have suggested that the time of exposure to reflux may determine both the type and the incidence of the lesions which develop, however the number of rats operated on in each of those studies was relatively small.^{6,8,11} The incidence in the present study of EA was low (13%) with some adeno-squamous tumors occurring despite avoiding the use of nitrosamines, a co-carcinogen shown to be responsible for high rates of a squamous cell tumoral component.²⁴ A review has discussed the reproducibility of the rat model²⁵ with regard to (i) the variability of the surgical procedures, with a higher rate of EA after EJ than after ED anastomosis,^{3,13} possibly because of less reflux juice volume in the latter type of anastomosis,²⁶ (ii) the various durations of reflux exposure, (iii) the use of a variety of rat species, and more importantly (iv) the suboptimal pathological analysis of induced lesions.⁸

We performed a transcriptomic approach that allowed us to identify numerous genes that have been previously shown to be important in human EA corroborating the validity of this model.^{15,27,28} Moreover, this analysis allowed us to identify new potential biomarkers involved in esophageal carcinogenesis. Firstly, S100a4 gene, which protein is known to have many roles in cancer cell properties was found to be upregulated.²⁹ We previously reported that altered properties of OE33 esophageal cancer related to MUC4 deficiency correlated to that of the calcium-binding protein s100A4.²¹ These results are in favour of regulation of S100A4 by the membrane-bound mucin MUC4, that would lead to decreased proliferation and migration properties of esophageal cancer cells.

MCM6 and CHEK2, both involved in cells' proliferative properties, were up regulated in our transcriptomic study. Their roles in cells' proliferation were confirmed by *in vitro* study. MCM6 has been previously shown to be involved in meningioma and to be correlated with clinical

outcomes and grade.³⁰ As for CHEK2, a gene mutation has been associated with an increased risk of breast cancer.³¹ Our results associated to the previously findings of the literature allow us to assess that MCM6 and CHEK2 may play an important role in the tumoral properties of the OE33 esophageal adenocarcinoma cells.

Whereas, Tsg101 has been found down regulated in our transcriptomic study, *in vitro* .down regulation of Tsg101 by small interfering RNA inhibits the proliferation of oesophageal cancer cell as previously reported for breast cancer.³²

The respective contributions of the duodenal and gastro-duodenal reflux on the development of BE and EA are still controversial.^{5,7,9,12} We wanted to evaluate the impact of the gastric and the duodenal contents on the carcinogenic sequence. The gastric juice has previously been shown to be neutralized when an EJ anastomosis is performed without gastrectomy,³³ hence, we chose to perform an ED anastomosis.^{6,25} We show that absence of gastric juice (DER group) was associated with significantly earlier lesions of BE whereas combined gastric and duodenal reflux (DGER group) was associated with more advanced lesions (dysplasia and EA). A control group of rats exposed to a mixed reflux and receiving drug acid suppression (PPI group) confirmed this mechanism with a dramatic decrease in the number of early lesions. Confirming previously reported data using a cellular model of EA, these results suggest a distinct impact of the duodenal reflux according to pH environment.³⁴ This leads to hypothesize that PPI may prevent the initiation of the carcinogenic sequence with a protective effect. These results are in accordance with a recent published study,³⁵ but contrary to another³⁶ in which a PPI was administered subcutaneously on alternative days without verification of acid suppression by pH measurements.

Gastric content may act as a catalyst for the carcinogenic process favouring tumor development. When comparing our data to published results from previous similar rat studies comparing DGER and DER, 3 of 4 studies did not show any differences between groups regarding the

occurrence BE or EA, with small number of animals enrolled and lesions not related to reflux.^{7,9,12} The fourth study suggested a protective effect of gastric juice against the development of EA.⁵

We chose for ethical reasons to include a limited number of rats in the control groups. On the PPI group, we performed a preliminary analysis at 30 weeks. Since the results were statistically significant, it does not seem ethically valid to continue the study.

In conclusion, despite pathophysiological dissimilarities with human, the rat ED model accurately reproduces histological and molecular lesions of the BE carcinogenic sequence and allowed us for identifying potential new tumor-associated proteins that may be new biomarkers and new therapeutic targets in EA. This rat ED anastomosis model offers a unique opportunity to study the respective roles of the duodenal and gastro-duodenal contents on the BE carcinogenic sequence.

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank Dr Jean-Noël Freund (Inserm U782, Strasbourg) for scientific discussions. We thank also Dr William B Robb for critical reading of this article. This work was supported by grants from CHRU de Lille, Région Nord-Pas-de-Calais, La Fondation de l'Avenir and La Fondation pour la Recherche Médicale (EQUIPE FRM 2009).

REFERENCES

1. Mariette C, Piessen G, Briez N, Gronnier C, Triboulet JP. Oesophagogastric junction adenocarcinoma: which therapeutic approach? *Lancet oncol* 2011;12: 296-305.
2. Hamilton SR, Smith RR. The relationship between columnar epithelial dysplasia and invasive adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:301-12.
3. Moore KH, Barry P, Burn J, Falk G. Adenocarcinoma of the rat esophagus in the presence of a proton pump inhibitor: a pilot study. *Dis Esophagus* 2001; 14:17-22.
4. Levrat M, Lambert R, Kirshbaum G. Esophagitis produced by reflux of duodenal contents in rats. *Am J Dig Dis* 1962; 7:564-73.

5. Ireland AP, Peters JH, Smyrk TC, DeMeester TR, Clark GW, Mirvish SS, et al. Gastric juice protects against the development of esophageal adenocarcinoma in the rat. *Ann Surg* 1996; 224:358-70.
6. Goldstein SR, Yang GY, Curtis SK, Reuhl KR, Liu BC, Mirvish SS, et al. Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen. *Carcinogenesis* 1997; 18:2265-70.
7. Fein M, Peters JH, Chandrasoma P, Ireland AP, Oberg S, Ritter MP, et al. Duodeno-esophageal reflux induces esophageal adenocarcinoma without exogenous carcinogen. *J Gastrointest Surg* 1998; 2:260-8.
8. Buskens CJ, Hulscher JB, van Gulik TM, Ten Kate FJ, van Lanschot JJ. Histopathologic evaluation of an animal model for Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the distal esophagus. *J Surg Res* 2006; 135:337-44.
9. Miwa K, Segawa M, Takano Y, Matsumoto H, Sahara H, Yagi M, et al. Induction of oesophageal and forestomach carcinomas in rats by reflux of duodenal contents. *Br J Cancer* 1994; 70:185-9.
10. Li H, Walsh TN, O'Dowd G, Gillen P, Byrne PJ, Hennessy TP. Mechanisms of columnar metaplasia and squamous regeneration in experimental Barrett's esophagus. *Surgery* 1994; 115:176-81.
11. Pera M, Brito MJ, Poulsom R, Riera E, Grande L, Hanby A, et al. Duodenal-content reflux esophagitis induces the development of glandular metaplasia and adenosquamous carcinoma in rats. *Carcinogenesis* 2000; 21:1587-91.
12. Oberg S, Wenner J, Johansson J, Walther B, Willén R. Barrett esophagus: risk factors for progression to dysplasia and adenocarcinoma. *Ann Surg* 2005; 242:49-54.

13. Bonde P, Sui G, Dhara S, Wang J, Broor A, Kim IF, et al. Cytogenetic characterization and gene expression profiling in the rat reflux-induced esophageal tumor model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133:763-9.
14. Mariette C, Piessen G, Leteurtre E, Hémon B, Triboulet JP, Van Seuningen I. Activation of MUC1 mucin expression by bile acids in human esophageal adenocarcinomatous cells and tissues is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase. *Surgery* 2008; 143:58-71.
15. Piessen G, Jonckheere N, Vincent A, Hémon B, Ducourouble MP, Copin MC, et al. Regulation of the human mucin MUC4 by taurodeoxycholic and taurochenodeoxycholic bile acids in oesophageal cancer cells is mediated by hepatocyte nuclear factor 1alpha. *Biochem J* 2007; 402:81-91
16. Macke RA, Nason KS, Mukaisho K, Hattori T, Fujimura T, Sasaki S, et al. Barrett's esophagus and animal models. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1232:392-400.
17. Oh DS, DeMeester SR, Dunst CM, Mori R, Lehman BJ, Kuramochi H, et al. Validation of a rodent model of Barrett's esophagus using quantitative gene expression profiling. *Surg Endosc* 2009; 23:1346-52.
18. Fitzgerald RC. Molecular basis of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 2006; 55:1810-20.
19. Zagorowicz E, Jankowski J. Molecular changes in the progression of Barrett's oesophagus. *Postgrad Med J* 2007; 83:529-35.
20. van der Sluis M, Melis MH, Jonckheere N, Ducourouble MP, Büller HA, Renes I, et al. The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 325:952-60.
21. Bruyère E, Jonckheere N, Frénois F, Mariette C, Van Seuningen I. The MUC4 membrane-bound mucin regulates esophageal cancer cell proliferation and migration properties: Implication for S100A4 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 413:325-9.

22. Su Y, Chen X, Klein M, Fang M, Wang S, Yang CS , et al. Phenotype of columnar-lined esophagus in rats with esophagogastrroduodenal anastomosis: similarity to human Barrett's esophagus. *Lab Invest* 2004; 84:753-65.
23. Eberhard D, Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:33-40.
24. Mirvish SS. Studies on experimental animals involving surgical procedures and/or nitrosamine treatment related to the etiology of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Lett* 1997; 117:161-74.
25. Attwood SE, Harrison LA, Preston SL, Jankowski JA. Esophageal adenocarcinoma in "mice and men": back to basics! *Am J Gastroenterol* 2008; 103:2367-72.
26. Sato T, Miwa K, Sahara H, Segawa M, Hattori T. The sequential model of Barrett's esophagus and adenocarcinoma induced by duodeno-esophageal reflux without exogenous carcinogens. *Anticancer Res* 2002; 22:39-44.
27. Song S, Guha S, Liu K, Buttar NS, Bresalier RS. COX-2 induction by unconjugated bile acids involves reactive oxygen species-mediated signalling pathways in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Gut*. 2007; 56:1512-21.
28. Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J, Von Weyhern C, Reiter R, Feith M, et al. Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study. *J Clin Pathol* 2006; 59:631-4.
29. Sherbet GV, Lakshmi MS. S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res* 1998; 18:2415-21.
30. Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu SF, Soudant M, Pinelli C, et al. Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome. *Am J Surg Pathol* 2012; 36:283-91.

31. Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, Syrjakoski K, Ojala S, Kilpivaara O, et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 2002;71:432–8.
32. Zhang Y, Song M, Cui ZS, Li CY, Xue XX, Yu M, et al. Down-regulation of TSG101 by small interfering RNA inhibits the proliferation of breast cancer cells through the MAPK/ERK signal pathway. *Histol Histopathol.* 2011; 26:87-94.
33. Fein M, Fuchs KH, DeMeester TR, Peters JH, Wittmann D, Weig M. Evaluation of the intestinal microflora in the rat model for esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus* 2000; 13:39-43.
34. Kaur BS, Ouatu-Lascar R, Omary MB, Fang M, Wang S, Yang CS, et al. Bile salts induce or blunt cell proliferation in Barrett's esophagus in an acid-dependent fashion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:1000-9.
35. Miyashita T, Shah FA, Marti GP, Wang J, Bonde P, Gibson MK, et al. Rabeprazole impedes the development of reflux-induced esophageal cancer in a surgical model. *Dig dis sci* 2011; 56:1309-14.
36. Nasr AO, Dillon MF, Conlon S, Downey P, Chen G, Ireland A, et al. Acid suppression increases rates of Barrett's esophagus and esophageal injury in the presence of duodenal reflux. *Surgery* 2012; 15:382-90.

Figure 1:

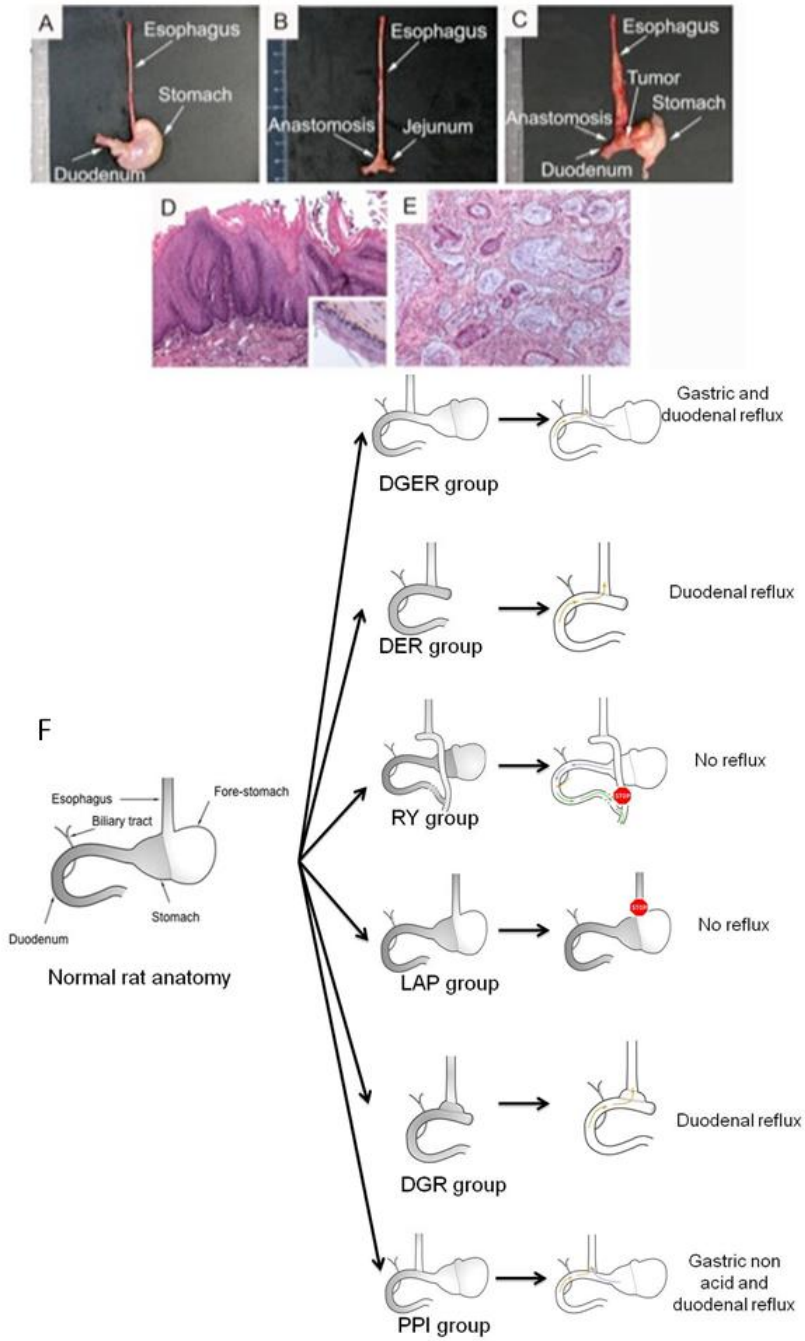


Figure 2:

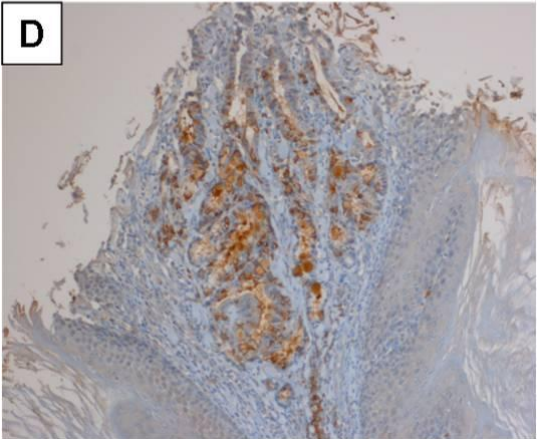
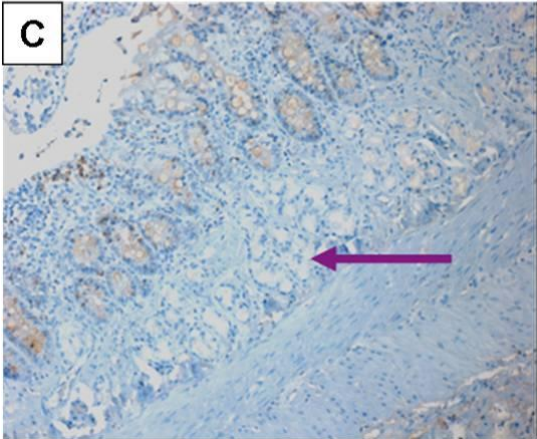
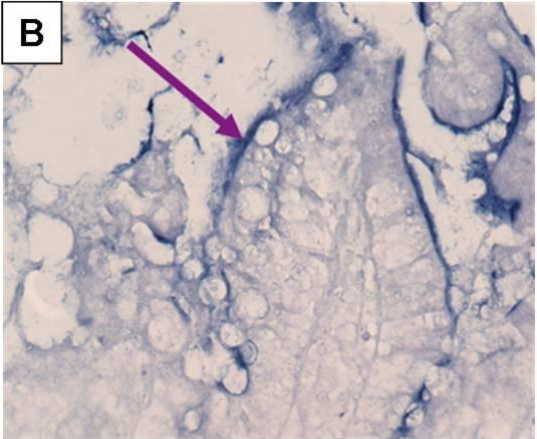
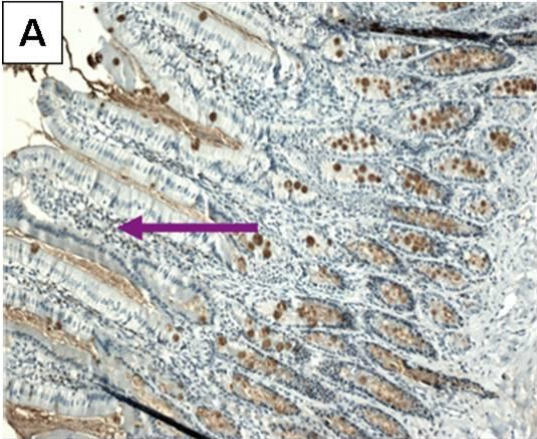


Figure 3:

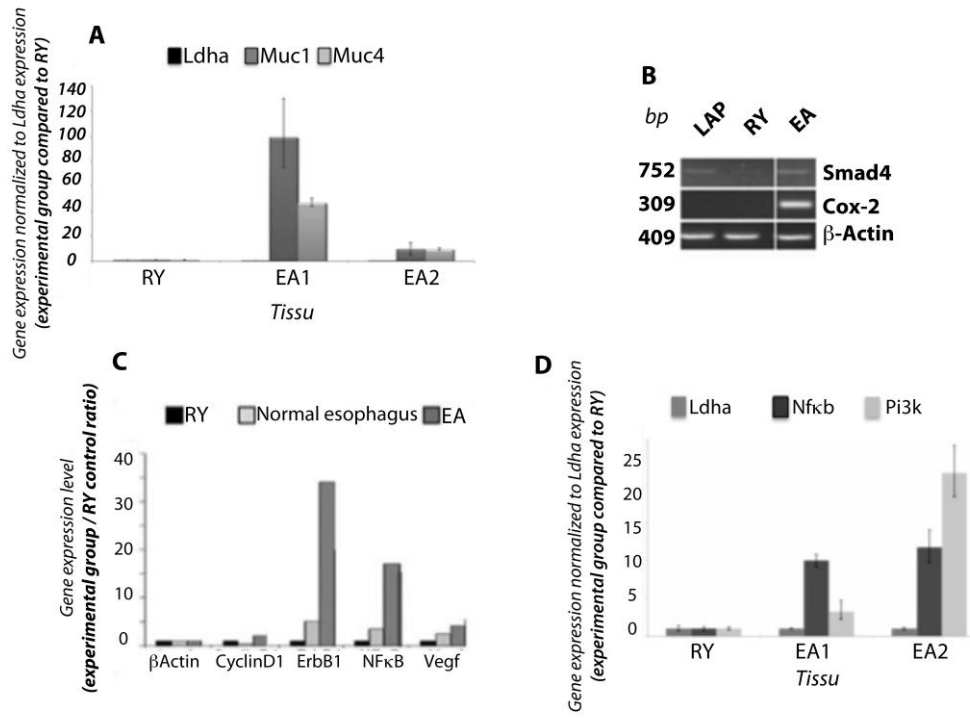


Figure 4:

A

<i>Gene</i>	<i>Description</i>	<i>GenBank</i>	<i>Fold expressed relative to control</i>
Ccnd1	Cyclin D1	NM_171992	1.84
Mcmd6	Mini chromosome maintenance deficient 6	U17565	1.59
Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_053819	2.15
Mmp3	Matrix metalloproteinase 3	NM_133523	2.16
Mmp7	Matrix metalloproteinase 7	NM_012864	1.93
Mmp9	Matrix metalloproteinase 9	NM_031055	2.50
Mmp10	Matrix metalloproteinase 10	NM_133514	1.85
Mmp13	Matrix metalloproteinase 13	XM_343345	2.46
S100a4	S100 calcium binding protein A4	NM_012618	2.05
Htatip2	Similar to HIV-1 tat interactive protein 2, homolog	XM_214927	3.19
Tp53	Tumor protein p53	NM_030989	0.63
Tsg101	Tumor susceptibility gene 101	NM_181628	0.55
Pten	Phosphatase and tensin homolog	NM_031606	0.52
Chek2	Protein kinase Chk2	NM_053677	0.55
Casp9	Caspase 9	NM_031632	0.53
Wnt1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1	XM_235639	<i>0.68</i>
Gsk3b	Glycogen synthase kinase 3 beta	NM_032080	<i>0.95</i>

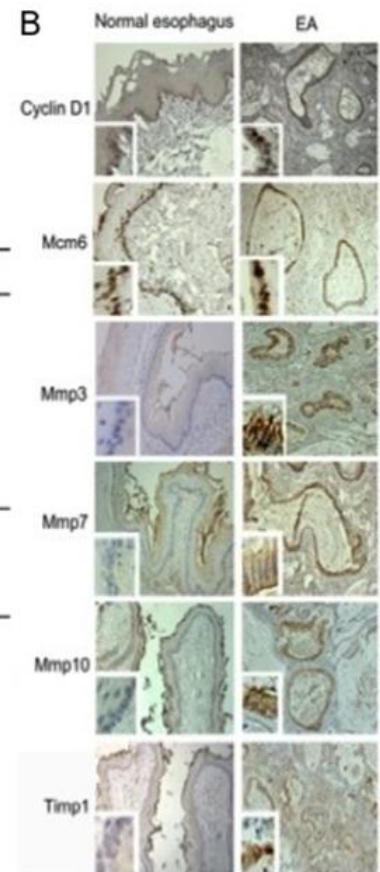
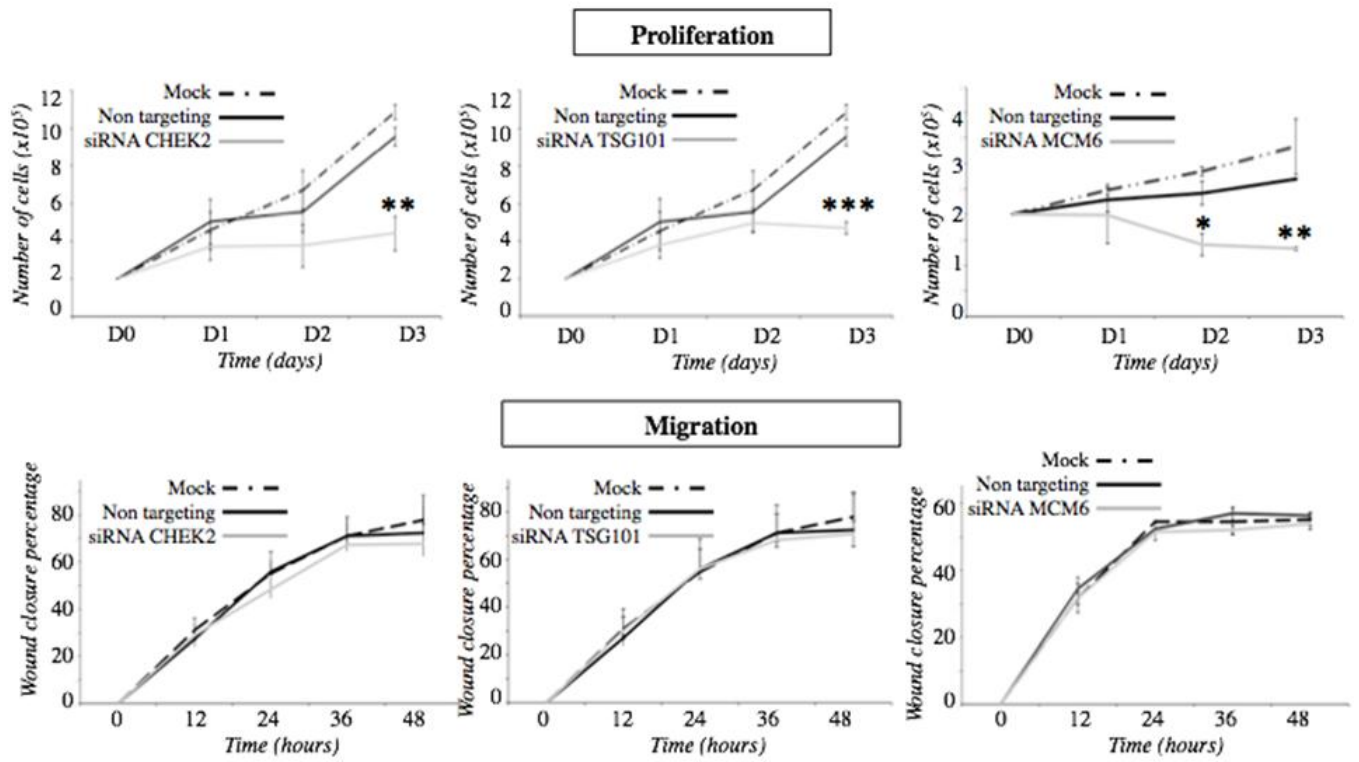


Figure 5:



Titles and legends to figures

Figure 1: Macroscopic aspect of surgical specimens, classified according the operation group and histological observation of the esophagus after surgery using Hematoxylin-Eosin Safran and Astra blue stainings.

The control groups with no reflux, (A) LAP and (B) RY groups, showed thin and not inflamed esophagus. In case of an induced reflux (C) DGER group: the esophagus are dilated and inflamed with sometimes the presence of a macroscopic tumor, always localized in the distal portion of esophagus submitted to the reflux. The histological observations showed (D) esophagitis (magnification x 200), (E) Esophageal adenocarcinoma with the presence of mucus lakes stained in blue (black arrow) (magnification x 200) compared to (D, insert) normal esophagus (magnification x 200), (F) **Surgical procedures and compositions of reflux for each group: DGER group:** duodeno-gastro-esophageal reflux group allows the induction of a mixed gastric and duodenal reflux at the distal portion of the esophagus ; **DER group:** duodeno-esophageal reflux induces a duodenal reflux only in the distal portion of the esophagus; **RY group:** Roux-en-Y group is the internal control; **LAP group:** laparotomy group is the external control: **DGR group:** duodeno-gastric reflux group is a control of DER group and **PPI group:** proton pump inhibitor group, allows inhibition of acidic component of the gastric reflux.

Figure 2: Histological analyses showing the presence of intestinal tissue in the esophagus submitted to a reflux.

A: IHC using an anti-MUC2 antibody, **B:** Lysozyme staining shows the presence of villi (arrows), **C:** IHC carried out with an anti-MUC4 antibody shows the presence of Brunner's glands (arrow), two histological characteristics of normal duodenal epithelium that are normally not present in human Barrett's esophagus lesions, suggesting that these lesions may be mechanically induced from duodenal mucosa through entrapment. This hypothesis was strengthened by the observation of typical aspects of entrapment characterized by a short

segment of Barrett's esophagus surrounded by squamous mucosa. **D**; IHC using an anti-MUC4 antibody. Magnifications: **A** x 200; **B** x 400; **C** and **D** x 100.

Figure 3: Gene expression in control squamous esophagus (RY and LAP groups) and in esophageal adenocarcinoma (EA).

(**A**) Up-regulation of *Muc1* and *Muc4* in EA compared to RY by qRT-PCR. Expression levels are normalized to *Ldha* and compared to the RY group. (**B**) Neo-expression of *Smad4* and *Cox-2* in EA compared to RY and LAP groups by RT-PCR. (**C**) Up-regulation of *cyclin D1*, *ErbB1*, *NF- κ B*, *Vegf* in EA compared to control groups using RT-PCR. The internal control used is the *β actin*. (**D**) Activation of *Pi3k* and *NF- κ b*, associated with the tumor progression, in esophagus submitted to a reflux by qRT-PCR. Expression levels are normalized to *Ldha* and compared to the RY control. (**E**) Proliferation and (**F**) migration assays on OE33 cells transfected with PI3K or NF- κ B siRNA. Controls are made by a transfection with a non-targeting (NT) siRNA or with the transfection agent alone (Mock). * correspond to a $p \leq 0.05$ and ** to a $p \leq 0.005$.

Figure 4: Expression of genes associated with tumorigenesis in esophagus submitted to reflux

(**A**) Expression of genes in esophagus submitted to reflux using microarrays. Average of five different rats showing EA lesions. (**B**) Expression of proteins (IHC) for which genes were up-regulated in microarrays studies. Normal squamous esophagus (x100); EA (x100); Insert (x200).

Figure 5: Proliferation and migration assays on OE33 cells transfected with MCM6, CHEK2 or TSG101 siRNA.

Controls are made by a transfection with a non-targeting (NT) siRNA or with the transfection agent alone (Mock). * correspond to a $p \leq 0.05$ and ** to a $p \leq 0.005$.

Table 1: Total number of rats analyzed: histological analysis of resected esophagus of rats, analyzed according to the treatment group.

Group	Experimental groups		Control groups			
	DGER group	DER group	DGR group	PPI group	RY group	LAP group
Reflux composition	Gastric Duodenal	Duodenal	Duodenal	Gastric non acid Duodenal	No reflux	No reflux
Number of rats	63	45	6	10	7	10
Histological results*						
- Esophagitis	63 (100%)	45 (100%)	6 (100%)	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
- BE	23 (36%)	21 (47%)	1 (16%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
- Dysplasia	7 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
- EA	8 (13%)	4 (9%)	1 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

DGER: Duodeno-Gastro-Esophageal reflux; DER: Duodeno-esophageal reflux; DGR: Duodeno-Gastric reflux; PPI: Proton Pump Inhibitor; RY: Roux-en-Y; LAP: Laparotomy; BE: Barrett's Esophagus; EA: Esophageal Adenocarcinoma.

*Some rats may exhibit concomitant steps of the carcinogenetic sequence

Table 2: Distribution of histological lesions according to the duration of reflux exposure in rats.

Time of exposure to reflux (in weeks)	21 to 30 weeks		30 to 50 weeks		50 to 83 weeks	
Reflux group	DGER group	DER group	DGER group	DER group	DGER group	DER group
Histological results						
-Esophagitis only	6 (50%)	2 (25%)	11(55%)	9 (64%)	15 (48%)	11 (48%)
-BE only	3 (25%)	5 (62%)	4 (20%)	4 (28%)	8 (26%)	11 (48%)
-Dysplasia or EA	3 (25%)	1 (13%)	5 (25%)	1 (8%)	8 (26%)	1 (4%)
Total	12(100%)	8 (100%)	20(100%)	14(100%)	31(100%)	23(100%)

BE: Barrett's Esophagus; EA: Esophageal Adenocarcinoma

Dans cette étude, 108 rats répartis en 2 groupes expérimentaux ont été analysés. Une œsophagite était présente dans 100% des cas dans les groupes expérimentaux. Néanmoins, la prévalence de l'OB, de la dysplasie et de l'AO était faible (41, 7 et 11%, respectivement). Les analyses histologiques et moléculaires suggéraient que l'OB survenait selon plusieurs mécanismes incluant la métaplasie intestinale *de novo* comme chez l'homme mais aussi la migration proximale de la muqueuse duodénale.

La majorité des tumeurs observées étaient de type adénocarcinomeux mais 39% d'entre elles étaient de type adénosquameux. Aucune métastase ganglionnaire ou solide n'a pu être identifiée.

Les principales caractéristiques moléculaires de l'OB (marqueurs intestinaux) et de l'AO (marqueurs de tumorigenèse) étaient similaires à ceux identifiés chez l'homme. Aucune corrélation n'a pu être faite entre la distribution des lésions histologiques et le temps d'exposition au reflux ($P > 0,20$).

La composante duodénale du reflux duodénal était associée à l'initiation des lésions (dysplasie et AE).

Dans ce travail, nous montrons que :

1. le modèle chirurgical d'anastomose œso-duodénale chez le rat permet le développement de lésions mimant la métaplasie et sa dégénérescence en dysplasie et AO avec des caractéristiques histologiques et moléculaires similaires par rapport à l'homme.

2. la composante duodénale du reflux joue un rôle significatif dans l'initiation de la séquence carcinogénétique alors que la composante gastrique associée au reflux duodénal favorise progression de la séquence carcinogénétique.

3. l'expression des mucines MUC1 et MUC4 est induite dans les lésions d'adénocarcinome de l'œsophage dans l'œsophage soumis artificiellement au reflux

4. les protéines TSG101, CHEK2 et MCM6 identifiées grâce au modèle, jouent un rôle sur les propriétés biologiques des cellules humaines d'AO dans un modèle *in vitro*.

Sur le plan pratique, l'utilisation de cette modélisation animale pour étudier la séquence carcinogénétique de l'AO se heurte aux limites suivantes:

- le mécanisme de survenue de la métaplasie intestinale qui semble différent de chez l'homme
- le développement de tumeurs adéno-squameuses dans 39% des cas alors qu'elles sont exceptionnelles chez l'homme
- le caractère non métastatique des lésions tumorales observées ne permettant pas l'étude de la dissémination à distance dans ce modèle
- le faible taux d'AO malgré une exposition prolongée de l'œsophage au reflux, qui associé à un taux élevé de mortalité post-opératoire pose des questions éthiques quant à l'utilisation de ce modèle
- l'absence d'impact de la durée d'exposition sur l'incidence de l'OB et de l'AO et donc la non prédictibilité de la survenue des lésions

En conclusion, malgré des différences physiopathologiques avec l'homme, le modèle de rat d'anastomose œso-duodénale reproduit les lésions histologiques et moléculaires de la séquence carcinogénétique et nous a permis d'identifier des protéines potentiellement associées au cancer et qui pourraient être de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'AO.

2.1.2 Chapitre II : Limites de l'article : Prévention de l'œsophage de Barrett et de l'adénocarcinome de l'œsophage par un inhibiteur de la voie Hedgehog dans un modèle de reflux gastro-oesophagien chez le rat

Dans cette lettre à l'éditeur, nous avons voulu souligner les limites du modèle de rat dans un article récemment paru dans *the Annals of Surgery* intitulé « Prevention of Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma by smoothed inhibitor in a rat model of gastroesophageal reflux disease » écrit par Gibson MK, Zaidi AH, Davison JM, Sanz AF, Hough B, Komatsu Y, Kosovec JE, Bhatt A, Malhotra U, Foxwell T, Rotoloni CL, Hoppo T, Jobe BA et dont les références de publication sont les suivantes : *Ann Surg.* 2013 Jul;258(1):82-8.

Gibson et al. ont étudié la prévention de l'apparition de l'OB et de l'AO dans un modèle de reflux induit chirurgicalement chez le rat par la réalisation d'une anastomose œso-jéjunale par l'administration d'un inhibiteur de la voie de signalisation Hedgehog (Gibson, Zaidi et al. 2013). Dans cet article, 94 rats Sprague Dawley ont été opérés avec réalisation d'une anastomose œso-jéjunale puis à 10 semaines ils ont été répartis en 2 groupes d'études. Dans le groupe traitement les rats recevaient du Bristol-Myers Squibb 839233, un inhibiteur de la voie Hedgehog à intervalles réguliers mélangée à la nourriture et alors que dans le groupe contrôle il n'y avait aucun additif. Les rats ont été sacrifiés après 28 semaines et une analyse histologique a été réalisée en aveugle par un anatomopathologiste. Une diminution de l'incidence des lésions considérées comme étant de l'OB et de l'AO ont été observée avec une diminution du risque relatif de 35,7%.

Il nous a paru opportun fort de notre expertise dans ce modèle de rat et de certaines limites de cette étude de réagir en envoyant cette lettre à l'éditeur qui a été acceptée pour publication en format électronique dans le revue *Annals of Surgery*.

Suitability of surgically-induced chronic reflux in rats for studying esophageal

Carcinogenesis

Caroline Gronnier^{1,2,3}, Guillaume Piessen^{1,2,3}, Emmanuelle Leteurtre^{2,3,4}, Isabelle Van Seuningen^{2,3}, Christophe Mariette^{1,2,3}

¹Department of Digestive and Oncological Surgery, University Hospital Claude Huriez, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Lille France, ²University of Lille - Nord de France, France, ³Inserm UMR 837, Jean Pierre Aubert Research Center, Team 5 “Mucins, epithelial differentiation and carcinogenesis, Lille, France, ⁴Centre de Biologie-Pathologie, Department of Pathology, Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Lille, France

Category: letter to the editor

Correspondence and requests for reprints should be sent to: Guillaume Piessen, MD, PhD -
Department of Digestive and Oncological surgery, University Hospital Claude Huriez -Place de
Verdun F-59037 Lille France Tel: +3320444407; Fax: +33320444385;

E-mail : guillaume.piessen@chru-lille.fr

Dear editor,

We read with great interest the article by Gibson MK et al.¹ recently published in *the Annals of Surgery*. Based on the results of a well-conducted experimental study in a rat model of gastroesophageal reflux disease, the authors demonstrate a decreased incidence of both Barrett's esophagus (BE) and esophageal adenocarcinoma (EAC) in animals treated with a smoothed (Smo) inhibitor aimed at blocking the hedgehog (Hh) pathway. We congratulate the authors for this publication. Some qualifications need to be made regarding the ethics and accuracy of this rat model and their results.

Firstly, we would like to comment on the high mortality rate before the scheduled termination of the present study. When combining the rats who died due to surgical and procedure-related complications prior to randomization (n=40) and the animals removed prior to the study endpoint procedure (n=24), the overall mortality rate in the study by Gibson et al¹ in which 134 rats were operated on amounts to 47.8%. Despite higher than the usually reported mortality rate of 10 to 20% in the literature^{2,3}, this rate is consistent with that reported by other authors.^{4,5,6} This high postoperative mortality rate, despite the well-known expertise of the surgical teams reporting these results, raises ethical concerns as well as concerns regarding the feasibility of the model.

Secondly, we agree with the authors that the surgical rat model has been shown to be the most promising in reproducing histological lesions of the human EAC carcinogenetic sequence. However, it remains a matter of debate whether histological examinations of lesions derived from the animal model are similar to the events of the human EAC carcinogenetic sequence.⁴

(i) As concerns the origin of BE lesions, whether the metaplasia in these model is *de novo*, originating from the esophageal glands, is derived by entrapment (stitching of duodenal mucosa

to the esophageal wall during surgery) or occurs by creeping substitution (proximal migration of duodenal cells through the anastomosis) remains unclear.^{4,5} Since the Hh signaling axis is activated in the jejunum,⁷ a determination of Indian Hedgehog mRNA expression in the jejunum compared with in BE lesions would have been of interest as a control even if only a formal lineage tracing would allow to definitively resolve the question of the origin of BE lesions in the rat model.

(ii) Whether the authors observed dysplasia during histological analysis would be interesting to know since it is a necessary step between BE and EAC.

(iii) Finally malignancy and EAC characteristics of tumors in the rat model have been repeatedly questioned in the literature.⁶ The well described absence of tumoral dissemination to regional lymph nodes or distant organs questions whether the induced tumors behave in a truly malignant manner, limiting the possibility of exploring the potential role of the Hh pathway in inhibiting metastatic growth. Whether the authors analyzed lymph nodes or distant organs was not mentioned in the manuscript by Gibson et al¹. To date, there has been one attempt to confirm the malignant character of these tumors by growing them *in vitro* and *in vivo* with a similar modified Levrat model.² Surprisingly, the histology of xenografts revealed well-differentiated squamous cell cancers whereas tumors were initially carcinomas with glandular differentiation questioning the accuracy of the model. Reports of adenosquamous and even pure squamous cell carcinomas have also been made without administration of any carcinogen.^{2,4,6} Whether the authors observed pure EAC or mixed adenosquamous tumors would also be interesting to know.

Thirdly, as underlined by the authors in the results section, all gastrointestinal hemorrhages leading to death occurred in the Smo inhibitor treatment group. It may be hypothesized that this may be due to the higher rate of esophagitis in this group, but this could

also be due to the Smo inhibitor. To confirm this hypothesis, an external control group of healthy animals would have been helpful. Are the authors aware of such complications in humans?

Fourthly, the observed risk reduction of BE and EAC in the treated group is not formally proved to be mediated through the Hh pathway by the authors. Despite the preliminary work described in the methods section dealing with impact of the Levrat procedure on the absorption of the Smo inhibitor, no proof of the efficiency of this treatment on the Hh pathway is given except a modest but significant downregulation of Ki-67 in immunohistochemistry. Study of the expression of downstream target genes of Smo would have been of great interest to clarify this point.

Fifthly, the gene expression study in animals that developed EAC is of interest but in order to investigate the role of Smo inhibitor treatment in tumors, the authors could have compared data from tumor samples obtained from the control group and not data from normal esophageal samples.

Finally, and conversely to what the authors state in the discussion section, this is not the first demonstration of prevention of EAC in an in vivo model since several authors have previously reported therapeutic interventions in a surgical rat model.^{3,8}

Acknowledgments: the authors thank Dr William B Robb for revision of the English language of this manuscript.

References:

1. Gibson MK, Zaidi AH, Davison JM, et al. Prevention of Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma by smoothed inhibitor in a rat model of gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg.* 2013;258:82-88.

2. Bonde P, Sui G, Dhara S, Wang J, et al. Cytogenetic characterization and gene expression profiling in the rat reflux-induced esophageal tumor model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133:763-769.
3. Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, et al. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 2002;122:1101-1112.
4. Buskens CJ, Hulscher JB, van Gulik TM, et al. Histopathologic evaluation of an animal model for Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the distal esophagus. *J Surg Res.* 2006;135:337-344.
5. Oh DS, DeMeester SR, Dunst CM, et al. Validation of a rodent model of Barrett's esophagus using quantitative gene expression profiling. *Surg Endosc.* 2009;23:1346-1352.
6. Gronnier C, Bruyère E, Piessen G, et al. Operatively induced chronic reflux in rats: A suitable model for studying esophageal carcinogenesis? *Surgery.* 2013 *in press*
7. Zacharias WJ, Madison BB, Kretoovich KE, et al. Hedgehog signaling controls homeostasis of adult intestinal smooth muscle. *Dev Biol.* 2011;355:152-62.
8. Nishijima K, Miwa K, Miyashita T, et al. Impact of the biliary diversion procedure on carcinogenesis in Barrett's esophagus surgically induced by duodeno-esophageal reflux in rats. *Ann Surg.* 2004;240:57-67.

2.1.3 Chapitre III : Mise au point d'un modèle de reflux chirurgicalement induit chez la souris

Outre les limites du modèle chirurgical abordées précédemment, la modélisation chez le rat se heurte au problème du nombre limité d'outils de recherche et notamment de l'absence de lignées transgéniques. Afin d'aller plus loin dans l'identification du rôle des différents gènes potentiellement impliqués dans la carcinogenèse oesophagienne (notamment des mucines MUC1 et MUC4 pour lesquelles des souris déficientes sont déficiente au sein de notre laboratoire) nous avons donc cherché à mettre au point un modèle de carcinogenèse induite chez la souris.

Dans un premier temps nous avons envisagé de transposer le modèle chirurgical que nous réalisions chez le rat à la souris. L'intervention a été réalisée chez 26 souris avec un taux de mortalité post-opératoire de 100% et une durée de survie maximale de 5 jours.

L'intervention était réalisée sous loupe binoculaire avec un grossissement entre x6 et x16, après une période de mise au point du protocole d'anesthésie, la mise au point de la technique chirurgicale a compris d'abord la réalisation d'une anastomose œso-duodénale telle que décrite chez le rat à points séparés au prolène 10/0, soit avec du fil très fin utilisé en microchirurgie. Nous avons été confrontés tout d'abord à des complications per-opératoires à type de déchirure de l'œsophage soit par les fils de traction utilisés pour l'exposition, soit au cours de confection de l'anastomose, puis à une mortalité post-opératoire précoce liée à une désunion anastomotique. Etant donné ces résultats, nous avons, dans un deuxième temps, opté pour la mise au point d'un modèle chirurgical de reflux chez la souris comprenant un geste chirurgical moins lourd afin d'améliorer sa faisabilité. Quatre groupes d'étude ont été mis au point (**cf appendice technique**) basés sur la physiopathologie du RGO qui implique pour rappel notamment un dysfonctionnement du sphincter inférieur de l'œsophage (SIO) (Hoshino, Sundaram et al. 2011), la perte de l'angle de His, et la présence d'une hernie hiatale :

- Groupe Myotomie extra-muqueuse : il s'agissait de la réalisation d'une cardiomyotomie extra-muqueuse avec pour objectif la suppression du rôle du SIO. Les avantages de ce modèle sont la

non réalisation de suture permettant de s'affranchir du risque de fistule, même si il existe un risque de perforation de la muqueuse oesophagienne et des phénomènes d'entrapement,

- Groupe Hernie hiatale : il s'agissait de positionner l'estomac de façon partielle en intrathoracique afin recréer les conditions d'une hernie hiatale,
- Groupe Fogarty: il s'agissait de dilacerer les fibres musculaires du SIO par dilatation à l'aide d'un ballonnet afin de neutraliser l'action du SIO sans léser la muqueuse,
- Groupe Fogarty + intussusception, la même procédure que dans le groupe Fogarty a été réalisée avec positionnement de la partie distale de l'œsophage dans l'estomac afin de l'exposer de façon plus efficace au reflux,
- Groupe laparotomie blanche : contrôle interne.

1. Effectifs: Au total, 71 souris ont été opérées, avec la répartition par groupes suivante :

- 18 pour le groupe myotomie extra-muqueuse,
- 6 pour le groupe avec hernie hiatale,
- 23 pour le groupe Fogarty seul,
- 20 pour le groupe Fogarty + intussusception,
- 4 pour le groupe laparotomie blanche,

2. Mortalité précoce :

1/ Groupe hernie hiatale : les 6 souris ont présenté un arrêt cardio-respiratoire lors de l'ouverture de l'orifice hiatal par libération des piliers du diaphragme. Cette stratégie a donc été abandonnée.

2/ Groupe Fogarty : Vingt-trois souris ont été opérées. Une souris a été sacrifiée en peropératoire du fait de la survenue d'une plaie œsophagienne. Une souris est décédée en peropératoire par surdosage en anesthésique. Quatre souris sont décédées à J1 sans cause retrouvée à l'autopsie.

Une souris est morte à J1 d'une éviscération. Quinze souris sont décédées dans les 5 premiers jours postopératoires. L'autopsie a permis de retrouver la présence d'une perforation œsophagienne ou d'un abcès au niveau de la jonction oeso-gastrique dans tous les cas. Une seule souris a survécu jusqu'à J12 et est décédée sans étiologie retrouvée à l'autopsie.

3/ Groupe Heller : Dix-huit souris ont été incluses dans ce groupe. Deux souris sont mortes à J1 sans cause retrouvée à l'autopsie. Douze souris sont mortes dans les 7 premiers jours postopératoires. Quatre souris ont survécu à J30. L'autopsie mettait en évidence dans 8 cas une perforation de l'œsophage. Aucune cause de décès n'était retrouvée dans les autres cas.

4/ Groupe Fogarty+Intussusception : Vingt souris ont été incluses dans ce groupe. Deux souris sont mortes en peropératoire. Deux souris sont mortes à J1, l'une d'une éviscération, et l'autre sans cause retrouvée à l'autopsie. Treize souris sont mortes dans les 7 premiers jours. Trois souris ont survécu jusqu'à J 25. La cause de décès était une perforation œsophagienne dans 10 cas, et non identifiées lors de l'autopsie dans les autres cas.

5/ Groupe 5 laparotomie blanche : Quatre souris ont été incluses. Toutes ont survécu.

Au total, étant donné, le taux de mortalité il n'a pas semblé éthique de poursuivre cette mise au point.

2.2 Partie II : Implication de la mucine MUC1 dans la régulation des propriétés biologiques de l'adénocarcinome de l'œsophage dans un modèle in vitro et in vivo

Article III:

The MUC1 membrane-bound mucin regulates esophageal adenocarcinoma cells biological properties

Caroline Gronnier*, Emilie Bruyère*, Nicolas Jonckheere, Mickael Perrais, Guillaume Piessen, Christophe Mariette and Isabelle van Seuningen

*both authors equally participated to this work

En rédaction, soumission prévue à Biochemical and Biophysical Research

Dans cette seconde partie du travail, nous avons entrepris, de poursuivre l'étude de l'influence des mucines membranaires sur les propriétés biologiques des cellules de l'AO. Nous avons montré dans des travaux précédents au sein de notre laboratoire que MUC4 jouait un rôle clé dans les propriétés de prolifération et de migration de cellules d'AO avec implication de la protéine S100A4 qui avait été identifiée dans le modèle animal chez le rat. (Bruyere, Jonckheere et al. 2011)

Fort de nos résultats précédents *in vitro* et *ex vivo* ((Mariette, Piessen et al. 2008) sur le rôle de MUC1 dans la régulation des acides biliaires dans l'AO et de la constatation d'une surexpression de MUC1 au cours de la séquence carcinogénétique chez les rat, nous avons voulu étudier le rôle de MUC1 sur les propriétés biologiques de cellules d'AO. Les résultats de ce travail font l'objet **de l'article III.**

The MUC1 membrane-bound mucin regulates esophageal adenocarcinoma cells biological properties

Caroline Gronnier ^{*1,2,3} , Emilie Bruyère ^{*1,2,3} , Nicolas Jonckheere^{1,2} , Mickael Perrais^{1,2} ,
Guillaume Piessen^{1,2,3} , Christophe Mariette^{1,2,3} and Isabelle van Seuning^{1,2}

¹Inserm, UMR837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Team 5 “Mucins, epithelial differentiation and carcinogenesis”, Lille, France.

²Université Lille-Nord de France, Lille, France.

³Department of Digestive and Oncological Surgery, University Hospital Claude Huriez, Lille, France.

*both authors equally contributed to the work

Corresponding author:

Isabelle Van Seuning, PhD

Inserm U837, Place de Verdun 59045 Lille cedex, France

Abstract:

MUC1 is a membrane-bound mucin known to participate in tumor proliferation. It has been shown that MUC1 pattern of expression is modified during esophageal carcinogenesis, with a progressive increase from metaplasia to adenocarcinoma. The principal cause of development of esophageal adenocarcinoma is gastro-oesophageal reflux and MUC1 was previously shown to be upregulated by several bile acids present in reflux. In this report, our aim was thus to determine whether MUC1 plays a role in biological properties of human esophageal cancer cells. For that, stable MUC1-deficient cancer cell lines (shMUC1 cells) were established using a shRNA approach. *In vitro* (proliferation, migration and invasion) and *in vivo* (tumor growth following subcutaneous xenografts in SCID mice) biological properties of shMUC1 cells were analyzed. Our results show that shMUC1 cells were less proliferative had decreased migration properties and invasion index and did not express MCM6 and TSG101 proteins when compared with MUC1 expressing cells. Subcutaneous xenografts showed a significant decrease in tumor size when cells did not express MUC1. Altogether, the data indicate that MUC1 plays a key role in proliferative, migrating and invasive properties of esophageal cancer cells as well as in tumor growth promotion. MUC1 mucin appears thus as a good therapeutic target to slow down esophageal tumor progression.

Introduction

Esophageal cancer is the 7th cause of death due to cancer worldwide and esophageal adenocarcinoma (EAC) incidence has been increasing importantly for the last 40 years (Ferlay, Parkin et al. 2010; Luketich, Pennathur et al. 2012). Whereas the use of a multimodal therapy with surgery more and less chemo- or radiotherapy to treat this cancer, the prognosis remains poor with 15 to 25 % of 5-year overall survival (Mariette, Piessen et al. 2011; Luketich, Pennathur et al. 2012). It is mainly due to a late diagnosis with advanced stage of the disease and resistance to schemes of chemotherapy and/or radiotherapy (Mariette, Piessen et al. 2011; Luketich, Pennathur et al. 2012).

Duodeno-gastro-oesophageal reflux responsible of chronic exposure of the distal esophagus has been demonstrated to have a major participation in EAC initiation (Kauer, Peters et al. 1997; Wild and Hardie 2003; Fein, Maroske et al. 2006). This exposure induces the initiation of early carcinogenetic lesion called Barrett esophagus (BE). BE is characterized by the replacement of a normal epithelium by an intestinal and/or gastric type metaplasia and by the increase of the mucus secreting cells, the goblet cells (Colleypriest, Ward et al. 2009). Under the effects of this chronic exposure to the reflux, BE lesions may evolve to low-grade then high-grade dysplasia and finally to EAC (Prach, MacDonald et al. 1997). We previously showed in a rat surgical model of induced gastro-duodenal reflux that the duodenal component of the reflux may play a significant role in initiating the carcinogenic sequence, whereas duodenogastric juice may play a significant role in progression to EAC (Gronnier, Bruyere et al. 2013).

In order to improve patient therapy and prognosis, there is an urgent need to better understand the molecular mechanisms and identify new actors involved during this carcinogenesis in order to further find new target for early diagnosis or new molecules that could be used as potential therapeutic targets.

The mucin MUC1 is a large membrane-bound large *O*-glycoproteins that is overexpressed in oesophageal adenocarcinoma (Piessen, Wacrenier et al. 2009; Jonckheere and Van Seuningen 2010); MUC1 is normally expressed at the apical membrane of polarized epithelial cells. Thanks to a specific region present in its long extracellular domain, MUC1 has have capacity to interact with oncogenic receptors and plays roles in signal transduction and modulate cellular biological properties (Jonckheere and Van Seuningen 2010; Jonckheere, Skrypek et al. 2013). In many epithelial cancers, MUC1 is overexpressed, circumferentially on the surface of cancer cell where it promotes tumor progression via its interaction with oncogenic receptors (Hollingsworth and Swanson 2004; Kufe 2009).

We have previously shown MUC1 is overexpressed in EAC and that MUC1 varies expression along the oesophageal adenocarcinoma carcinogenesis (Piessen, Wacrenier et al. 2009). MUC1 is expressed at a very low level in normal oesophageal epithelial cells. This altered pattern of expression of MUC1 associated to the fact that MBM are known to regulate cellular biological properties and participate to tumor progression and metastasis formation in numerous cancers (Hollingsworth and Swanson 2004; Jonckheere and Van Seuningen 2008; Kufe 2009) led us to hypothesize that MUC1 could also be an actor of EAC initiation and/or progression and appears to be a potential therapeutic target of the esophageal adenocarcinoma (Jonckheere and Van Seuningen 2008; Jonckheere and Van Seuningen 2010).

Having previously shown in a cellular model that deoxycholic acid, bile acids present in reflux, was a strong activator of MUC1 overexpression along the EAC carcinogenesis (Mariette, Piessen et al. 2008), we thus undertook to study the roles of MUC1 on the biological properties of human esophageal adenocarcinomatous cells.

Methods

Cell culture

The OE33 esophageal adenocarcinomatous cell line was cultured as described previously (Mariette, Perrais et al. 2004). To study the role of MUC1, a stable cell line deficient in MUC1 (shMUC1) was established following a retro-viral infection using a pRetroSuper plasmid (SABiosciences™) containing a sequence targeting MUC1 (s:GATCCCCGGTACCATCAATGTCCACG-TTCAAGAGA-CGTGGACATTGATGGTACC-TTTTTGGAAA; as: AGCTTTTCCAAAAA-GGTACCATCAATGTCCACG-TCTCTTGAA-CGTGGACATTGATGGTACC-GGG) , previously described elsewhere (Gendler , Mukherjee et al 2005). The control cells (Mock) were infected with the corresponding empty vector. All the results presented in this study correspond to the mean of two representative clones, shMUC1-1 and shMUC1-2 compared to two representatives control clones, Mock1 and Mock2.

Immunohistochemistry

MUC1 protein expression was studied on human normal esophageal tissues on human BE and esophageal EAC lesions as described in van der sluis et al (van der Sluis, Melis et al. 2004). The MUC1 monoclonal antibody (M8) used was a gracious gift from Pr Dallas Swallow (University College London). The dilution used was 1/50°. Negative controls were included using 1X D-PBS instead of primary antibody.

siRNA (Small Interfering) assays (NFKB, PI3K, MMP3 and MMP13)

OE33 cells were transfected with specific NFKB, PI3K, MMP3 and MMP13 siRNA (ON-TARGET plus SMART pool siNFKB2, ON-TARGET plus SMART pool siPI3KCG, ON-TARGET plus SMART pool siMMP3, ON-TARGET plus SMART pool siMMP13) purchased from Dharmacon (Epson, United Kingdom), following the protocol described previously ((Piessen, Jonckheere et al. 2007)). Controls were included using either a Non-Targeting siRNA (NT) or the transfection agent alone (Dharmafect 1, Dharmacon).

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA (1µg) was used to prepare cDNA using oligodT (1µL) and recombinant Retro-Transcriptase Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (1µL) (Promega, Charbonnières, France). PCR was performed on cDNA (5µL), using specific pairs of primers: 28S, PI3K (s: GAAGCCATTGAGAAGAAAGGA. As GAGGTGTTTCAGTATTATCAGAGC), NFκB (s: GAAGAAGCGAGACCTGGAG; as: TCCGGAACACAATGGCCAC) (MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). For each gene, analyses were made for at least three different times. 28S was used as an internal control. PCR products (20µL) were separated on a 1.5% (w/v) agarose gel containing ethidium bromide run in 1X Tris Borate EDTA. The gene of interest/28S ratio was calculated after scanning DNA bands with Gel Analyst-gel Smart software (Claravision, Orsay, France).

Protein extraction and expression

Total protein extraction and expression using Western-Blotting were realized as described in (Piessen, Jonckheere et al. 2007). Antibodies used were purchased from Sigma [Bactin (A-5441 at 1/5000e)], from Abcam [TSG101(ab83 at 1/500) and MCM6 (ab4458 at 1/2000)], Cell signalling [PI3K (4228 at 1/1000)] and from Santa Cruz Biotechnology [NFκB p65 (sc-7151X at 1/250e)] or were a gracious gift from Pr Dallas Swallow (University College London), [MUC 1 (M8 at 1/250e)]. Peroxydase-conjugated secondary antibodies (Pierce) were used and the chemoluminescence was visualized using a LAS4000 apparatus (Fujifilm). The gene of interest/Bactin ratio was calculated after scanning DNA bands with Gel Analyst-gel Smart software (Claravision, Orsay, France).

Proliferation

The capacity of the OE33 Mock and shMUC1 cells to proliferate was analysed by counting cells on a Malassez Chamber. 1.5×10^5 cells were plated in 6-well plates in triplicate and were counted every day during 6 days. Each experiment was carried out three times in triplicate.

Migration

2×10^5 cells were plated in 96-well plate in triplicate. At confluence, a wound was carried out using the 96-pin WoundMaker device (Essen Bioscience). The plate was then placed in an incubator into an Incucyte™ chamber apparatus (Essen Bioscience) at 5% CO₂ and 37°C. Every 2 hours a picture of the wounds was taken and the wound closure percentages were calculated every 12h, from 0 to 36h. Each experiment was carried out three times.

Invasion

The capacity of the cells to be invasive was studied using Boyden Chambers coated with Matrigel® (BD Bioscience). The cells that had the capacity to get through the matrix were counted 48h after the cells had been plated. The invasion index was calculated as recommended by the manufacturer (Invasion/Migration ratio). Each experiment was carried out three times in triplicate.

Subcutaneous xenografts

The role of MUC1 *in vivo* was studied by performing subcutaneous xenografts into SCID mice maintained in pathogen-free conditions. Injections were made with 150 µl of RPMI 1640 medium (Invitrogen) containing 4×10^6 cells and 150 µl of Matrigel® (BD 354262, BDBioscience). The tumor progression was followed weekly and the tumor volumes were calculated in cm³ (width/length). For each cell clone, 10 mice were injected. All procedures were in accordance with the guideline of animal care committee (Comité Ethique Expérimentation Animal Nord Pas-de-Calais, AF042008).

Immunohistochemistry

MUC1, TSG101 and MCM6 expression in human tissues with EAC was studied by automatic and manual immunohistochemistry (IHC), respectively. Manual IHC was performed as described in (van der Sluis, Melis et al. 2004) and automatic IHC with an automated immunostainer (ES, Ventana Medical System, Strasbourg, France) as described in (Mariette,

Perrais et al. 2004). Antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (MUC1, sc-13654 at 1/30e), from Santa Cruz Biotechnology (TSG101, M-19 at 1/100e and MCM6, sc-9843 at 1/100e). Positive controls were included by staining tissues known to express the protein of interest and negative controls were run with 1_ D-PBS instead of primary antibodies.

Statistics

The statistical analyses were carried out using both Excel and GraphPad 4.0 softwares (GraphPad softwares Inc., La Jolla, USA). The differences in the means of samples were analyzed using student t test or one way anova test with selected comparison using tukey post hoc test with differences less than 0.05 considered as statistically significant (*). ** indicate $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Results

MUC1 expression in human esophagus

To study whether the membrane-bound mucin MUC1 participates in the human esophageal adenocarcinoma development, we first considered its expression along the tumor progression using immunohistochemistry. MUC1 is expressed in some epithelial cells forming the superficial layer in the normal squamous esophageal epithelium. In BE, MUC1 is strongly expressed in the epithelial cells forming the intestinal metaplasia. MUC1 is also strongly expressed in the epithelial cells forming the EAC lesion.

Characterisation of the shMUC1 OE33 cells

To study the roles of MUC1 in the EAC tumor progression, we established a stable OE33 shMUC1 cell line using a shRNA approach (Figure 1A). The complete loss of MUC1 protein expression in the shMUC1 cells was confirmed by western-blotting when compared to the control cells (Mock).

Proliferation

The capacity of OE33 cells to proliferate in absence or presence of MUC1 was tested over a period of 6 days (Figure 1B). The results indicate that MUC1 deficient cells (shMUC1) significantly proliferate less than Mock cells as of day 4 ($p = 0.0158$) and this reduced proliferation is sustained till day 6 ($p = 0.0002$).

Migration and invasion

The role of MUC1 cell migration was studied using a wound-healing test (Figure 1C and 1D). We showed that in MUC1 deficient cells (shMUC1), the migration was impaired as of 12h ($p = 0.0179$) after the wound was made when compared to Mock cells. This was sustained until 36h ($p = 0.0025$).

MUC1 role in OE33 capacity to invade a matrix was studied using Boyden Chamber coated with Matrigel® (Figure 1D). The results indicate that MUC1 deficient cells are significantly less invasive compared to Mock cells ($p = 0.0137$), with a reduction of the invasion index of 31% compared to the controls.

Subcutaneous xenografts

Having shown that MUC1 deficient cells were less proliferative, less invasive and less migrating than Mock cells *in vitro*, we then undertook to study the role of MUC1 *in vivo* using subcutaneous xenografts in SCID mice (Figure 2). At 6 weeks post-injection, the shMUC1 tumors were much smaller (shMUC1-1: 0.57 ± 0.07 and shMUC1-2: $0.49 \pm 0.16 \text{ cm}^3$) than the Mock cell tumors ($1.76 \pm 0.07 \text{ cm}^3$) with a 68 % and 72% reduction respectively. This difference between the tumors volumes was highly significant between the Mock and the shMUC1-1 cells ($p < 0.01$) and extremely significant between the Mock and the shMUC1-2 cells ($p < 0.001$).

Link between MUC1 and NFkB and PI3K expression

In order to understand the mechanisms that could mediate MUC1 effect on biological properties of OE33 cells we decided to study molecular pathways previously described to be involved in EAC carcinogenesis. Therefore we decided to study the expression of NFkB and PI3kinase in

shMUC1 cells. We showed a tendency toward decreased expression for PI3K ($p=0.055$) and a significant decrease for NF κ B ($p=0.04$).

Their involvement in cell proliferation properties was confirmed using a siRNA approach. Significant decreased proliferation was observed significantly after 3 days after NF κ B siRNA treatment and after 2 days for siRNA PI3K treatment (Figure 5 C and D).

In order to decipher the mechanisms that could mediate MUC1 effects on OE33 cancer cells, we searched for tumor-associated proteins overexpressed in MUC1-expressing esophageal cancer. For that we performed a microarray study on esophageal tissues from rat which we surgically induced EAC (Gronnier, Bruyère surgery 2013 in press).

In both cases, we found overexpression of the Tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and of the minichromosome maintenance complex-6 gene (MCM6) in MUC1-expressing esophageal cancer (figure 6C). We thus studied expression at the protein level in shMUC1 compared to Mock cells and found that, in shMUC1, the TSG101 expression and the MCM6 expression strongly decreased compared to Mock cells. We previously demonstrated in Gronnier, Bruyère et al 2013, the role of TSG101 and MCM6 on OE33 cell properties using a siRNA approach. The results indicate that expression of TSG101 and MCM6 reduce significantly the capacity of OE33 cells to proliferate but not to migrate when compared to control cells.

Discussion

In this study, we showed that decreased expression of MUC1 in OE33 cells strongly impaired their *in vitro* proliferation, migration and invasion properties, *in vivo* SC tumors deficient for MUC1 were also smaller than those expressing MUC1.

The results confirm the fact that MUC1 is an oncoprotein involved in many epithelial cancers.

Our team focused its research on regulation of the MBM MUC1 and MUC4 mucins genes by bile acids in oesophageal carcinoma. Expression of this MBM is mostly increased from metaplasia to adenocarcinoma, suggesting a potential role 1) as a diagnostic marker of

carcinogenetic evolution and ii) degeneration of Barrett's oesophagus into adenocarcinoma. Elevated intragastric bile acid concentration has been observed in patients with BE (Gillen, McDermott et al. 1994; Jankowski, Harrison et al. 2000). Duodeno-oesophageal bile reflux has been identified as a predominant and sufficient carcinogen to induce oesophageal adenocarcinoma on BE rat model (Goldstein, Yang et al. 1997; Sato, Miwa et al. 2002; Gronnier, Bruyere et al. 2013). Deoxycholic acid was found to be a strong activator of MUC1 through PI3K signalling pathway (Mariette, Piessen et al. 2008).

Moreover, MUC1 has been shown to be involved in metastasis because of its role in tumour proliferation in pancreas cancer (Ho and Kim 1994), which is confirmed in our study. To go further, we showed that Tumor Susceptibility Gene 101 and Minichromosome Maintenance 6 expression decreased in shMUC1 cells suggesting a link between MUC1 and this protein. We confirmed that siRNA treatment leads to a decrease proliferation. TSG101 is involved in numerous cellular processes including, apoptotic resistance (Liu, Yang et al. 2011), G1/S Cell cycle checkpoint control (Carstens, Krempler et al. 2004). MCM6 is involved in cell cycle control (Frisa and Jacobberger 2010). This constataion could partly explain the role of MUC1 in cell proliferation.

On the other hand, MUC1 is also involved in metastasis due to its antiadhesive activity (van de Wiel-van Kemenade, Ligtenberg et al. 1993; Satoh, Hinoda et al. 2000) due to its binding properties to β -catenin and other family members (Ren, Li et al. 2002), involved in cell interaction and transcriptional regulation (Carraway, Ramsauer et al. 2003). MUC1 cytoplasmic tail has the ability to interact with fibroblast growth factor 3 (FGFR3) (Ren, Raina et al. 2006). This could explain the alteration of biological cells properties, migration and invasion.

In this report we show that the loss of MUC1 expression in OE33 cells strongly impairs their proliferative, invasive and migrating properties *in vitro* and their tumor growth *in vivo* and that these effects may be partly mediated by TSG101 and MCM6 protein.

Acknowledgments

We thank Pr Dallas Swallow (University College, London) for her gracious gift of the M8 MUC1 monoclonal antibody and Dr David Bernard (Inserm UMR1052/CNRS5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France) for his help in establishing the stable MUC1 deficient cells. We also thank Brigitte Hémon, Bérangère Barbot, Wassila Igoudgil Belinda Duchene for their technical help. This work was supported by grants from La Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM 2010, CM). Emilie Bruyère is the recipient of a PhD Fellowship from Le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille and Région Nord-Pas de Calais. Isabelle Van Seuningen is the recipient of a Contrat Hospitalier de Recherche Translationnelle/CHRT 2010, AVIESAN.

Figure legends

Figure 1. (A) Expression of MUC1 protein in Mock and in shMUC1 OE33 cells by Western-Blotting.

(B) Analysis of shMUC1 (grey line) and Mock (black line) cells proliferation *in vitro*. Countings were carried out with Malassez Chambers and were performed every day during 6 days. * corresponds to $p \leq 0.05$ and *** to $p \leq 0.001$ (student t test).

(C) shMUC1 and Mock OE33 cell migration was studied by wound-healing test. The photographs of the wounds closures were taken at 0h and 36h post-wounding.

(D) Representation of the wound closure in percentage from T0 to T36h. Comparison of the shMUC1 (grey line) to the Mock (black line) cells.

(E) Representation of the invasion index of the Mock (black) and the shMUC1 (grey) cells using Boyden Chambers coated with Matrigel®. The invasion index is the ratio corresponding to the number of invasive cells reported to the number of migrating cells. * corresponds to $p \leq 0.05$ (student t test).

Figure 2. Role of MUC1 analysed *in vivo* following subcutaneous xenografts in SCID mice. Means of tumor volumes in cm^3 obtained 6 weeks after injections of Mock or shMUC1 cells. ** corresponds to $p \leq 0.01$ and *** to $p \leq 0.001$ (one way anova with tukey post hoc).

Figure 3. (A) Expression of NFκB, PI3K and B-actin protein in Mock and in shMUC1 OE33 cells by Western-Blotting. (B) protein intensity in Western-blot reported to the Bactin expression * corresponds to $p \leq 0.05$ and ** to $p \leq 0.01$ (C) Loss of expression of NFκB and PI3K gene by RT-PCR after siRNA treatment (D) Analysis of OE33 cells proliferation *in vitro* after treatment with siRNA NFκB and PI3K. Counting were carried out with Malassez Chambers and were

performed every day during 6 days. * corresponds to $p \leq 0.05$ and ** to $p \leq 0.01$ (E) OE33 cells migration in vitro after treatment with siRNA NF κ B and PI3K was studied by wound-healing test. Representation of the wound closure in percentage from 0h to 48h. (F)

Figure 4. (A) Expression of TSG101, MCM6 and Bactin protein in Mock and in shMUC1 OE33 cells by Western-Blotting. (B) protein intensity in Western-blot reported to the Bactin expression * corresponds to $p \leq 0.05$ and *** to $p \leq 0.001$ (C) Immunohistochemical study realised with anti-MUC1, anti-TSG101, anti-MCM6 antibody on human tissue: normal oesophagus x100 , Barrett oesophagus x100, oesophageal adenocarcinoma x100, inserts x 200.

Figure 1.

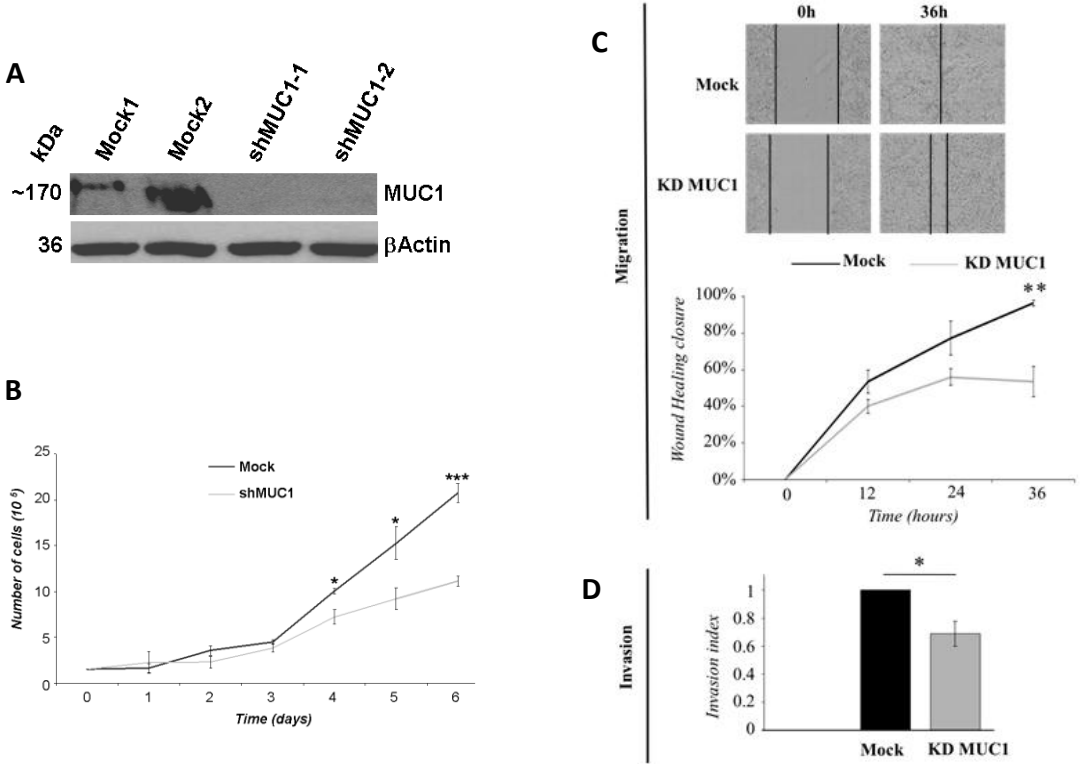


Figure 2.

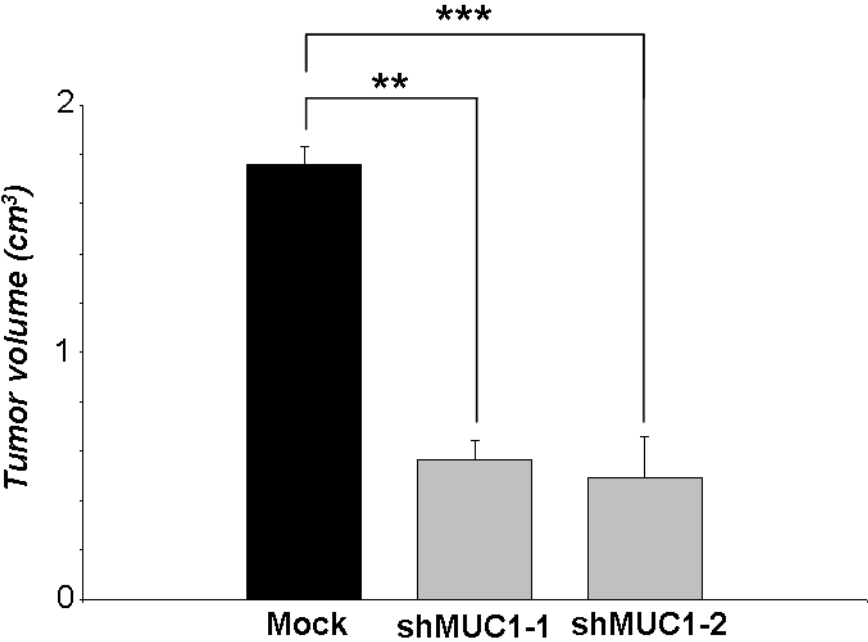


Figure 3

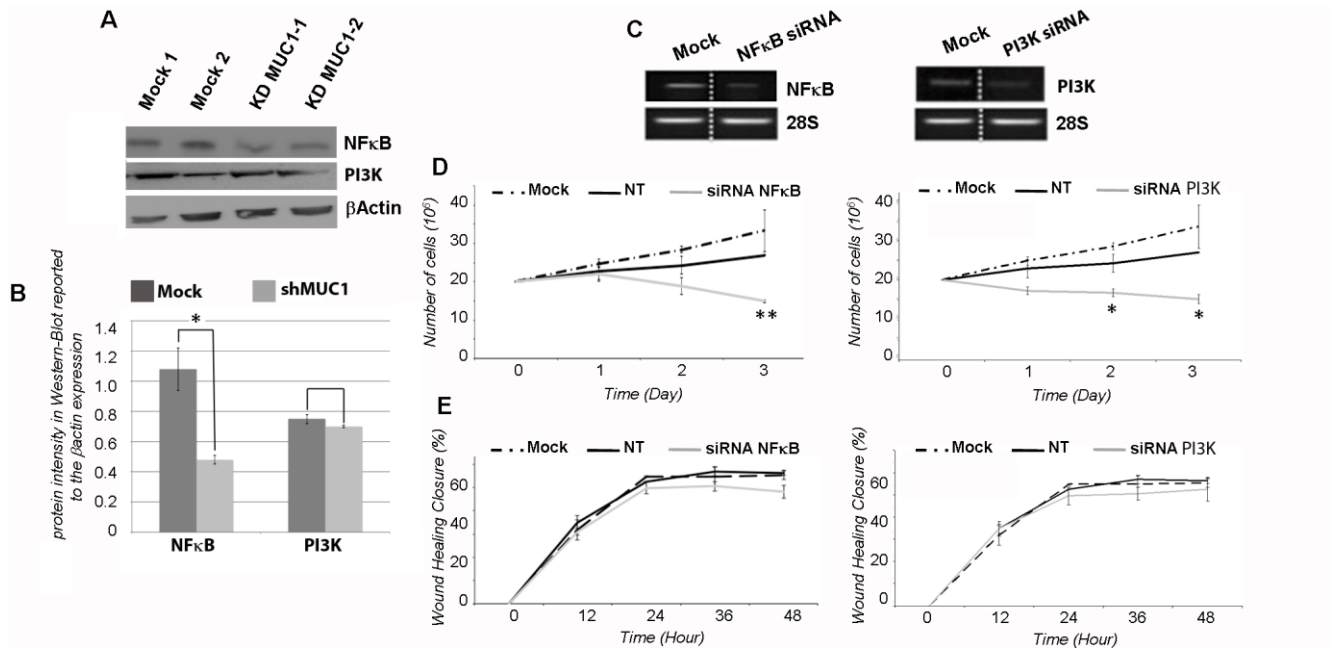
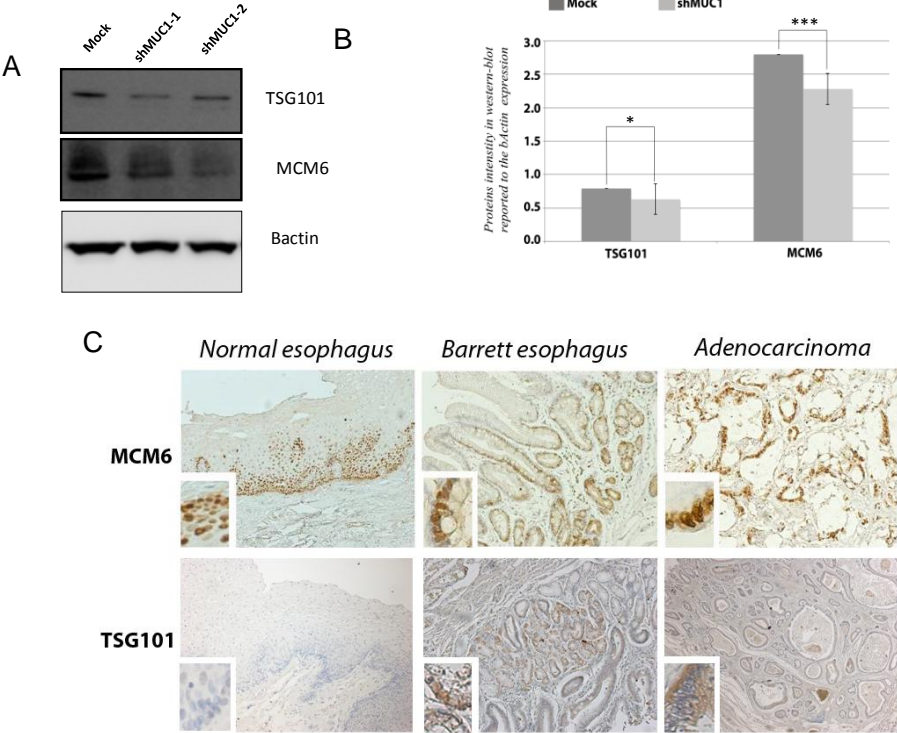


Figure 4.



Dans ce travail, nous montrons que :

1. la perte d'expression de MUC1 dans les cellules OE33 diminue fortement leurs propriétés de prolifération, de migration et d'invasion *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo*, suggérant un rôle majeur de MUC1 dans la tumorigenèse épithéliale
2. la perte d'expression de MUC1 dans les cellules OE33 est corrélée à une diminution de l'expression de NFκB et peut-être corrélé à l'altération des propriétés biologiques
3. la perte d'expression de MUC1 dans les cellules OE33 est corrélée à une diminution de TSG101 et MCM6.

3 DISCUSSION GENERALE

3.1 Partie I: Apports et limites du modèle chirurgical pour induire et étudier la carcinogenèse œsophagienne induit par le reflux

Nos objectifs à travers cette modélisation animale chez le rat étaient de :

1- préciser le rôle respectif des différentes composantes du reflux sur le déroulement de la séquence carcinogénétique de l'AO

2- identifier des marqueurs d'intérêt (gènes et protéines) associés à la progression des lésions dans la séquence carcinogénétique

3- établir une corrélation entre les niveaux d'expression de ces différents marqueurs et les anomalies observées au cours de la carcinogenèse œsophagienne

L'acidité gastrique a été longtemps considérée comme le principal facteur causal dans la survenue d'un OB et de sa dégénérescence en AO (Richter 2000). Cette vision a été remise en cause, devant la constatation de lésions de métaplasie et d'adénocarcinome, même en l'absence d'acidité gastrique (Tack, Koek et al. 2004). Le rôle des sels biliaires contenus dans le reflux duodénal dans le développement et la dégénérescence de l'OB est actuellement considérée comme majeur (Wild and Hardie 2003; Fein, Maroske et al. 2006).

Nos résultats ont confirmé que le reflux duodénal et duodéno-gastrique pouvait induire l'ensemble des éléments de la séquence carcinogénétique de manière différente. En cas de reflux duodénal, les lésions de métaplasie intestinales étaient plus fréquentes. Il a été précédemment montré que les acides biliaires étaient impliqués dans la prolifération des cellules à mucus (Tselepis, Morris et al. 2003). En cas de reflux duodéno-gastrique, la dégénérescence était plus fréquente suggérant un rôle de l'acidité dans la progression de la séquence carcinogénétique, rôle confirmé par l'effet antitumoral des inhibiteurs de la pompe à protons. L'acidité gastrique a été montré comme étant impliqué dans la survenue de mutations somatiques à l'origine de la cancérisation (Fitzgerald 2005). Nos résultats suggèrent donc, en accord avec de précédents

travaux (Koek, Sifrim et al. 2008) une action conjuguée, des différentes composantes du reflux, sur la carcinogénèse.

Nous avons été confrontés à différents écueils au cours de ce travail constituant des limites de ce modèle de rat:

- un taux de mortalité élevé de 53% : si dans la littérature la plupart équipes rapportent un taux de mortalité de 10 à 20 % (Pera, Brito et al. 2000; Buttar, Wang et al. 2002), d'autres travaux menés dans des équipes expérimentées rapportent en accord avec nos données un taux de mortalité oscillant entre 50 à 70 % (Miwa, Sahara et al. 1996; Buskens, Hulscher et al. 2006). Nous avons observé des décès à 2 moments ; en postopératoire immédiat en raison de complications postopératoires et plus tardivement après plusieurs semaines en raison d'une dénutrition, notamment dans le groupe gastrectomies.

-une incidence faible de lésions histologiques, rarement synchrones chez un même individu avec seulement 13% d'adénocarcinomes malgré une exposition prolongée au reflux allant jusqu'à 80 semaines. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats : (i) la technique de préparation de la pièce opératoire, qui emportait la moitié des tissus pour l'analyse moléculaire (voir Figure 8, ii) l'intrication ou la focalité des lésions qui a pu faire sous-estimer l'incidence des lésions de dysplasie, et (iii) le remplacement des zones de métaplasie ou de dysplasie par la tumeur, phénomène décrit chez l'homme. Dans la littérature, la réalisation d'une anastomose œso-jéjunale permet d'obtenir un taux de cancérisation plus élevé qu'en cas d'anastomose œso-duodénale (38-75% vs. 13-54%) (Miwa, Sahara et al. 1996; Oberg, Lord et al. 2000; Sato, Miwa et al. 2002; Kumagai, Mukaisho et al. 2003; Chen, Mukaisho et al. 2007; Szentpali, Szell et al. 2007). Ceci s'explique probablement par une exposition moins importante du bas œsophage au reflux en cas d'anastomose entre l'œsophage et le premier duodénum para rapport au jéjunum. Le choix d'une anastomose œso-duodénale était délibéré de notre part car permettant d'évaluer l'impact de la composante gastrique du reflux dans la

déroulement de la séquence carcinogénétique. Il a en effet été montré que la composante gastrique était tamponnée par la composante duodénale en cas d'anastomose œso-jéjunale (Fein, Fuchs et al. 2000).

- le développement de tumeurs adéno-squameuses. Ce type de tumeur, rarement observé chez l'homme est associé à des altérations moléculaires de ces deux types histologiques. Une des hypothèses avancées est l'agression des cellules souches épithéliales par les acides biliaries, amènerait à une accélération de leur différenciation, soit en cellules de phénotype caliciforme, soit en cellules de phénotype épithélial conduisant à l'activation des 2 voies distinctes de carcinogénèse dans le modèle:

- Le criblage à grande échelle par GEArray à la recherche de marqueurs prédictifs de cancer effectué dans le modèle a permis de mettre en évidence une surexpression de gènes spécifiquement impliqués dans l'initiation et la progression tumorale. Il a été également mis en évidence une surexpression des gènes de mucines Muc1 et Muc4 et l'implication de la voie PI3K/Akt. Nous n'avons pas mis en évidence de différence d'expression de ces gènes entre les lésions considérées comme précoce (métaplasie) et plus tardive (adénocarcinome). **La limite à apporter à cette constatation est que l'analyse porte sur une extraction d'ARN totaux sur la rondelle d'œsophage juxtaposée aux lésions observées en histologie. Le fait que nous n'ayons pas mis en évidence de différence d'expression significative pourrait s'expliquer par le bruit de fond résiduel lié à la technique de prélèvement.**

Par ailleurs, cette étude transcriptomique a été réalisée dans le but de caractériser le modèle de carcinogénèse chez le rat et d'identifier de potentiels nouveaux protagonistes de la progression de tumeurs œsophagiennes dans le modèle. Nous avons ensuite concentré notre attention sur 3 gènes : CHEK2, TSG101 et MCM6, non connus pour participer à la progression des tumeurs de l'œsophage mais connus pour avoir un rôle dans la tumorigenèse épithéliale.

Nous avons réalisé des études par small interference siRNA dans des cellules d'AO OE33 confirmant le potentiel de ces gènes comme acteurs de progression de l'AO. Une telle approche transcriptomique avait été décrite uniquement dans l'article de Bonde et al dans une lignée cellulaire de carcinome épidermoïde issue de tumeurs obtenues dans un modèle de rat d'anastomose œso-jéjunale (Bonde, Sui et al. 2007).

Il nous a semblé intéressant de mettre en lumière les limites que nous avons rencontrées dans notre modèle dans un article paru récemment dans *the Annals of Surgery* (Gibson, Zaidi et al. 2013) qui étudiait l'impact du traitement par un inhibiteur de la voie Hedgehog sur la carcinogenèse œsophagienne dans un modèle de reflux chez le rat par anastomose œso-jéjunale. En effet, dans notre expérience, parmi 285 rats opérés, nous avons observé un taux de mortalité global de 53% qui a diminué au cours de la période d'étude essentiellement grâce à une modification de l'alimentation post-opératoire comme cela a été bien décrit dans l'article de Gibson et al dans la section matériel et méthode. Nous pensons que la gestion péri-opératoire est d'une extrême importance dans ce modèle chirurgical chez le rat. D'autre part, dans notre série de 285 rats, aucun envahissement ganglionnaire ni métastase à distance n'a été identifié macroscopiquement ni microscopiquement. Ces résultats posent la question de la capacité de la tumeur à disséminer et limite donc les possibilités de l'exploration du rôle potentiel de la voie de signalisation Hh à inhiber la croissance métastatique.

Devant ces limites du modèle chez le rat, nous avons voulu le transposer chez la souris. Le but était d'avoir accès à un panel plus large d'outils moléculaires et notamment de pouvoir transposer le modèle chez des souris knock out pour l'étude du rôle de certains gènes dans le déroulement de la séquence carcinogénétique. Nous avons observé un taux de mortalité élevé en reproduisant le modèle chirurgical chez le rat qui nous a amené à tenter la mise au point d'un modèle moins complexe, sans succès. Dans la littérature, les articles rapportant les résultats d'une modélisation de la séquence de l'AO chez la souris sont peu nombreux en comparaison des

articles chez le rat. Les taux de mortalité post-opératoire rapportées sont compris entre 20 et 50% (Xu, LoCicero et al. 2000; Hao, Liu et al. 2009) ; De Mars Vet Parasitol 2011). Compte tenu des difficultés rencontrées dans notre expérience et par analogie au modèle chez le rat, on peut supposer qu'il existe un biais de publication. Aux vues de ces résultats préliminaires, il ne nous a pas semblé éthiquement acceptable de poursuivre cette mise au point.

3.2 Partie II : Implication de la mucine MUC1 dans la régulation des propriétés biologiques de l'adénocarcinome de l'œsophage dans un modèle *in vitro* et *in vivo*

Dans cette seconde partie du travail, nous avons voulu poursuivre les travaux menés dans notre laboratoire visant à étudier l'implication des mucines dans la carcinogénèse œsophagienne. En effet, d'importantes variations des mucines sécrétées (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) et des mucines membranaires ont été mises en évidence au cours de la séquence carcinogénétique de l'AO (Piessen, Wacrenier et al. 2009; Bruyere, Jonckheere et al. 2011).

Notre équipe a précédemment mis en évidence une régulation de l'expression de la mucine MUC1 et MUC4 par les acides biliaires dans une lignée humaine de cellules d'AO et dans un modèle *ex vivo* d'explants œsophagiens (Mariette, Perrais et al. 2004; Mariette, Piessen et al. 2008). Cette surexpression des mucines MUC1 et MUC4 a été confirmée dans notre modèle animal (**figure 3A article I**) dans la zone la plus exposée au reflux. Nous avons récemment démontré que l'inhibition de MUC4 par shARN dans une lignée stable entraînait une diminution de la prolifération et de la migration cellulaire *in vitro* et une perte de l'agressivité des cellules xéno greffes sous cutanées chez des souris SCID potentiellement via S100A4 qui est une protéine liant le calcium (Bruyere, Jonckheere et al. 2011) dont la surexpression avait également été mise en évidence dans notre modèle animal (**figure 4a article I**).

Il s'agissait dans **l'article III** d'étudier le rôle de MUC1 dans l'AO. L'inhibition de MUC1 par shARN dans une lignée stable entraînait une diminution de la prolifération et de la migration cellulaire *in vitro* et une perte de l'agressivité des cellules xéno greffées en sous cutanées chez des souris SCID. Nous avons également mis en évidence une diminution de l'expression de la protéine TSG101 dont le rôle a été montré dans le maintien de l'intégrité du génome et dont la surexpression a été mise en évidence dans des tumeurs du sein et de la thyroïde (Hsu SF 2012),

et de la protéine MCM6 dont le rôle a été montré dans le méningiome et dont l'expression était corrélé au grade tumoral (Gauchotte, Vigouroux et al. 2012) . La surexpression des ces marqueurs a également été détectée par l'analyse transcriptomique de notre modèle de rat (Figure 4 article I). Ces deux protéines constituent des axes de recherche intéressants quant à de potentiels biomarqueurs.

4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4.1 Conclusion

Au total, au cours de ce travail nous avons montré :

1. que le reflux duodéal jouait un rôle initiateur dans le déroulement de la séquence carcinogénétique, tandis que le reflux duodéno-gastrique favorisait la progression vers l'AO,
2. que la suppression de la composante acide du reflux par inhibiteurs de la pompe à proton permettait une diminution de l'initiation de la séquence carcinogénétique,
3. les limites de l'utilisation du modèle chirurgical de reflux par anastomose œso-duodénale dans l'étude de la carcinogenèse œsophagienne,
4. la sur-expression des protéines S100A4, CHEK2, TSG101 et MCM6 au cours de la carcinogenèse induite chirurgicalement par reflux chez le rat. L'inhibition par siARN dans une lignée cellulaire d'AO de S100A4 entraînait une diminution de la prolifération, suggérant un rôle important de cette protéine dans les AO,
5. que l'inhibition de la protéine MUC1 entraîne une diminution de la prolifération, la migration, l'invasion cellulaire *in vitro* et une diminution de la croissance tumorale *in vivo*.

4.2 Perspectives de recherche

Nos perspectives de recherche sont de :

1. poursuivre la caractérisation des protéines CHEK2, TSG101, S100A4 et MCM6 qui constituent des biomarqueurs ou des cibles thérapeutiques potentiels. Pour cela nous avons prévu d'établir des lignées stables déficientes et d'étudier leur rôle sur la croissance tumorale *in vivo* dans un modèle de xénogreffes sous-cutanées chez des souris SCID. Afin d'étudier leur rôle potentiel en tant que biomarqueurs, leur niveau d'expression sera évalué en immunohistochimie sur des pièces d'oesophagectomie de patients présentant les différents éléments de la séquence carcinogénétiques de l'AO avec corrélation aux données de récives et de survie. Le niveau de l'expression de ces marqueurs sur les biopsies réalisées lors de la surveillance endoscopique de l'OB sera corrélé au risque de dégénérescence afin d'évaluer leur potentiel rôle pronostic.
2. Dans le cadre du site de recherche intégré sur le cancer, nous allons créer une banque de tissu micro array (TMA) à partir d'une population de patients sélectionnés ayant eu une résection de l'œsophage avec ou sans traitement néoadjuvant. Ces TMA seront utilisés pour tester de potentiels biomarqueurs qui pourraient être identifiés.
3. Nous allons identifier des biomarqueurs associés au pronostic, à la chimiorésistance ou qui pourraient être ciblés par des médicaments dans une population de patients résecqués pour un adénocarcinome de l'œsophage. Une étude par puce pangénomique sera réalisée sur des échantillons de tumeur congelés. L'expression des gènes sera interprétée selon leur implication dans les caractéristiques tumorales (potentiel métastatique, interaction avec le microenvironnement, chimiorésistance, prolifération). Leur expression chez le patient sera étudiée en TMA puis leur rôle sur les propriétés biologiques des cellules tumorale sera étudiée *in vitro* et par xénogreffe chez la souris.
4. En collaboration avec le laboratoire GSK Big Pharma, nous allons évaluer le niveau d'expression d'antigènes spécifiques des tumeurs en particulier MAGE A3 et PRAME dans les

cancers potentiellement curable. L'objectif sera d'étudier la corrélation entre le niveau d'expression de ces marqueurs et des facteurs cliniques. Ceci pourrait éventuellement permettre le développement d'une vaccination anti-cancéreuse par le ciblage de cellules tumorales par stimulation du système immunitaire du patient.

Au total, l'objectif de ce travail est de permettre un diagnostic et donc une prise en charge plus précoce d'une part, et de proposer une approche médicale plus personnalisée via l'identification des facteurs de non réponse à la radiochimiothérapie et de nouvelles cibles thérapeutiques, ceci afin d'améliorer le pronostic extrêmement péjoratif de ce cancer dont l'incidence est croissante.`

5 APPENDICE TECHNIQUE

Modèle animal

Chez le rat

Expérimentation animale

Le protocole expérimental décrit ci-après, mené sous la direction scientifique du Pr Mariette (Habilitation à expérimenter sur les animaux au niveau I, autorisation n°59-350177), a été validé par la Direction Départementale des Services Vétérinaires du Nord et par le Comité Régional d'Éthique en matière d'Expérimentation Animale. L'expérimentation est effectuée dans le Département Hospitalo-universitaire de Recherche et d'Expérimentation (DHURE) de l'Université de Lille 2.

Période préopératoire

L'expérimentation animale est réalisée sur des rats Sprague-Dawley mâles âgés de six à huit semaines et pesant entre 350 et 400 g (Charles River). L'acclimatation en cages de six animaux dure deux semaines, à 55 % d'humidité et à 20 °C, avec des cycles alternatifs de lumière et d'obscurité de 12 h. L'alimentation consiste en une nourriture standard en bouchons (Rodent Maintenance, Harlan) et un accès à l'eau *ab libitum*. La veille de l'intervention, une diète solide est réalisée et l'eau est remplacée par du sérum glucosé à 10 % (v/v). Au total 285 rats ont été opérés.

Principe des interventions chirurgicales

Nous avons constitué 2 groupes principaux d'étude (**Figure 1 article 1**):

- **Groupe DGER**: réalisation d'une anastomose œso-duodénale sans gastrectomie, soumettant l'œsophage à un reflux duodéal (provenant du duodénum) et acide (provenant de l'estomac),

- **Groupe DER** : réalisation d'une anastomose œso-duodénale avec gastrectomie, soumettant l'œsophage à un reflux duodéal uniquement,

Et quatre groupes contrôles:

- **Groupe RY** : réalisation d'une anastomose œso-jéjunale sur une anse en Y, situation dans laquelle l'œsophage n'est soumis à aucun reflux (contrôle interne), ce groupe permet de contrôler les lésions dues à la l'inflammation consécutive à l'agression mécanique de l'intervention au niveau de l'œsophage
- **Groupe LAP** : réalisation d'une laparotomie seule (contrôle externe). Ce groupe permet de contrôler les lésions qui peuvent être dues à l'anesthésie ou au stress chirurgical en général.
- **Groupe DGR** : réalisation d'une gastrectomie partielle des 4/5, puis d'une anastomose gastroduodénale, dans le but de reproduire un reflux duodéno-œsophagien avec interposition de muqueuse gastrique entre le duodénum et l'œsophage. L'objectif était de prouver que les lésions de métaplasie mises en évidence dans les groupes DER et DGER, n'était pas dû à l'entrapment (greffe artificielle de muqueuse de type intestinal au niveau de l'œsophage lors de la confection de l'anastomose, due au passage de l'aiguille), ni au creeping (migration de proche en proche de la muqueuse intestinale). La persistance d'une muqueuse de type gastrique en aval d'une zone de lésion de métaplasie et en amont de l'anastomose permettrait de confirmer cette hypothèse.
- **Groupe PPI** : rats ayant subi la même procédure que dans le groupe DGER puis qui reçoivent de l'Esomeprazole (Astra-Zeneca, France), à la dose de 5µmol/kg, par gavage quotidien dès le premier jour post opératoire. Ce groupe a été entrepris afin de supprimer la composante acide du reflux gastrique induit chirurgicalement chez les rats du groupe DGER afin d'évaluer son rôle sur l'induction des lésions induites par le reflux.

Techniques chirurgicales

Une anesthésie générale était réalisée par injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg.kg⁻¹) et de xylazine (12 mg.kg⁻¹). L'abdomen était tondu et désinfecté avec de l'alcool à 70° et de la polyvidone-iodée. L'animal était installé en décubitus dorsal sur alaise en coton, recouvert par un champ opératoire stérile, sous lampe chauffante afin de minimiser les pertes thermiques. L'intervention respectait une asepsie rigoureuse. La voie d'abord était une laparotomie médiane. Après repérage de la jonction œso-gastrique, une ligature œsophagienne était réalisée (à l'exception du groupe DGR), juste en amont, avec du fil tressé, résorbable Vicryl® 2/0 en bobine.

L'œsophage était sectionné en prenant soin de sectionner d'abord la musculature œsophagienne puis de décaler la section de la muqueuse de 2 mm de façon distale, afin de faciliter l'anastomose qui peut être gênée par la rétraction de la muqueuse (plan solide de l'anastomose).

L'intervention différait ensuite en fonction des groupes :

Groupe DGER et PPI : Anastomose œso-duodénale sans gastrectomie

Une duodénotomie de 5 mm était pratiquée sur le versant antimésentérique. Puis une anastomose œso-duodénale, termino-latérale, par 8 points séparés de fil monofilament, non résorbable, Prolène® 7/0 était réalisée.

Groupe DER : anastomose œso-duodénale avec gastrectomie

Pour la gastrectomie totale, une ligature pas à pas des vaisseaux courts, de l'arcade gastro-épiploïque, puis du pédicule gastrique gauche était réalisées.

L'anastomose était identique à celle du groupe DGER.

Groupe RY : anse-en-Y

Pour la réalisation d'anse en Y, l'angle de Treitz était repéré, puis le jéjunum était sectionné à 1 cm en aval. L'anse était montée en pré-colique pour une anastomose œso-jéjunale, termino-latérale, avec 8 points séparés de Prolène® 7/0. Enfin une anastomose jéjuno-jéjunale au pied de

l'anse était pratiquée (5 cm au minimum après la section), de façon latéro-latérale par deux hémisurjets de Prolène® 7/0.

Groupe LAP : laparotomie seule (contrôle)

L'intervention comprenait une laparotomie médiane, le prélèvement du contenu duodénal par introduction d'une sonde urinaire pédiatrique charrière 6 après duodénotomie à 1 cm du pylore. La duodénotomie était fermée par des points séparés de Prolène 7/0.

Groupe DGR : anastomose gastroduodénale après gastrectomie partielle

La gastrectomie partielle débutait par la ligature vasculaire des vaisseaux courts et gastro-épiplœiques. Le pédicule gastrique gauche était préservé, pour la viabilité du tissu gastrique restant. Après la ligature duodénale, la ligne de section gastrique était délimitée au bistouri électrique (en raison de réseaux vasculaires denses), à 4 mm de la jonction œso-gastrique. La gastrectomie se terminait par la section duodénale ; la section gastrique était réalisée en dernier pour limiter la contamination. Une anastomose gastroduodénale termino-latérale était réalisée avec 10 points séparés de Prolène® 7/0.

Dans tous les cas l'intervention se terminait par un nettoyage de la cavité péritonéale et une compensation des pertes hydriques par du sérum physiologique (0,2 ml). La fermeture de la laparotomie se faisait en 2 plans par des surjets de monofilament, résorbable, Monocryl® 4/0.

Période postopératoire

Suite à la chirurgie, les animaux sont placés dans des cages individuelles sans sciure durant trois semaines. La boisson *ad libitum* est autorisée dès le réveil. Le premier biberon contient 200 ml d'eau associée à un antalgique (60 mg/kg/j de paracétamol). Dès le lendemain, et pendant trois semaines, les biberons sont remplis de sérum glucosé à 10 % (v/v) à visée antalgique et pour éviter l'hypoglycémie.

L'alimentation est ensuite reprise au deuxième jour postopératoire, par un régime mixé durant trois semaines, les bouchons standards étant broyés dans de l'eau. Le fait de mixer la nourriture

ainsi que d'ôter la sciure de la cage permet d'éviter la création de bézoard pouvant entraîner la mort de l'animal.

A trois semaines, les animaux sont placés dans des cages standard de six animaux, avec de la sciure. L'alimentation et la boisson sont reprises de manière habituelle. Dès le quinzième jour postopératoire, des injections de fer dextran (Cofafer®) en intramusculaire sont réalisées (50 mg/kg) et ceci de manière mensuelle afin de lutter contre l'anémie postopératoire et également en tant que cocarcinogène. Les rats opérés sont pesés deux fois par semaine pendant les deux premières semaines, puis de manière hebdomadaire jusqu'au deuxième mois postopératoire, et enfin de manière mensuelle.

Tous les animaux décédés avant la date de sacrifice prévue sont pesés puis autopsiés afin de déterminer la cause potentielle de leur décès.

Sacrifice

Les animaux opérés sont sacrifiés aux différents temps de 20, 30 et 50 semaines. Ces temps sont décrits dans la littérature comme étant, respectivement, les temps d'apparition des lésions métaplasiques, dysplasiques et adénocarcinomateuses.

Après les résultats d'une analyse intermédiaire, pour les 55 derniers rats opérés dans les groupes d'étude, les sacrifices ont été réalisés à 60,70 et 80 semaines afin de tester l'hypothèse qu'une exposition plus longue au reflux pourrait augmenter l'incidence de chaque élément de la séquence carcinogénétique.

Avant chaque sacrifice, les rats sont pesés puis anesthésiés selon le même protocole décrit pour la chirurgie. Leur abdomen est ensuite rasé puis une laparotomie est effectuée afin de permettre l'exploration de la cavité abdominale. L'anastomose est repérée et les organes sont inspectés dans le but de chercher des tumeurs visibles macroscopiquement. Le sacrifice se fait ensuite par une injection intracardiaque d'un euthanasique vétérinaire, le T61® (Curare, 0,3 ml/kg).

Une thoracotomie est alors pratiquée, puis l'œsophage est disséqué du pharynx jusqu'à l'anastomose ou jusqu'à la JOG dans le cas des témoins ayant subi une laparotomie seule.

Préparation technique de la pièce opératoire

La pièce opératoire ainsi obtenue est placée sur une compresse stérile puis découpée transversalement en tranches épaisses de 2 mm environ, de la portion distale vers la portion proximale **Figure 8**.

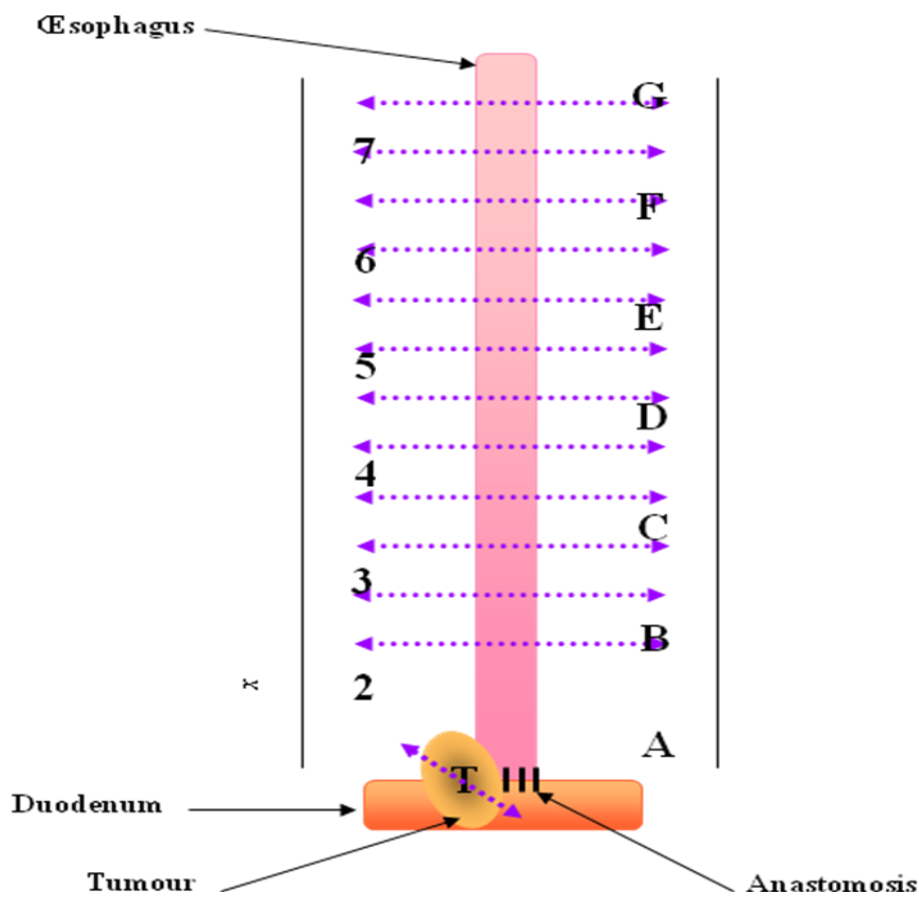


Figure 8 Schéma décrivant la préparation des pièces opératoires.

Les chiffres 2 à 8 correspondent aux pièces congelées en vue des analyses de biologie moléculaire, et les lettres A à H aux pièces fixées en paraformaldéhyde pour les analyses histologiques. Dans le cas d'un bourgeon tumoral macroscopique (T), celui-ci fait l'objet à la fois d'un prélèvement pour les analyses de biologie moléculaire et d'un prélèvement pour les études histologiques et immuno-histochimiques

Une tranche sur deux est placée dans du paraformaldéhyde (10 % v/v) dans le but d'être ensuite incluse en paraffine afin de réaliser des analyses histologiques et immunohistochimiques. La tranche en regard est placée dans un cryotube, congelée dans l'azote liquide puis stockée à -80°C jusqu'à utilisation pour réaliser des extractions d'ARN totaux. L'anastomose est systématiquement fixée en paraffine afin de réaliser une lecture histologique. Les coupes congelées destinées à l'étude d'expression génique à partir des ARN totaux ne comportent donc que du tissu oesophagien.

Lorsqu'un bourgeon tumoral macroscopiquement visible et de taille suffisante est observé, celui-ci fait l'objet à la fois d'un prélèvement fixé en paraffine et d'un prélèvement congelé dans l'azote liquide.

Analyse du liquide de reflux

Il s'agissait de vérifier des conditions physiopathologiques du reflux en étudiant le pH du liquide duodénal et la composition en acides biliaires.

Pour les rats des groupes DGER, DER et PPI, plusieurs méthodes de prélèvement ont été testées au cours de l'expérimentation :

La première consistait, lors du sacrifice de prélever le contenu duodénal par duodénotomie directe, mais le prélèvement était souillé par le saignement lors de l'entérotomie.

La seconde consistait en l'introduction d'un cathéter par l'œsophagotomie supérieure, jusqu'au duodénum dont la position était contrôlée par la laparotomie lors du sacrifice mais les quantités de liquide prélevées étaient très faibles.

La troisième méthode mise au point, après anesthésie générale par injection de kétamine (80 mg.kg⁻¹) et de xylazine (12 mg.kg⁻¹), a l'introduction d'une sonde urinaire n°6 par voie orale jusqu'au duodénum (repère sur la sonde fait lors d'une précédente laparotomie indiquant la position au niveau de l'anastomose). Cette méthode permettait une durée d'aspiration plus longue et de recueillir des quantités plus importantes de liquide.

Nous avons également réalisé le prélèvement du liquide intragastrique dans le groupe DGER (reflux acido-biliaire) par gastrotomie lors des sacrifices pour vérifier l'acidité intragastrique chez ces rats. En effet une lésion des nerfs vagues lors de la chirurgie pourrait la remettre en cause. Ceci attesterait indirectement d'un reflux acido-biliaire dans la mesure où des stigmates de reflux étaient mis en évidence dans l'ensemble des rats des groupe DGER et DER.

Pour les rats du groupe LAP (contrôle) : Une sonde urinaire n°6 reliée à une seringue de gavage était introduite dans la duodénotomie puis le contenu duodéal était prélevé par aspiration.

Mesure du pH

Le liquide prélevé était placé dans un microtube de 500 μ L. La mesure du pH était effectuée à l'aide d'une microélectrode reliée à un pH-mètre de paillasse Orion 2 star (Thermoscientific) immédiatement après le prélèvement. Le pH était corrigé en fonction de la température. Un volume de liquide d'au moins 200 μ L était nécessaire à la mesure.

Une mesure du pH intra-gastrique a été réalisée chez 10 rats sélectionnés au hasard parmi les groupes DGER, LAP et PPI par aspiration après gastrotomie comme décrit précédemment afin de vérifier la persistance (groupe DGER) ou la suppression (groupe PPI) de la sécrétion acide.

STATISTIQUES

Tests statistiques utilisés

Une analyse statistique a été réalisée, en fixant le risque de première espèce α à 5%. Les données qualitatives ont été étudiées avec : (i) le test binomial pour comparer les pourcentages à une fréquence théorique, et (ii) le test du Chi2 pour comparer les distributions. En cas d'effectifs insuffisants (effectifs théoriques inférieurs à 5), un (iii) test exact de Fisher à été employé. L'analyse des variables quantitatives a été réalisé par un test non paramétrique de Mann et Whitney dans la mesure où la normalité de la distribution des variables n'était pas vérifiée

(moins de 30 sujets par groupe). Cette analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 17.0

Calcul de l'effectif nécessaire

Le calcul de l'effectif nécessaire dans les 2 groupes d'intérêts (groupe DGER et groupe DER) considérait comme critère de jugement principal l'apparition d'au moins un élément de la séquence carcinogénétique (lésions de métaplasie, de dysplasie ou de cancer). L'hypothèse d'un pourcentage de 40% dans un groupe et de 75% dans l'autre groupe a été retenue pour le calcul. Le calcul du nombre de sujet nécessaire à analyser par groupe a donc pris en compte la comparaison de deux proportions binomiales de façon bilatérale, avec un risque alpha de 5% et une puissance de 80%. Ce nombre était de 45. Etant donné la mortalité spontanée atteignant 60% lors de l'analyse intermédiaire, le nombre a été porté à 120 rats par groupe.

Les autres groupes étaient considérés comme groupes contrôles, nous avons considéré que 3 rats étaient suffisants à la constitution du groupe LAP (laparotomie seule : contrôle externe). Concernant les groupes RY et groupe DGR, au moins 5 individus étaient nécessaires lors de l'analyse pour la réalisation de tests statistiques, compte tenu de la mortalité avant sacrifice, 14 rats ont été opérés dans chacun de ces groupes

Analyses histologiques

Inclusion de la pièce en paraffine

Les pièces destinées aux études histologiques obtenues à partir des œsophages disséqués sont rapidement immergées dans une solution de paraformaldéhyde 10 % (v/v). Ces tranches sont ensuite incluses en paraffine (Service d'histologie, Pr Defosse, Faculté de Médecine de Lille, Pôle Recherche). Les blocs d'inclusion sont enfin coupés à 5 µm d'épaisseur. Ces coupes sont étalées sur des lames silanées (SuperFrost® Plus, Menzel-Glaser).

Analyses histologiques

Afin d'analyser la morphologie des tissus, des colorations sont réalisées en immergeant les lames dans un mélange de colorants, le trichrome Hématoxyline-Eosine-Safran (HES), permettant de différencier les noyaux en bleu et le cytoplasme en rouge, ainsi que le Bleu Astra, colorant le mucus en bleu (Service d'anatomopathologie, Pr Copin, Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille).

Une fois les colorations réalisées, une analyse histologique des lames est réalisée en aveugle grâce au concours d'une anatomopathologiste experte en pathologie digestive membre de notre équipe, le Pr Leteurtre (Service d'anatomopathologie, Pr Copin, Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille et équipe 5 Inserm UMR837).

Immunohistochimie

Les études immunohistochimiques sont réalisées sur des lames obtenues à partir des blocs inclus en paraffine comme décrits dans la partie II.1.

Immunohistochimie manuelle

La réalisation d'un marquage immunohistochimique des lames obtenues à partir de blocs inclus en paraffine suit le protocole suivant :

-
- Immerger 2 x 5 min dans 2 bains successifs de xylène
 - Immerger 2 x 5 min dans 2 bains successifs d'éthanol absolu *Déparaffinage*
 - Immerger 1 x 5 min dans de l'éthanol à 95 % (v/v)
-
- Immerger 1 x 30 min dans de l'eau oxygénée à 3 % (v/v) *Désactivation des peroxydases endogènes*
 - Rincer 1 x 5 min dans du D-PBS1X
-
- Chauffer 20 min au four micro-ondes (700 W) dans du tampon citrate 1X (Dako) [dans le cas d'un marquage Muc1 de rat, le temps est de 10 min] *Destruction des liaisons moléculaires formées lors de la fixation des coupes de tissus dans le paraformaldéhyde puis l'éthanol 70 %, empêchant, ou diminuant, la reconnaissance anticorps-antigène*
 - Laisser refroidir les lames à température ambiante dans le bécher contenant le tampon citrate : au moins 30 min
-

- Placer les lames dans des portoirs (Coverslip)	<i>Permettre aux anticorps de pénétrer plus</i>
- Rincer 3 x 5 min dans du D-PBS1X	<i>facilement les membranes cellulaires</i>
- Recouvrir 30 min les lames de Triton® X100	
- Rincer 3 x 5 min dans du D-PBS1X	
- Incuber les lames avec 100 µl de la solution d'anticorps primaires diluée dans du D-PBS++ 1X : toute la nuit à 4 °C	<i>Reconnaissance antigène-anticorps</i>
- Composition du D-PBS1++ 1X : 1% de BSA fraction V, 0,1 % (p/v) de Triton® X 100, qsp 10 ml avec du D-PBS1X	
- Rincer 5 x 5 min dans du D-PBS1X	<i>Reconnaissance anticorps primaires-</i>
- Incuber 1 h avec 100 µl de la dilution d'anticorps secondaires biotinylés dans du D-PBS1X	<i>anticorps secondaires</i>
- Rincer 4 x 5 min dans du D-PBS1X	<i>Amplification du marquage avec l'anticorps</i>
- Incuber 1 h avec un complexe Avidine-Biotine « AB-PO » (Vectastain, ABC system, Vector Laboratory). Les complexes « AB-PO » sont réalisés 30 min avant leur utilisation en suivant le protocole du fournisseur	<i>secondaire biotinylé</i>
- Rincer 6 x 5 min dans du D-PBS1X	
- Incuber avec la 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) préparée une heure avant utilisation comme indiqué dans le protocole du fournisseur	<i>Révélation</i>
- Réaliser l'incubation dans l'obscurité afin d'éviter un bruit de fond, et pas plus de 20 min afin d'éviter les faux-positifs	
- Suivre le marquage en direct au microscope	
- Pour un même anticorps le temps d'incubation à la DAB sera le même pour toutes les coupes afin de pouvoir les	

comparer entre elles

- Arrêter la réaction par immersion dans de l'eau déminéralisée au moins 5 min

- Tremper 3 x 1 s dans de l'Hématoxyline non diluée (Sigma- Aldrich) *Contre-coloration*

- Rincer sous l'eau courante

- Immerger 1 x 5 min dans de l'éthanol à 95 % (v/v) *Déshydratation*

- Immerger 2 x 5 min dans 2 bains successifs d'éthanol absolu

- Immerger 2 x 5 min dans 2 bains successifs de xylène

- Protéger les lames avec une lamelle de verre fixée avec un produit de montage Pertex (Mounting medium for light microscopy, Histolab) *Montage des lames*

Toutes les manipulations sont réalisées en ajoutant un témoin positif de l'anticorps étudié, c'est-à-dire une lame comprenant une coupe d'un tissu connu pour exprimer la protéine étudiée. Ceci permet de vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé ainsi que les bonnes conditions d'utilisation de celui-ci.

Afin de contrôler la spécificité de reconnaissance des anticorps secondaires utilisés, des témoins négatifs sont également réalisés. Dans ce cas, les lames subissent les mêmes traitements que les autres excepté qu'elles ne sont pas incubées avec un anticorps primaires mais avec 100 µl de D-PBS++1X uniquement.

Les différentes conditions d'utilisation des anticorps primaires utilisés en immunohistochimie manuelle sont décrites dans le tableau I.

Tableau I: Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie manuelle chez le rat.

Antigène	Source	Concentration de l'anticorps primaire	Anticorps secondaire	Concentration de l'anticorps secondaire
Muc1	sc-6827 (Chèvre) Santa Cruz Biotechnology	1/50	Anti IgG de chèvre biotinylés, Vector Laboratory	1/2000
Cyclin D1	Cyclin D1 2926 (Souris) Cell Signaling	1/50	Anti-IgG de souris biotinylés, Vector Laboratory	1/1000
MCM6	sc-9845 (Chèvre) Santa Cruz Biotechnology	1/100	Anti IgG de chèvre biotinylés, Vector Laboratory	1/2000
Mmp3	sc-31074 (Chèvre) Santa Cruz Biotechnology	1/100	Anti IgG de chèvre biotinylés, Vector Laboratory	1/2000
Mmp7	sc-8832 (chèvre) Santa Cruz Biotechnology	1/50	Anti IgG de chèvre biotinylés, Vector Laboratory	1/2000
Mmp10	sc-6842 (chèvre) Santa Cruz Biotechnology	1/200	Anti IgG de chèvre biotinylés, Vector Laboratory	1/2000
Timp1	sc-6834 (chèvre) Santa Cruz Biotechnology	1/100	Anti IgG de chèvre biotinylés, Vector Laboratory	1/2000

Immunohistochimie automatique

Les lames obtenues à partir de blocs de tissus inclus en paraffine sont déparaffinées et plongées dans le tampon citrate comme décrit dans le chapitre précédent. A partir de ce moment de la manipulation, le marquage est réalisé à l'aide d'un automate Ventana (ES, Ventana Medical System) sur le principe de la formation du complexe streptavidine-biotine. Le volume de la dilution d'anticorps primaire (100µL) est ajouté manuellement. L'automate va ensuite réaliser les différentes incubations avec les anticorps secondaires, la streptavidine-biotine, la DAB et enfin l'hématoxyline pour la contre-coloration. Les lames sont ensuite déshydratées et les lamelles montées comme dans le chapitre précédent.

Des témoins positifs et négatifs sont également inclus dans les séries.

Les différentes conditions d'utilisation des anticorps primaires utilisés en immunohistochimie automatique sont décrites dans le tableau II

Tableau II: Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie automatique chez le rat

Antigène	Source	concentration
Muc2	Sc-15334(souris) Santa cruz biotechnology	1/1000
Muc4	Sc-13654 (souris) Santa cruz biotechnology	1/30

Immunohistochimie sur tissus humains

Afin de vérifier si certaines des protéines exprimées dans notre modèle animal le sont également chez l'homme, des immunohistochimies sont réalisées sur des coupes de tissus humains. Les conditions de réalisation sont résumées dans le tableau III.

Tableau III: Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie automatique chez l'homme:

Antigène	Source	Type	Concentration de l'anticorps primaire	Concentration de l'anticorps secondaire
MUC1	M8(lapin) Don gracieux du Pr Dallas Swallow	automatique	1/50	200µg/mL
MUC2	Sc-15334 (souris) santa cruz biotechnology	automatique	1/500	200µg/mL
MUC4	Sc-53945 (souris) santa cruz biotechnology	automatique	1/100	200µg/mL
S100A4	Ab-41532 (lapin) abcam	manuelle	1/100	1/1000
MCM6	Sc-9843 (chèvre) santa cruz biotechnology	manuelle	1/100	1/2000
TSG101	AB-83 (souris) abcam	manuelle	1/500	1/1000

Extraction des ARN totaux à partir de tissus

Les ARN totaux sont extraits à partir des pièces opératoires congelées dans l'azote liquide grâce au kit *Total RNA Isolation*, NucleoSpin® RNA L (Macherey-Nagel), le protocole utilisé étant le suivant :

- Découper le plus petit possible le tissu (maximum 100 mg) à l'aide d'un scalpel dans une boîte de pétri contenant 1,8 ml de tampon de lyse RA1 et 18 µl de β-mercaptoéthanol.

- Laisser le tissu découper dans le mélange RA1 et B-mercaptoéthanol puis le broyer à l'aide d'un Potter Elvejem. Faire attention à ne pas trop chauffer le tissu par de longs temps de broyage afin de préserver la qualité des ARN.
- Appliquer le broyat sur une colonne Nucleospin® Filter L. - Centrifuger 10 min à 4 500 x g.
- Jeter le filtre et ajouter 1,8 ml d'éthanol 70 % (v/v) au lysat puis vortexer 2 x 5 s.
- Appliquer le mélange sur une colonne NucleoSpin® RNA L.
- Centrifuger 3 min à 4 500 x g.
- Ajouter 2,2 ml de tampon de lavage MDB sur la colonne.
- Centrifuger 3 min à 4 500 x g puis jeter l'éluât.
- Préparer le mélange de rDNase : par échantillon mélanger 235 µl de tampon et 25 µl de rDNase reconstituée.
- Appliquer 250 µl du mélange de rDNase au centre du filtre.
- Incuber à température ambiante pendant 15 min.
- Ajouter 2,6 ml de tampon RA2 sur la colonne afin de désactiver la rDNase.
- Incuber à température ambiante pendant 2 min.
- Centrifuger 3 min à 4 500 x g puis jeter l'éluât.
- Ajouter 2,6 ml de tampon RA3 sur la colonne.
- Centrifuger 3 min à 4 500 x g et jeter l'éluât.
- Ajouter 2,6 ml de tampon RA3 sur la colonne.
- Centrifuger 5 min à 4 500 x g.
- Placer la colonne sur un tube collecteur neuf de 15 ml.
- Centrifuger 1 min à 4 500 x g.
- Placer la colonne sur un tube *d'éluition* neuf de 15 ml.
- Appliquer 500 µl d'eau stérile (« RNase-free » du kit) directement au centre du filtre.
- Incuber à température ambiante pendant 2 min.

- Centrifuger 3 min à 4 500 x g.
- Récupérer l'éluat dans un microtube de 1,5 ml.
- Conserver les ARN à -80 °C jusqu'à utilisation.

La quantité ainsi que la qualité de ces ARN sont contrôlées à la fois par la mesure de l'absorbance des échantillons à une longueur d'onde de 260 nm avec un NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) et également par la migration électrophorétique de 0,5 à 1 µg d'ARN totaux en gel d'électrophorèse d'agarose 1 % (p/v) dans un tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) (Tris 45 mM ; Acide borique 45 mM ; EDTA Na₂ 2,5 mM) 1X en présence de bromure d'éthidium (BET) (10 µg/ml). Cette migration nous permet d'observer deux bandes correspondantes aux ARN ribosomiaux 18S et 28S ; le rapport 28S/18S de l'intensité de ces bandes devant être de l'ordre de 2.

Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Synthèse de l'ADN complémentaire

La transcription inverse est effectuée en travaillant sur glace.

Pour chaque échantillon, mélanger :

- 1 µg d'ARN
- 1 µl d'Oligo(dT) (Promega, 500 µg/ml)
- qsp 14 µl avec de l'eau stérile
- Incuber les tubes à 70°C pendant 5 min dans un bain-marie, puis refroidir rapidement sur la glace.
- Ajouter 25 µl du mélange suivant dans chaque tube :
- 14 µl d'eau stérile
- 5 µl de tampon M-MLV RT-5X (Promega)
- 5 µl de dNTPs, sels de lithium (Eurogentec)
- 1 µl de Transcriptase inverse (Promega, 200 U/µl)

- Incuber 1 h à 42 °C puis 5 min à 94 °C dans un bain-marie.
- Ajouter 60 µl d'eau stérile à l'ADN complémentaire synthétisé afin d'obtenir un volume final de 100 µl.
- Garder l'ADN complémentaire à -80 °C jusqu'à utilisation.

Amplification

La préparation de l'amplification est effectuée sur glace.

- Préparer un mélange réactionnel pour tous les échantillons comme décrit ci-dessous :
- 13,5 µl d'eau stérile
- 2,5 µl de tampon MgCl₂10X (Promega)
- 1 µl de dNTPs (Eurogentec)
- 1 µl d'amorces sens diluées à 5 pmol/µl (MWG ou Eurogentec)
- 1 µl d'amorces anti-sens à 5 pmol/µl (MWG ou Eurogentec)
- 1 µl de Taq polymerase (Promega)
- 5 µl d'ADN complémentaire
- L'amplification est réalisée dans un thermocycleur BioRad CFX96 en suivant les cycles suivants :

1 cycle	n cycles			1 cycle	∞
94 °C	94 °C	T _m °C	72 °C	72 °C	8 °C
2 min	45 s	1 min	1 min	10 min	

Les séquences des différentes amorces utilisées ainsi que leurs conditions d'utilisation sont décrites dans le tableau IV. Le contrôle interne utilisé est la *β-actine* de rat.

Tableau IV: Séquences des oligonucléotides utilisés en RT-PCR chez le rat.

Nom du Gène	Séquence des amorces (5'→3')	Taille de l'amplicon (pb)	Nombre de cycles	Température d'hybridation (°C)
<i>B-actine</i>	s : ATATCGCTGCGCTCGTCGTCGACAA as : AACACAGCCTGGATGGCTACGTACAT	409	35	60
<i>Muc1</i>	s : TCGACAGGCAATGGCAGTAG as : TCTGAGAGCCACCACTACCC	286	35	60
<i>Muc2</i>	s : CAGAGTGCATCAGTGGCTGT as : CCCGTCTGAAGGTGATGTAGT	241	30	59
<i>Muc4</i>	s : AAGTATGCTGGAGGAGTACTT as : AACTTGTTTCATGGAGCAGCCGC	324	35	54
<i>Cyclin D1</i>	s : TGACTGCCGAGAAGTTGTG as : GAGGGTGGGTTGGAAATG	299	30	56
<i>ErbB1</i>	s : AGTGGTCCTTGCAAACCTGG as : GTTGACATCCATCTGGTACG	664	35	57
<i>Vegf</i>	s : ACGAAAGCGCAAGAAATCCC as : TTAACTCAAGCTGCCTCGCC	155	35	57
<i>Cox2</i>	s : AGTATCAGAACCGCATTGCC as : TAAGGTTTCAGGGAGAAGCG	334	35	57
<i>Nfkb</i>	s : GAAGAAGCGAGACCTGGAG as : TCCGGAACACAATGGCCAC	398	35	58
<i>Smad4</i>	s : CATTCTGTGGCTTCCACAA as : GACTGATGGCTGGAGCTATT	752	35	57

Migration en gel d'agarose

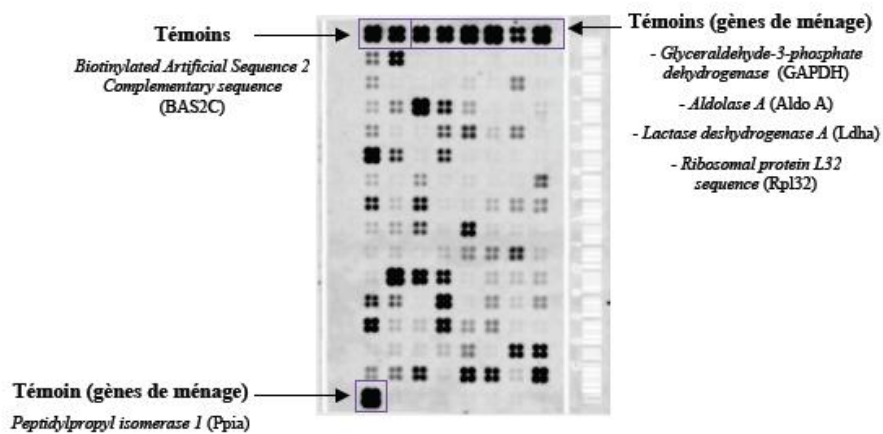
- Mélanger 20 µl d'amplicons à 4 µl de tampon de charge.
- Déposer 20 µl de ce mélange sur un gel d'agarose à 1,5 % (p/v) contenant du BET dans un tampon TBE 1X.
- Faire migrer : le temps de la migration dépend de la taille des amplicons déposés.
- Révéler le gel après migration sur une plaque à UV.
- Le ratio *gène d'intérêt/B-actine* est calculé après avoir scanné les bandes obtenues grâce au logiciel GelAnalyst-GelSmart (ClaraVision).

Oligo-GEArray®

Les puces Oligo-GEArray® (SABioscience) sont constituées d'une membrane de nylon de 2,5 x 3,8 cm placée dans un tube d'hybridation HybTub. Chaque membrane comprend un code-bar unique d'identification.

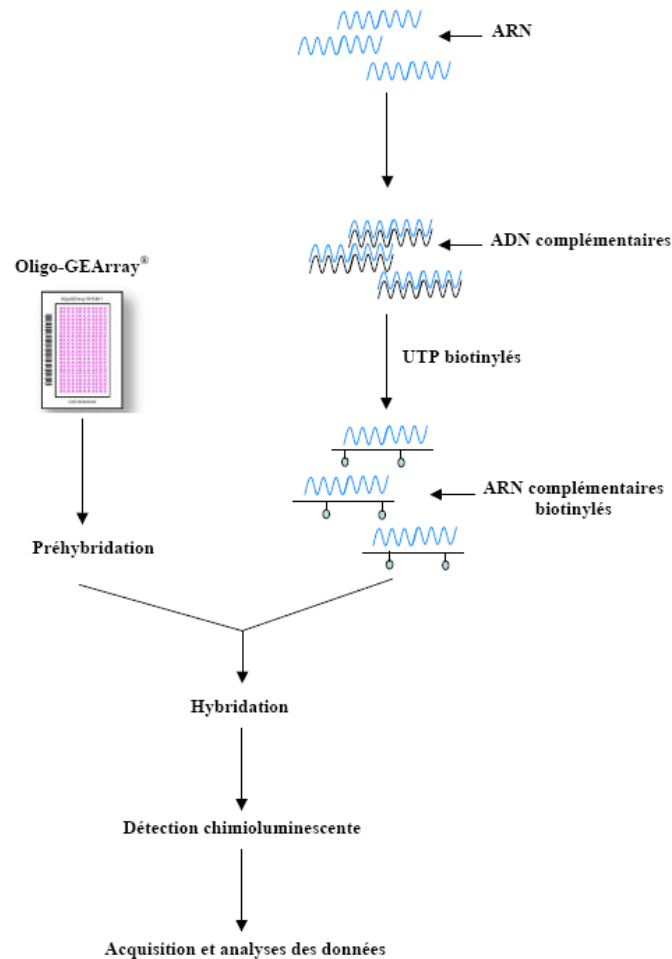
Chaque Oligo-GEArray® est à usage unique et est constituée de 113 amorces oligonucléotidiques, soit 96 gènes différents. Chaque gène est représenté par 4 « spots » d'amorces. Sur chaque membrane, différents contrôles positifs sont également présents : (i) des séquences biotinylées (2 x BAS2C) et (ii) des gènes de ménages (1 x Ppia ; 2 x GAPDH ; 2 x Aldo A ; 1 x Ldha ; 1 x Rpl32).

Figure 9: Exemple de puces Oligo-GEArray® (SABioscience).



Le principe des puces Oligo-GEArray® consiste en la synthèse d'ADN complémentaires à partir d'ARN totaux extraits. **(Figure 10)** Ces ADN complémentaires servent de matrice pour la synthèse d'ARN complémentaires avec utilisation d'UTP-biotinylés permettant de détecter de manière chimioluminescente, après ajout de substrat ECF (GE Healthcare), la quantité d'ARN présents dans chaque échantillon.

Figure 10 : schématisation d principe des puces Oligo-GEArray®



Synthèse de l'ADN complémentaire

La synthèse de l'ADN complémentaire se fait à partir du kit *True Labelling-AMPTM 2.0* (SABioscience), sur glace et selon le protocole suivant :

- Mixer et centrifuger brièvement tous les réactifs.
- Préparer le mélange suivant pour chaque échantillon :
 - 1 µg d'ARN
 - 1 µl de solution d'amorces G1
 - qsp 10 µl avec de l'eau stérile *RNase-free* du kit (sans DEPC)
- Incuber tous les tubes à 70 °C pendant 5 min dans un bain-marie, puis refroidir rapidement sur la glace.

- Centrifuger 2 s et mettre sur la glace.
- Ajouter 10 µl du mélange suivant dans chaque tube :
- 4 µl de tampon G3 (*5X cDNA Synthesis Buffer*)
- 1 µl de RI (*RNase Inhibitor*)
- 1 µl de G2 (*cDNA Synthesis Enzyme Mix*)
- 4 µl d'eau *RNase-free* du kit (sans DEPC)
- Incuber 50 min à 42 °C puis 5 min à 75 °C dans un bain-marie.
- Mettre sur la glace.

Synthèse de l'ARN complémentaire

- A Ajouter 20 µl du mélange de synthèse de l'ARN complémentaire suivant pour chaque échantillon :
- 16 µl de G24 (*2,5X RNA polymerase Buffer*)
- 2 µl d'UTP biotinylés 10 mM (Roche)
- 2 µl de G25 (*RNA polymerase Enzyme*)
- Centrifuger brièvement.
- Incuber toute la nuit à 37 °C dans un bain-marie à sec sous agitation douce.

Purification de l'ARN complémentaire

La purification des ARN complémentaires se fait à l'aide du *kit SuperArrayGrade cRNA Clean-up kit* (SABioscience) selon le protocole suivant :

- Ajouter 60 µl d'eau *RNase-free* à l'ARN complémentaire.
- Ajouter 350 µl de tampon G6 (*Lysis and Binding Buffer*)
- Ajouter 350 µl d'éthanol 100 % (v/v).
- Pour chaque échantillon mettre une colonne Spin sur un tube collecteur et y déposer le mélange ci-dessus.
- Centrifuger 30 s à 8 000 x g.

- Jeter l'éluat et replacer la colonne sur le tube collecteur.
- Ajouter 600 µl de tampon de lavage G17.
- Centrifuger 30 s à 8 000 x g.
- Jeter l'éluat et replacer la colonne sur le tube collecteur.
- Ajouter 200 µl de tampon de lavage G17.
- Centrifuger 3 min à 11 000 x g.
- Transférer chaque colonne sur un nouveau tube collecteur.
- Ajouter 50 µl de tampon Tris 10 mM pH 8.0 au centre de chaque colonne.
- Incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
- Centrifuger 1 min à 8 000 x g.
- Garder l'ARN complémentaire purifié à – 80 °C jusqu'à son utilisation.

La quantité ainsi que la qualité de ces ARN sont contrôlées comme décrit dans l'appendice technique.

Hybridation sur puce GEArray®

Les puces GEArray® utilisées sont : « Rat Cancer PathwayFinder » (Cat-ORN-033), « Rat Cell Cycle » (Cat-ORN-020), « Rat PI3K/Akt Signaling Pathway » (Cat-ORN-058) et « Rat Tumor Metastasis » (Cat-ORN-028) (SABioscience). Le protocole d'hybridation des ARN complémentaire sur ces puces est le suivant :

- Noter le code-bar représentant chaque membrane.
- Vérifier que l'anneau à l'intérieur du bouchon du tube est présent et intact.
- Toujours bien fermer les tubes.
- Ajouter 5 ml d'eau stérile dans le tube d'hybridation afin d'hydrater la membrane.
- Visser le bouchon.
- Inverser le tube 5 minutes à température ambiante.

- Chauffer la solution d'hybridation GEAHyb à 60 °C dans un bain-marie et dissoudre complètement la solution par inversion du flacon.
- Eliminer l'eau stérile.
- Ajouter 2 ml de solution d'hybridation GEAHyb préchauffée.
- Vortexer brièvement les tubes.
- Placer les tubes dans un cylindre d'hybridation.
- Pré-hybrider à 60 °C pendant 2 heures dans un four à hybridation sous agitation continue (7 rpm).
- Ajouter 2 µg d'ARN complémentaires biotinylés à 0,75 ml de solution d'hybridation GEAHyb préchauffée.
- Bien homogénéiser et conserver le mélange à 60 °C.
- Éliminer la solution d'hybridation du tube.
- Ajouter la solution d'hybridation contenant les ARN complémentaires dans le tube.
- Hybrider toute la nuit à 60 °C dans un four à hybridation sous-agitation continue (7 rpm).
- Le lendemain, préparer 5 ml de solution de lavage 1 et de lavage 2 pour chaque membrane et les préchauffer à 60 °C avant leur utilisation.
- Solution de lavage 1 : - 10 ml de tampon SSC 20X (Invitrogen)
- 5 ml de SDS 20 % (p/v)
- 85 ml d'eau stérile
- Solution de lavage 2 : - 0,5 ml de tampon SSC 20X (Invitrogen)
- 2,5 ml de SDS 20 % (p/v)
- 97 ml d'eau stérile
- Récupérer le « mix » d'hybridation contenant l'ARN complémentaire dans un tube stérile et le stocker à -80 °C jusqu'à sa réutilisation (le chauffer 5 min à 60 °C avant de la réutiliser).
- Ajouter 5 ml de solution de lavage 1 dans le tube.

- Vortexer brièvement.
- Laver la membrane 15 min à 60 °C sous agitation continue (25 rpm).
- Eliminer la solution de lavage 1.
- Ajouter la solution de lavage 2.
- Vortexer brièvement.
- Laver la membrane exactement 15 min à 60 °C sous agitation continue (25 rpm) (solution très stringente, un lavage excessif entrainerait une perte du signal).
- Eliminer la solution de lavage 2.
- Refermer le tube d'hybridation afin d'éviter un dessèchement de la membrane.
- Refroidir la membrane à température ambiante.

Toutes les étapes suivantes se font à température ambiante dans un four à hybridation.

- Préchauffer et bien homogénéiser la solution de saturation Q et le tampon F 5X.
- Ajouter 2 ml de solution GEABlocking Q dans le tube.
- Vortexer brièvement.
- Incuber 40 min sous agitation continue (25 rpm).
- Préparer le tampon F 1X en le diluant dans de l'eau stérile : il faut 16 ml de tampon par membrane et 16 ml pour diluer l'AP-SA (*Alkaline Phosphatase-conjugated Streptavidin*) nécessaire à 8 OligoGEArrays®.
- Diluer le tampon AP-SA au 1/8000 dans du tampon F 1X.
- Eliminer la solution Q.
- Ajouter 2 ml d'AP-SA dilué.
- Vortexer brièvement.
- Incuber 10 min sous agitation continue (7 rpm).
- Laver 4 x 5 min avec 4 ml de tampon F 1X sous agitation continue (7 rpm).
- Eliminer la solution de lavage.

- Rincer la membrane avec 3 ml de solution G.
- Inverser le tube 3 fois.
- Répéter l'opération une fois.
- Mettre la membrane dans un petit sachet plastique soudé sur 3 bords à usage unique.
- Appliquer 500 µl d'ECF (GE Healthcare) directement sur la membrane.
- Chasser les bulles d'air et souder le quatrième bord.
- Incuber 5 min à l'abri de la lumière.
- Prélever la membrane en la tenant par un coin avec une pince propre.
- Egoutter la membrane sans la laisser sécher. Attention à ne pas toucher les spots.
- Placer la membrane dans une pochette plastique préalablement nettoyées à l'éthanol 70 °C et sèche.
- Placer les membranes sur la vitre du scanner Storm® 860 (GE Healthcare), spots contre la vitre.
- Eliminer les bulles.
- Acquérir l'image grâce au logiciel *Image and acquisition and analysis*.

Lecture de la puce GEMArray® et interprétation des résultats

Les signaux chimioluminescents sont analysés avec le logiciel *GEMArray® Expression Analysis Suite* (SABioscience). Chaque type de puces est utilisé pour sur un minimum de deux échantillons pour chaque type de lésions (métaplasie et adénocarcinome) et en fonction du type de reflux induit. Une normalisation est effectuée par rapport aux intensités des gènes de ménages et les variations d'intensités des spots sont calculés par rapport aux témoins Anse-en-Y. Seules les variations d'intensités supérieures à 1,5 fois celles des témoins sont considérées comme étant significatives.

Quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Synthèse de l'ADN complémentaire

L'ADN complémentaire est synthétisé comme décrit précédemment.

Courbe standard

Afin de déterminer la meilleure dilution d'ADN complémentaire à utiliser pour chaque gène étudié, une courbe standard doit être réalisée grâce *Bio-Rad CFX Manager* (Bio-Rad) au logiciel. Pour chaque gène une amplification est faite à partir d'un témoin positif à différentes dilutions : non dilué, 1/10, 1/100 et 1/1000. La dilution des ADN complémentaires qui sera utilisée en fonction du gène est déterminée par le Ct analysé ; celui-ci doit être entre 20 et 35 (Tableau V).

Tableau V : Références des amorces pour la qRT-PCR chez le rat.

Gène	Références SABioscience	Dilution des ADN complémentaires	Efficacités(%)
Ldha	PPR56603B	1/10	100,6
Muc1	PPR51463A	Non dilué	103
Muc4	PPR47950A	Non dilué	113,7
Nfkb1	PPR42746A	Non dilué	90,5
Pik3cg	PPR56854A	Non dilué	108,3
Tff2	PPR48691A	Non dilué	106,4
Tff3	PPR52672A	Non dilué	95,5

Afin de pouvoir comparer l'expression des gènes il faut également calculer l'efficacité d'amplification (E) pour chacun d'entre eux. Celle-ci est calculée par rapport à la courbe standard. Toutes les efficacités doivent être proches les unes des autres.

Amplification

La préparation de l'amplification est réalisée à l'aide du *RT2 Fast SYBR Green qPCR Master Mix* (SABioscience) et des paires amorces décrites dans le tableau V (SABioscience). La préparation s'effectue sur glace.

- Préparer un mélange réactionnel pour tous les échantillons comme décrit ci-dessous :

- 10,5 µl d'eau stérile
- 12,5 µl de RT2 SYBR Green qPCR Master Mix
- 1 µl du mélange de paires d'amorces à 10 µM
- 1 µl d'ADN complémentaire
- L'amplification est réalisée dans un thermocycleur BioRad CFX96 selon le programme suivant :

1 cycle	45 cycles	
95 °C	95 °C	60 °C
10 min	15 s	1 min

Le gène de ménage servant de contrôle est la Lactase déshydrogénase A (Ldha).

Analyses des résultats (Méthode du $\Delta\Delta Ct$)

- Déterminer pour chaque réaction le *threshold cycle* (Ct) pour les gènes de ménage et les gènes d'intérêt.
- Utiliser uniquement les valeurs de Ct inférieures à 35 et ne comparer que les échantillons contenant la même quantité d'ADNc.
- Pour chaque gène calculer la différence entre les Ct de chaque gène d'intérêt et la moyenne des Ct des gènes de ménage (ΔCt).
- Pour chaque paire d'échantillon à comparer, calculer la différence entre les μCt des gènes d'intérêt entre les échantillons ($\Delta\Delta Ct$).

Exemple : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (échantillon) - ΔCt (contrôle).

- Calculer la variation d'expression de gène : $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Modélisation chez la souris

Protocole

Ce premier protocole décrit est une tentative d'adaptation des procédures réalisées chez le rat.

Les animaux étudiés sont des souris balb/c de 10 semaines pesant de 30 à 35 g. Les animaux sont hébergés dans un environnement avec cycle lumière obscurité de 12h. Une diète solide d'au moins 12h est respectée avec remplacement de l'eau de boisson ad libitum par du sérum glucosé à 10%.

Procédure d'anesthésie :

L'animal est préalablement pesé, afin d'adapter au mieux la dose d'anesthésiques au poids de l'animal. Une anesthésie générale est réalisée par injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg.kg⁻¹) et de xylazine (12 mg.kg⁻¹) après pré-anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Des abaques pour les doses d'anesthésies en fonction du poids ont été déterminés.

La kétamine et la xylazine sont préalablement diluées au 1/5 dans du sérum salé isotonique stérile, conservé sur la glace dans des Eppendorfs. En cas de réveil per opératoire, une seringue contenant 0,1mL de kétamine diluée est tenue à disposition pour réinjection.

Procédure chirurgicale :

L'abdomen était tondu et désinfecté avec de l'alcool à 70° et de la polyvidone-iodée. L'animal est installé en décubitus dorsal sur alaise en coton, les pattes étaient maintenues sur l'alaise par du papier collant, ceci sous une lampe chauffante afin de minimiser les déperditions thermiques. L'intervention est réalisée sous loupe binoculaire au grossissement 10x puis 16x.

La voie d'abord était une laparotomie médiane par incision à la lame froide à partir de l'appendice xiphoïde sur 2 cm, puis ouverture de la ligne blanche aux ciseaux. L'exposition du champ opératoire est obtenue par la mise en place d'un écarteur autostatique de type ophtalmologique et des trombones coudés maintenus par des élastiques et des punaises.

Après repérage de l'estomac puis de l'œsophage, la jonction œso-gastrique est disséquée en respectant les nerfs vagues, puis une ligature œsophagienne est réalisée, juste en amont, avec du fil tressé, résorbable Polysorb® 5/0 en bobine. Le fil était immédiatement sectionné.

Un fil tracteur de Prolène® 10/0 était mis en place sur le bord antérieur de l'œsophage au dessus de la zone de section de l'œsophage un bulldog en plastique à type de pince repère, afin d'éviter la rétraction de l'œsophage abdominal en intrathoracique lors de sa section.

La section de l'œsophage était amorcée sur la moitié antérieure au dessus de la ligature. La musculature est d'abord sectionnée puis la section muqueuse est décalée vers le bas pour lutter contre le phénomène de rétraction de la muqueuse lors de l'anastomose.

Une duodénotomie de 1 mm est pratiquée avec la pointe d'une aiguille rose utilisée comme un bistouri sur le versant antimésentérique à 3 mm du pylore. L'anastomose œso-duodénale était réalisée au Prolène® 10/0. Le point d'angle externe gauche était passé dans la duodénotomie puis l'œsophage. Le fil était noué et sectionné à 1mm. Le fil à l'angle diamétralement opposé était laissé long sur bulldog en plastique. Deux ou trois points étaient réalisés pour le plan postérieur. Le point d'angle externe droit était noué et sectionné puis 2 ou 3 points étaient réalisés pour confectionner le plan antérieur. La paroi digestive ne doit pas être pincée par la pince à disséquer mais celle-ci doit servir de contre-appui au passage de l'aiguille.

L'intervention se termine par un nettoyage de la cavité péritonéale à la compresse sèche et une compensation des pertes hydriques par du sérum physiologique (0,1 ml). La fermeture de la laparotomie se faisait en 2 plans par des surjets de monofilament, résorbable, Monocryl® 4/0.

Période postopératoire :

Durant la période de réveil l'animal est placé sous une lampe chauffante. La boisson est autorisée dès le réveil avec adjonction à l'eau d'antalgique (paracétamol à la dose de 60mg/kg/j). L'alimentation était reprise au deuxième jour postopératoire avec un régime mixé durant 10 jours (bouchons hydratés puis broyés), puis un régime normal. La boisson est supplémentée en sucre

(sérum glucosé à 10%). L'animal est hébergé en cage individuelle pendant 3 semaines avant d'être rassemblé. Les souris sont ensuite laissées en stabulation 40 semaines, dates à laquelle sont attendus les éléments de la séquence carcinogénétique.

Modification de protocole

Devant un taux de mortalité important, il a été ensuite envisagé une modification du protocole opératoire.

Procédure chirurgicale :

L'animal est anesthésié puis installé en décubitus dorsal en attachant les pattes par des sparadraps sur alèse en coton. L'abdomen est tondu puis désinfecté à l'alcool à la Biseptine. Une lampe chauffante est utilisée afin de minimiser les pertes thermiques. L'intervention est réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire au grossissement 6x.

La voie d'abord est une laparotomie médiane par incision à la lame froide à partir de l'appendice xiphoïde sur 2 cm, puis ouverture de la ligne blanche aux ciseaux. L'exposition du champ opératoire est obtenue par la mise en place d'écarteurs maintenus par des élastiques et des punaises. (cf. figure 11)

Figure 11 : photo de l' installation et laparotomie médiane



Une fois l'œsophage et l'estomac repérés, plusieurs procédures sont réalisées en fonction du groupe auquel appartient la souris :

- Groupe myotomie extramuqueuse : L'objectif était de créer une lésion mécanique du sphincter inférieur de l'œsophage sans léser la muqueuse œsophagienne. Libération complète de l'estomac et mobilisation de l'œsophage abdominal. A l'aide d'une aiguille sous-cutanée, myotomie longitudinale du tiers inférieur de l'œsophage et de la région cardiaque. Fermeture comme décrit précédemment.

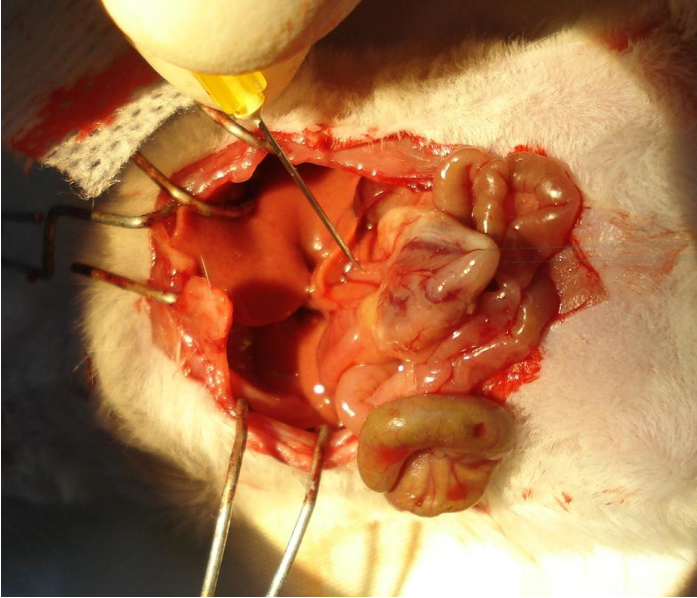
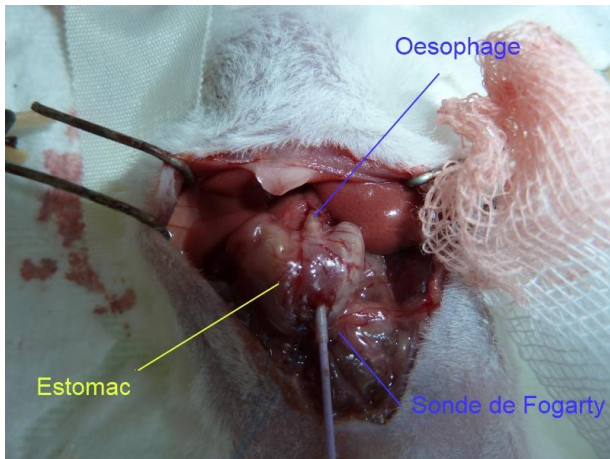


Figure 12: vue peropératoire lors de la réalisation d'une cardiomyotomie extramuqueuse à l'aide d'une aiguille sous-cutanée chez la souris

- Groupe Hernie Hiatale : L'objectif était de recréer les conditions d'une hernie hiatale responsable d'un RGO chez l'homme avec fixation d'une partie de l'estomac dans le thorax. La libération complète de l'estomac de ses adhérences hépatiques, spléniques et phrénique était nécessaire. Ouverture de l'orifice hiatal et introduction de la grosse tubérosité gastrique dans le médiastin. Fixation de celle-ci en intra-médiastinal par 2 points de Prolène 7/0 trans-gastro-phréniques. Toilette péritonéale et fermeture de la laparotomie par surjet total de fil lentement résorbable.

- Groupe Fogarty : L'objectif était d'entraîner une dilacération des fibres musculaires du sphincter inférieur de l'œsophage (SIO) par dilatation à l'aide du ballon d'une sonde de Fogarty, afin que celui-ci perde sa fonction. (condition d'hypotonie du SIO dans le RGO chez l'homme) Libération complète de l'estomac. Gastrotomie sur la grande courbure en regard de la jonction œso-gastrique. Montée d'une sonde de Fogarty de charrière 2F puis gonflage du ballonnet au

niveau de la JOG et dilatation durant 1 minute. Fermeture de la gastrotomie par deux points en X de Prolène 7/0. Toilette péritonéale.



Figures 13: dilatation de la JOG à la sonde de Fogarty

- Groupe Fogarty + intussusception : L'objectif était de potentialiser l'effet de la dilacération du SIO (groupe Fogarty) en ajoutant l'invagination du bas de l'œsophage dans l'estomac (intussusception) afin d'augmenter son contact avec le contenu gastrique. libération complète de l'estomac et mobilisation de l'œsophage abdominal. Gastrotomie et dilatation de la J.O.G comme décrit précédemment. Fixation du fundus au bord gauche du tiers inférieur de l'œsophage par un point de Prolène 8/0 et de la petite courbure au bord droit du tiers inférieur de l'œsophage par un point de Prolène 8/0. Fermeture comme décrit précédemment.
- Groupe laparotomie blanche : Il s'agit du groupe témoin subissant une laparotomie blanche : laparotomie médiane et fermeture tel que décrit précédemment.
- Un nombre d'au moins 6 souris par groupe a été retenu en raison d'une mortalité prévisible de 50% et de la rareté des lésions histologiques.

Période postopératoire : Durant la période de réveil l'animal est placé sous une lampe chauffante. La boisson est autorisée dès le réveil avec adjonction à l'eau d'antalgique (paracétamol à la dose de 60mg/kg/j). L'alimentation était reprise au deuxième jour postopératoire avec un régime mixé durant 10 jours (bouchons hydratés puis broyés), puis un régime normal. La boisson est supplémentée en sucre (sérum glucosé à 10%). L'animal est hébergé en cage individuelle pendant 3 semaines avant d'être rassemblés. Des injections de fer dextran à la dose de 50mg/kg une fois par mois en intramusculaire sont réalisé afin de lutter contre l'anémie postopératoire et pour favoriser la carcinogénèse.

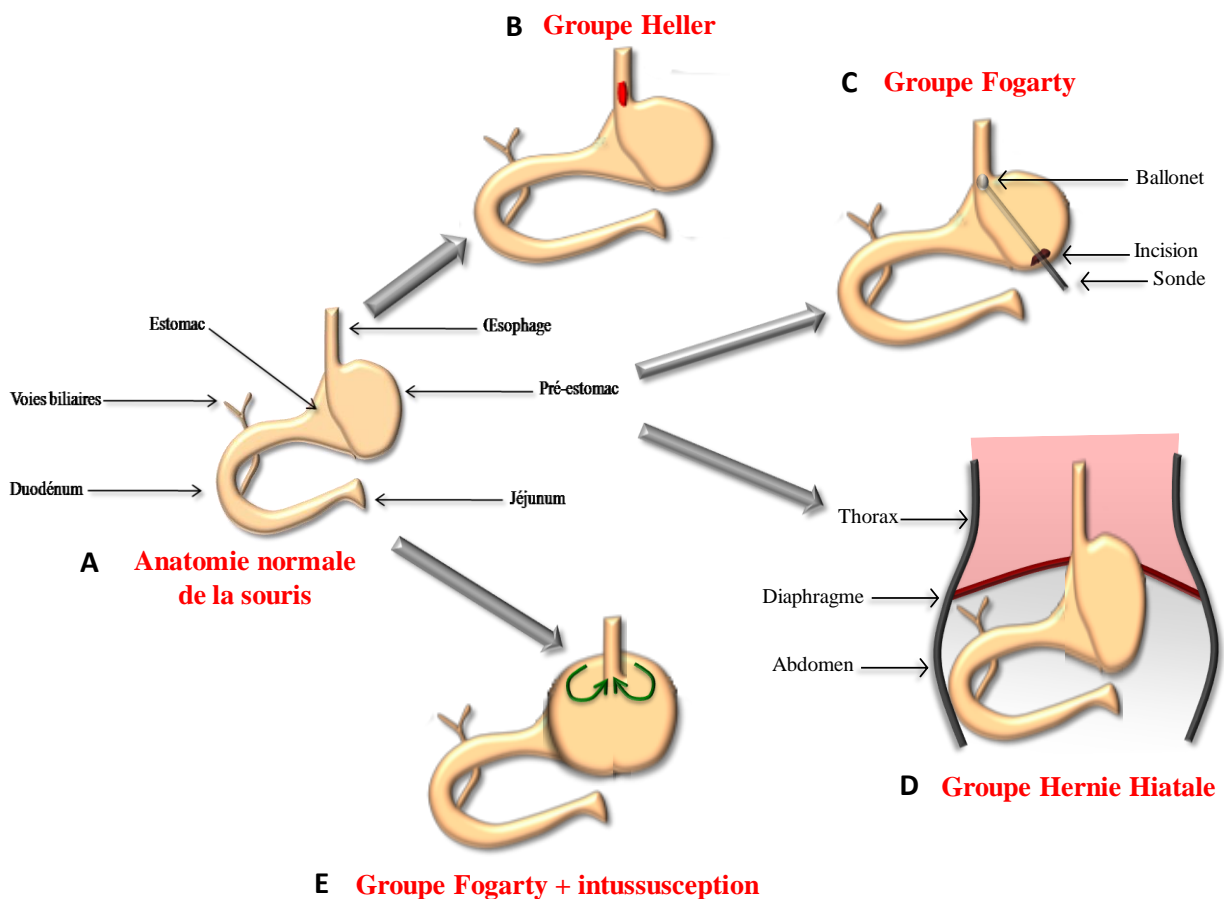


Figure 14: Schématisation des interventions pratiquées chez la souris, A : anatomie normale de la souris du groupe laparotomie blanche, B : groupe Heller avec réalisation d'une myotomie au

niveau de la jonction oeso-gastrique, C : groupe Fogarty avec réalisation d'une gastrotomie puis introduction d'une sonde à ballonnet dont l'extrémité est placée au niveau de la JOG pour réalisation d'une dilacération des fibres musculaires de la jonction oeso-gastrique, D : groupe Hernie hiatale avec positionnement du pôle supérieur de l'estomac dans le thorax, E : groupe Fogarty+ intussusception : même procédure que dans le groupe Fogarty avec positionnement de la partie distale de l'œsophage dans l'estomac.

Culture cellulaire

Lignée cellulaire OE33

La lignée cellulaire OE33 a été établie à partir d'un adénocarcinome peu différencié développé sur OB diagnostiqué chez une patiente caucasienne de 73 ans.

Conditions de culture

La lignée cellulaire OE33 est cultivée dans du milieu RPMI 1640 stérile (*Roswell Park Memorial Institute*) (Invitrogen) complété avec 10 % (v/v) de Sérum de Veau Fœtal (SVF) décomplémenté (Biowest) et 5 % (v/v) d'antibiotique (Pénicilline-Streptomycine, Invitrogen). Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37 °C et 5 % de CO₂. La semaine suivante les cellules sont arrivées à confluence et sont repiquées selon le protocole suivant :

- Travailler sous hotte stérile.
- Aspirer le milieu de culture.
- Rincer le tapis cellulaire avec 5 ml de D-PBS1X.
- Aspirer le D-PBS 1X.
- Déposer 1 ml de trypsine-EDTA (Invitrogen) sur le tapis cellulaire.
- Laisser agir dans l'étuve à 37 °C pendant 5 min.
- Inhiber la trypsine-EDTA par un ajout de 5 ml de milieu RPMI.
- Aspirer la suspension cellulaire et la mettre dans un tube de 15 ml.
- Centrifuger 5 min à 1500 tour/min.

- Eliminer le surnageant.
- Reprendre le culot cellulaire par du RPMI.
- Compter les cellules en lame de Malassez
- Mettre le volume de milieu correspondant à 6.10^5 cellules dans une nouvelle flasque de 25 ml à bouchon ventilé et contenant 5 ml de RMPI.
- Placer la flasque à l'étuve.
- Changer le milieu RPMI tous les deux jours.

Décongélation des cellules

- Préchauffer le milieu de culture à 37°C dans un bain marie.
- Sortir les cryotubes contenant les cellules de l'azote liquide.
- Ouvrir rapidement puis fermer les cryotubes afin de diminuer la pression interne.
- Réchauffer les cryotubes en formant des « 8 » dans le bain marie à 37°C afin de répartir de manière homogène la chaleur à l'intérieur du tube. Continuer jusqu'à décongélation totale.
- Mettre les cellules dans un tube de 15 ml et y ajouter 4 ml de milieu.
- Centrifuger 5 min à 900 x g.
- Reprendre le culot cellulaire par 10 ml de milieu.
- Mettre 5 ml de ce mélange dans une flasque de 25 ml à bouchon ventilé (deux T25 par cryotube décongelé).
- Conserver les cellules dans une étuve à 37 °C et 5 % de CO₂.

Congélation des cellules

Travailler sous hotte stérile.

- Aspirer le milieu des flasques contenant les cellules.
- Rincer les cellules avec 15 ml de D-PBS1X stérile (pour une flasque de 75 ml).
- Trypsiniser les cellules (5 ml par T75).

- Rincer avec 5 ml de milieu de culture et transférer les 10 ml dans un tube de 50 ml.
- Centrifuger 5 min à 1 500 x g à température ambiante.
- Aspirer le milieu et resuspendre le culot cellulaire dans 10 ml de milieu.
- Compter les cellules en lame de Malassez.
- Centrifuger les cellules et reprendre 5 x 10⁶ cellules dans 1,2 ml de milieu plus 150 µl de SVF et 150 µl de glycérol pour atteindre un volume final de 1,5 ml.
- Transférer ce mélange dans un cryotube.
- Congeler les cellules dans un container spécial contenant 250 ml d'isopropanol (perte de 1°C par minute une fois placé à -80°C).
- Après 24 h à -80 °C, placer les cryotubes dans un portoir dans le container à azote liquide.

Etablissement et clonage des lignées stables OE33 déficientes en MUC1 ou MUC4

Des lignées stables OE33 déficientes en MUC1 (shMUC1) ou en MUC4 (shMUC4) ont été établies par infection rétrovirale avec un plasmide pRetroSuper (SABioscience™). Ce plasmide contenait des séquences ciblant MUC1 (s : GATCCCCGGTACCATCAATGTCCACG-

TTCAAGAGA-CGTGGACATTGATGGTACCTTTTTGGAAA

; as : AGCTTTTCCAAAAA-GGTACCATCAATGTCCACGTCTCTTGAA-

CGTGGACATTGATGGTACC-GGG) ou ciblant

MUC4 (s : GATCCCC-CGCAAGCATCGGACTTCAC-

TTCAAGAGAGTGAAGTCCGATGCTTGCG-

TTTTTGGAAA ; as : AGCTTTTCCAAAAACGCAAGCATCGGACTTCAC-

TCTCTTGAA-GTGAAGTCCGATGCTTGCG-GGG) (Dr Jean-Luc Desseyn) portant une résistance à la puromycine et codant la GFP.

Les lignées contrôles ont été établies en parallèle par infection rétrovirale du plasmide pRetroSuper vide (cellules Mock) à l'Institut de Biologie de Lille, avec l'aide du Docteur David Bernard. Le clonage des cellules OE33 shMUC1 et shMUC4 s'effectue ensuite sur les

populations totales de cellules shMUC1 ou shMUC4 déjà transfectées par infection rétrovirale au laboratoire, en suivant le protocole suivant :

- Rincer les cellules au D-PBS1X stérile.
- Ajouter 1 ml de trypsine-EDTA et laisser agir.
- Rincer les cellules avec 5 ml de milieu et transférer le tout dans un tube de 15 ml.
- Centrifuger 5 minutes à 1500 tr/min.
- Reprendre le culot par 1 ml de milieu et effectuer la numération des cellules sur lame de Malassez.
- Faire des dilutions limites afin d'obtenir un volume de 10 ml contenant 100 cellules.
- Déposer 100 µl de ce mélange par puits d'une plaque à 96 puits afin d'avoir une moyenne d'une cellule par puits.
- Incuber à 37 °C et 5 % de CO₂.
- Après une semaine de culture, déterminer les puits présentant une seule cellule et continuer à travailler uniquement avec ceux-ci.
- Laisser les cellules jusqu'à confluence puis les repiquer en plaque à 24 puits.
- Laisser les cellules jusqu'à confluence puis à nouveau les repiquer en plaque à 24 puits et, parallèlement, réaliser une RT-PCR sur ces cellules afin de sélectionner les cellules n'exprimant plus MUC1 et celles n'exprimant plus MUC4.
- Repiquer ces cellules dans une plaque à 6 puits puis dans des flasques T25.

Traitement des cellules par ARN interférence transitoire (siARN)

Les cellules traitées par siARN sont repiquées la veille dans des plaques à 24 puits à raison de $1,5 \times 10^5$ cellules par puits dans 1 ml de milieu RPMI sans antibiotiques mais contenant 10 % (v/v) de SVF. Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant 24h afin que la confluence lors du traitement approche 70 %.

Resuspension des siARN

Les siARN proviennent de chez Dharmacon et sont décrits dans le tableau VI.

Tableau VI: Références des siARN utilisés (Dharmacon)

Cible du siARN	Nom	Référence
Aucune : témoin négatif	ON-TARGET plus Non-targeting siRNA #1	D-001810-01-05, 5 nmol
GAPD : témoin positif	ON-TARGET plus GAPD Control siRNA	D-001830-01-05, 5 nmol
PI3K, p110	ON-TARGET plus SMARTpool siPI3KCG	L-005274-00-0005, 5 nmol
NFκB, p100	ON-TARGET plus SMARTpool siNFκB2	L-003918-00-0005, 5 nmol
S100A4	ON-TARGET plus SMARTpool siS100A4	L-004792-00-0005, 5 nmol
MCM6	ON-TARGET plus SMARTpool siMCM6	L-003277-00-0005, 5 nmol
TSG 101	ON-TARGET plus SMARTpool siTSG101	L-003549-00-0005, 5 nmol
MMP3	ON-TARGET plus SMARTpool siMMP3	L-005968-00-0005, 5 nmol
MMP13	ON-TARGET plus SMARTpool siMMP13	L-005955-00-0005, 5 nmol

Une solution stock à 20 μM est réalisée en reprenant le lyophilisat avec du tampon 1X *siRNA buffer* dilué à partir du tampon 5X *siRNA buffer* (Dharmacon) et d'eau dans RNase, ce tampon

1X contenant 20 mM de KCl, 6 mM d'Hepes à pH 7.5 et 0.2 mM de MgCl₂. Cette solution stock est ensuite gardée à -20 °C jusqu'à utilisation.

Préparation des mélanges réactionnels

- Préparer une solution diluée de siARN à 2 µM dans du tampon 1X *siRNA buffer* préparé comme précédemment.
- Dans un tube stérile, mettre par puits, 25 µl de milieu sans sérum et 25 µl de la solution de siARN diluée à 2µM. Mélanger doucement puis incubé 5 min à température ambiante. Pour les puits témoins remplacer les 25 µl de siRNA dilué par 25 µl de 1X *siRNA buffer*.
- Dans un second tube stérile, ajouter par puits 49 µl de milieu sans sérum et 1 µl de réactif de transfection (Dharmafect 1 T-2001-01, Dharmacon). Mélanger doucement puis incubé 5 min à température ambiante.
- Ajouter 50 µl du second tube au premier tube contenant le siARN. Mélanger doucement puis incubé 20 min à température ambiante.
- Ajouter au mélange 400 µl de milieu complet par puits.

IV.3. Transfection

- Aspirer le milieu des puits contenant les cellules.
- Transférer le mélange de transfection sur les cellules goutte à goutte et bien le répartir sur le puits.
- Incuber à 37 °C et 5 % de CO₂ jusqu'à récupération des ARN et des protéines.

Études des propriétés biologiques des cellules

Prolifération

L'étude de la prolifération cellulaire est réalisée en plaque 6 puits.

- Lors du repiquage des cellules à étudier,ensemencer 1,5 x 10⁵ cellules par puits dans 2 ml de milieu complet dans le cas de cellules non traitées ou 2 x 10⁵ cellules dans 2 ml de milieu sans antibiotique dans le cas de cellules traitées aux siARN le lendemain.

- Les cellules sontensemencées en triplicate pour chaque temps de comptage (6 jours pour les cellules en conditions normales et 3 jours pour les cellulaires traitées aux siARN).
- Le jour du comptage, aspirer le milieu des puits et rincer par du D-PBS1X.
- Aspirer le D-PBS-1X et ajouter 0,5 ml de trypsine-EDTA par puits.
- Incuber à 37 °C jusqu'à décollement du tapis cellulaire.
- Ajouter 1,5 ml de milieu complet par puits et récupérer dans un tube de 15 la suspension cellulaire
- Diluer au demi 10 µl de cellules en suspension dans 10 µl d'une solution de Bleu Trypan (Invitrogen) et placer ces 20 µl sur une lame de Malassez.
- Compter les cellules présentes dans chaque carré doublement quadrillé (25 par lames). Il faut tenir compte uniquement des cellules présentes sur les côtés supérieurs gauches de chaque carré. Ce nombre de cellules correspond à % du nombre de cellules présentes sur l'ensemble de la lame de Malassez.
- Multiplier le nombre de cellules par 4 (1/4 de la surface), puis par 2 (dilution au demi dans le Bleu Trypan) et enfin par 2000 (volume total de cellules dans 2 ml de milieu). On obtient alors le nombre total de cellules dans chaque puits.

Migration-Invasion

- Chambre de Boyden

L'invasion cellulaire est mesurée grâce à l'utilisation de Chambre de Boyden recouvertes par du Matrigel (BD BioCoat™, BD Biosciences). Les contrôles sont réalisés en calculant la migration des cellules sur des chambres non recouvertes de Matrigel.

- Préincuber au moins 2h les chambre dans du RPMI seul (750 µl par puits et 500 µl par chambre) dans l'incubateur à 37 °C et 5 % CO².
- Laver les cellules au D-PBS-1X puis ajouter de la trypsine-EDTA.
- Récupérer les cellules dans 5 ml de RPMI seul.

- Compter les cellules sur lame de Malassez et ensemercer 1×10^5 cellules dans 500 μ l de RPMI seul par chambre.
- Aspirer les 750 μ l de RPMI seul contenus dans le puits par 750 μ l de milieu complet, le SVF servant de chémoattractant.
- Incuber 24h dans l'incubateur à 37°C et 5%CO².
- Le lendemain, vider les chambres puis les gratter avec un coton-tige afin d'éliminer les cellules non invasives.
- Répéter l'opération.
- Transférer les chambres dans des puits contenant 0,5 ml à 1 ml de fixateur Diff-Quick (Medion Diagnostics).
- Laisser agir 5 min.
- Vider les chambres puis les transférer dans des puits contenant 0,5 ml à 1 ml de colorant rose Diff-Quick I (Medion Diagnostics) contenant de l'éosine marquant le cytosol.
- Laisser agir 25 min.
- Vider les chambres puis les transférer dans des puits contenant 0,5 ml à 1 ml de colorant bleu Diff-Quick II (Medion Diagnostics) contenant de l'hématoxyline marquant les noyaux.
- Laisser agir 25 min.
- Laver les chambres 3 fois avec du D-PBS-1X pendant 5 min.
- Monter les lames :
- Déposer une goutte de glycérol tamponné sur la lame.
- Découper le fond de la chambre à l'aide d'un scalpel.
- Déposer la face avec les cellules contre le glycérol.
- Recouvrir d'une goutte de glycérol.
- Mettre la lamelle dessus en chassant les bulles.
- Vernir les contours pour fermer.

- Laisser les lames 1h à température ambiante puis les mettre à 4°C.
- Le lendemain compter les cellules invasives et les rapporter au nombre de cellules comptées sur les chambres contrôles de migration (chambres non recouvertes de Matrigel).

- *IncucyteTM*

Des tests de blessure sont réalisés afin de calculer la migration cellulaire.

- Ensemencer les cellules en plaques 96 puits (Essen ImageLock 4379) : 1 x 10⁵ cellules soit dans 100 µl de milieu complet, soit sans antibiotique dans le cas de cellules qui seront traitées aux siARN.
- Une fois les cellules à confluence, réaliser les blessures avec *le 96-pin WoundMaker* qui permet de réaliser une blessure dans tous les puits de la plaque en même temps.
- Placer la plaque dans l'IncucyteTM (Essen Biosciences) situé dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂.
- Les plaques sont photographiées toutes les heures afin de suivre en temps réel la fermeture de la blessure. La taille de celle-ci est mesurée en µm sur chaque photographie grâce au logiciel de l'IncucyteTM.
- Le pourcentage de fermeture de la blessure pour chaque clone cellulaire est ensuite calculé en fonction du temps de prise de la photographie.

Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits grâce au kit *Total RNA Isolation*, NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel), le protocole utilisé étant le suivant :

- Aspirer le milieu de culture.
- Rincer avec 5 ml de D-PBS1X.
- Aspirer le D-PBS1X.
- Préparer un mélange de 350 µl de tampon de lyse RA1 et 3,5 µl de β-mercaptoéthanol pour chaque flasque.

- Récupérer les cellules avec ce mélange.
- Appliquer le lysat sur une colonne Nucleospin® Filter placé sur un tube collecteur
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g.
- Jeter le filtre et ajouter 350 µl d'éthanol 70 % (v/v) au lysat puis mélanger doucement à la pipette.
- Appliquer le mélange sur une colonne NucleoSpin® RNA II.
- Centrifuger 30 s à 11 000 x g.
- Ajouter 350 µl de tampon de lavage MDB sur la colonne.
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g puis jeter l'éluat.
- Préparer le mélange de rDNase : par échantillon mélanger 90 µl de tampon et 10 µl de rDNase reconstituée.
- Appliquer 95 µl du mélange de rDNase au centre du filtre.
- Incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
- Ajouter 200 µl de tampon RA2 sur la colonne afin de désactiver la rDNase.
- Centrifuger 30 s à 11 000 x g puis jeter l'éluat.
- Ajouter 600 µl de tampon RA3 sur la colonne.
- Centrifuger 30 s à 11 000 x g et jeter l'éluat.
- Ajouter 250 µl de tampon RA3 sur la colonne.
- Centrifuger 2 min à 11 000 x g.
- Placer la colonne sur un tube collecteur neuf de 1,5 ml.
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g.
- Placer la colonne sur un tube d'élution neuf de 1,5 ml.
- Appliquer 60 µl d'eau stérile (RNase-free du kit) directement au centre du filtre.
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g.
- Récupérer l'éluat dans un tube de 1,5 ml neuf.

- Conserver les ARN à -80 °C jusqu'à utilisation.

La quantité de ces ARN est vérifiée par mesure de l'absorbance des échantillons à une longueur d'onde de 260 nm sur un NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific). Leur qualité est vérifiée par migration électrophorétique et calcul du rapport des bandes correspondant aux ARN ribosomiaux (rapport 28S/18S).

Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Synthèse de l'ADN complémentaire

La transcription inverse s'effectue en travaillant sur de la glace.

- Pour chaque échantillon mélanger :

- 1 µg d'ARN

- 1 µl d'Oligo(dT) (Promega, 500 µg/ml)

- qsp 14 µl avec de l'eau stérile

- Incuber tous les tubes à 70 °C pendant 5 minutes dans un bain-marie, puis refroidir rapidement sur la glace.

- Ajouter 25 µl du mélange suivant dans chaque tube :

- 14 µl d'eau stérile

- 5 µl de tampon M-MLV RT-5X (Promega)

- 5 µl de dNTPs avec sels de lithium (Eurogentec)

- 1 µl de Transcriptase inverse (Promega, 200 U/µl)

- Incuber 1 heure à 42 °C puis 5 minutes à 94 °C dans un bain-marie.

- Ajouter 60 µl d'eau stérile à l'ADN complémentaire synthétisé afin d'obtenir un volume final de 100 µl.

- Garder l'ADN complémentaire à -80 °C jusqu'à utilisation.

Amplification

La préparation de l'amplification s'effectue sur glace.

- Préparer un mélange réactionnel pour tous les échantillons comme décrit ci-dessous :
- 13,5 µl d'eau stérile
- 2,5 µl de tampon MgCl₂10X (Promega)
- 1 µl de dNTPs (Eurogentec)
- 1 µl d'amorces sens diluées à 5 pmol/µl (MWG)
- 1 µl d'amorces anti-sens à 5 pmol/µl (MWG)
- 1 µl de Taq polymerase (Promega)
- 5 µl d'ADN complémentaire
- L'amplification est réalisée dans un thermocycleur CFX96 (BioRad) en suivant le programme suivant :

1 cycle	n cycles			1 cycle	∞
94 °C	94 °C	T _m °C	72 °C	72 °C	8 °C
2 min	45 s	1 min	1 min	10 min	

Les séquences des différentes amorces utilisées sont décrites dans le tableau VII. Le contrôle interne utilisé est le 28S.

Tableau VII : Séquences des oligonucléotides utilisés en RT-PCR.

Nom du gène	Séquence des amorces (5'→3')
28S	s : GCAGGGCGAAGCAGAAGGAAACT; as : TGAGATCGTTTCGGCCCCAA
B-actin	s: ATATCGCTGCGCTCGTCGTCGACAA; as:AACACAGCCTGGATGGCTACGTACAT
MUC1	s : GAACTACGGGCAGCTGGACAT;as : GCTCTCTGGGCCAGTCCTCCTG
MUC4	s : CGCGGTGGTGGAGGCGTTCTT;as : GAAGAATCCTGACAGCCTTCA
cyclin D1	s: TGACTGCCGAGAAGTTGTG;as: GAGGGTGGGTTGGAAATG
ErbB1	s: AGTGGTCCTTGCAAACCTTGG;as: TTAACTCAAGCTGCCTCGCC
COX2	s: AGTATCAGAACCGCATTGCC;as: TAAGGTTTCAGGGAGAAGCG
PI3K	s: GAAGCCATTGAGAAGAAAGGA; as:GAGGTGTTTCAGTATTATCAGAGC
NF-kB	s: GAAGAAGCGAGACCTGGAG; as: TCCGGAACACAATGGCCAC
Smad4	s: CATTCTGTGGCTTCCACAA ;as: GACTGATGGCTGGAGCTATT
VEGF	s: ACGAAAGCGCAAGAAATCCC ; as: TTA ACTCAAGCTGCCTCGCC

Migration en gel d'agarose

- Mélanger 10 µl d'amplicons à 2 µl de tampon de charge.
- Déposer 10 µl de ce mélange dans un gel d'agarose à 1,5 % (p/v) contenant du BET dans un tampon TBE 1X.
- Faire migrer : le temps de la migration dépend de la taille des amplicons déposés.
- Révéler le gel après migration sur une plaque à UV.

- Le ratio *gène d'intérêt/28S* est calculé après avoir scanné les bandes d'ADN obtenues grâce au logiciel GelAnalyst-GelSmart (Claravision).

Extraction des protéines totales

- Travailler sur glace.
- Passer les grattoirs en plastique un à un à l'alcool 70°.
- Gratter le tapis cellulaire en trempant le grattoir dans le milieu de culture contenu dans cette flasque.
- Récupérer le liquide dans un tube de 50ml.
- Centrifuger 5 min à 1600 x g.
- Aspirer le surnageant et resuspendre les cellules dans 0,5 ml de D-PBS1X.
- Centrifuger 1 min à 9000 x g.
- Aspirer le surnageant et resuspendre les cellules dans 0,5 ml de D-PBS1X.
- Centrifuger 1 min à 9000 x g.
- Préparer le tampon de lyse (pour 5 ml) :
 - 250 µl de Tris HCl 1M
 - 250 µl de NaCl 3M
 - 10 µl d'EDTA 0,5M
 - 0,5 µl d'aprotinine 10 mg/ml
 - 0,5 µl de leupeptine 10 mg/ml
 - 50 µl de PMSF 0,1M
 - 500 µl de NP40 10 % (v/v)
 - 25 µl de fluorure de sodium 1M
 - 250 µl d'orthovanadate de sodium 100Mm
 - 50 µl d'oxycholate de sodium 25 % (v/v)
 - 3614 µl d'eau stérile

- Reprendre le culot avec du tampon de lyse (1 ml pour une flasque de 75 ml, 150 !l pour un puits de plaque 24 puits).
- Laisser 30 min sur la glace, gratter les tubes toutes les 10 min sur un portoir en fer.
- Centrifuger 10 min à 16000 x g à 4°C.
- Récupérer le surnageant dans un tube propre.
- Conserver à -80°C jusqu'à utilisation.

Dosage de protéines

Les protéines extraites selon le protocole décrit ci-dessus sont dosées avant leur utilisation en western-Blot par méthode colorimétrique BCA. Le dosage est réalisé avec une plaque à 96 puits et une solution commerciale de BCA (ThermoScientific).

Une gamme étalon est réalisée avec de la BSA (*Bovin Serum Albumin*) (Pierce) à 2 mg/ml selon le plan de plaque suivant :

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Eau	BSA 0,5 µl	BSA 1 µl	BSA 2 µl	BSA 4 µl	BSA 8 µl
2 µl	(1µg)	(2µg)	(4µg)	(8µg)	(16µg)
	[5 ng/ml]	[10 ng/ml]	[20 ng/ml]	[40 ng/ml]	[80 ng/ml]

- Ajouter 2 µl de chaque protéine à doser dans les autres puits de la plaque.
- Verser 200 µl de BCA dans tous les puits contenant soit la BSA (gamme étalon) ou les protéines à doser.
- Incuber la plaque à 37°C sous légère agitation puis la placer dans un lecteur de microplate Model 680 (Bio-Rad) pour lecture des absorbances à 320 nm.

Western-blotting

Gels de polyacrylamide (8 x 9 cm)

- Préparation du gel

Le gel est réalisé en suivant la composition résumée dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Composition des gels de polyacrylamide pour western- Blotting (volumes pour deux gels).

	Gel de séparation						Gel de concentration
	5%	8%	10%	13%	15%	20%	
Réticulation du gel	5%	8%	10%	13%	15%	20%	5%
Acrylamide/Bis-Acrylamide (ml)	3,35	5,35	6,65	8,65	10	13,3	1
1,5M Tris-HCl, pH 8.8 + 0,4 % (v/v) SDS (ml)	5	5	5	5	5	5	-
0,5M Tris-HCl, pH 6.8 + 0,4 % (v/v) SDS (ml)	-	-	-	-	-	-	1,87
Eau distillée (ml)	11,55	9,55	8,25	6,25	4,9	1,6	4,55
10 % (v/v) APS (µl) (Persulfate d'ammonium)	100	100	100	100	100	100	37,5
TEMED (µl) (NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine)	10	10	10	10	10	10	3
0,1 % (v/v) bleu de bromophénol (µl)	-	-	-	-	-	-	37,5

La réticulation du gel utilisé dépend de la taille des protéines à étudier. Les différentes réticulations utilisées sont spécifiées dans le tableau IX .

Tableau IX : Liste des anticorps utilisés en western-blot.

Antigène	Source	Quantité de protéines (µg)	Concentration de l'anticorps primaire	Concentration de l'anticorps secondaire
BACTINE	A-5441 (Souris) (Sigma)	8	1/5000	1/10000
MUC1	M8, don gracieux du Dr D Swallow (Londres)	20	1/250	1/10000
MUC4	8G7(Santa-Cruz)	20	1/500	1/10000
Chk2 Antibody	#2662 Cell Signaling	40	1/1000	1/10000
Phospho-PI3 Kinase p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199)	#4228	20	1/1000	1/10000
S100A4	(ab41532) abcam	40	1/250	1/10000
TSG101	[4A10] (ab83)	20	1/500	1/10000
MCM6	(ab4458)	20	1/500	1/10000

- *Electrophorèse*

- Décongeler les extraits protéiques sur glace.

- Placer le gel dans la cuve de migration et le recouvrir de tampon d'électrophorèse SDS-page.

- Enlever doucement les peignes placés précédemment dans les gels.

- Dans un tube, mettre le volume de protéines correspondant à la concentration voulue avec le tampon de charge (Bleu de Bromophénol) (même concentration pour tous les échantillons : 1 µl de protéine pour 1 µl de Bleu de Bromophénol).

- Placer les tubes 5 min à 96°C dans un bain marie afin de les dénaturer.

- Après homogénéisation, placer les volumes de protéines dans le fond de chaque puits avec 6 μ l de tampon de charge.
- Faire migrer les protéines avec un ampérage de 35 mA par gel, le voltage étant adapté à l'appareil.
- Migrer jusqu'à ce que le front de migration soit au bas du gel de séparation (45 min à 1h).
- *Transfert*
- Verser du tampon de transfert dans une cuve en verre.
- Placer le gel contenant les protéines dans une cassette, placé contre une membrane de transfert PVDF (polyfluorure de vinylidène) (activée au préalable en la trempant dans du méthanol puis dans de l'eau stérile) et 2 papiers Whattman.
- Refermer la cassette une fois les bulles enlevées.
- Verser du tampon de transfert dans la cuve contenant un agitateur magnétique et un pain de glace.
- Transférer à un voltage de 100 V, l'ampérage dépendant de l'appareil.
- Au bout de 30 min changer le pain de glace et continuer le transfert 30 min.
- Laver trois fois 5 min la membrane dans du TBST sous agitation.
- *Révélation immunologique*
- Bloquer les sites aspécifiques de la membrane en l'incubant dans du TBST contenant 5 % (p/v) de lait écrémé en poudre, toute la nuit à 4°C et sous agitation.
- Le lendemain, jeter le mélange TBST-lait et incuber la membrane 2h à température ambiante avec une dilution de l'anticorps primaire dilué dans du TBST sous agitation. - Rincer trois fois 5 min la membrane au TBST.
- Incuber la membrane avec une dilution de l'anticorps secondaire dans du TBST 1h à température ambiante et sous agitation.
- Rincer deux fois 5 min la membrane avec du TBST.

- *Détection*

- Rincer au tampon *Substrate Buffer* (Pierce).

- Égoutter la membrane et la mettre dans le *Fujifilm LAS4000* (GE Healthcare) puis prendre les photographies.

- *Compositions des tampons*

- *Tampon SDS-PAGE (pour 1l)*

- Tris (trishydroxyméthylaminométhane) : 3 g

- glycine : 14,4 g

- SDS (Dodécyl sulfate de sodium) 10 % (p/v) : 10 ml

- Compléter à 1l avec de l'eau stérile.

- *Tampon de transfert (1l)*

- Tris : 3 g

- Glycine : 14,4 g

- Méthanol : 200 ml

- SDS 10 % (v/v) : 0,5 ml

- Compléter à 1l avec de l'eau stérile

- *Tampon TBST (Tris-Buffered Saline and Tween)*

- Tris-HCL 1M, pH 7.5 : 50 ml

- Tween 20® : 0,5 ml

- NaCl 5M : 30 ml

- Compléter à 1l avec de l'eau stérile

Gels d'agarose (15 x 20 cm)

- *Préparation du gel*

- Préparer un gel d'agarose à 2% (p/v) de 15 cm sur 20 cm (250 ml).

- Agarose : 5 g

- Tampon Tris-HCl 3M, 0,4% SDS (v/v) pH 8.8 : 30,84 g
- Compléter à 250 ml avec de l'eau stérile.
- *Electrophorèse*
- Préparer un volume de protéines correspondant à 20 µg par puits.
- Ajouter à ce volume un volume égal de tampon dénaturant *2X SDS loading buffer*.
- Placer les échantillons 5 min à 96 °C dans un bain marie afin de les dénaturer.
- Déposer les échantillons dans les puits du gel d'agarose.
- Faire migrer de 5 à 7 H à un voltage de 100 V.
- Arrêter la migration lorsque le front de migration est à 5 cm du bord inférieur du gel.
- *Transfert*
- Placer le gel sur une membrane de nitrocellulose (0,2 µm, Schleicher et Schüll) de 15cm sur 20cm.
- Réaliser le montage entre deux plaques de verres avec un pont de papier Whatmann3 apportant le tampon de transfert et posé perpendiculairement à la plaque de verre, deux feuilles de papier Whatmann3 imbibées, le gel, la membrane de nitrocellulose sèche et un paquet de papier Whatmann3.
- Placer ce montage dans 3 L de tampon de transfert.
- *Révélation immunologique*
- Bloquer la membrane dans une solution de TBST à 5% (p/v) de lait écrémé en poudre 2h à température ambiante et sous agitation.
- Laver trois fois 5 min au TBST sous agitation.
- Incuber la membrane avec l'anticorps dilué dans du TBST pendant 2h à température ambiante et sous agitation.
- Laver trois fois 5 min au TBST sous agitation.

- Incuber la membrane avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBST pendant 1h à température ambiante sous agitation.

- Rincer trois fois 5 min au TBST sous agitation.

- *Détection*

- Incuber la membrane 5 min avec du Super Signal (SuperSignal Substrate Western Blotting Kits, Pierce) dans 10 ml du mélange suivant : 5 ml de solution Luminol/Enhancer et 5 ml de solution stable peroxyde.

- Égoutter la membrane et la mettre dans le *Fujifilm LAS4000* (GE Healthcare) puis prendre les photographies.

- *Compositions des tampons*

- *Tampon Tris-HCl 3M, 0,4% SDS pH 8.8 (100 ml)*

- Tris : 36,34 g

- HCL 1N : 48 ml

- SDS 10% (v/v) : 4 ml

- Compléter à 100 ml avec de l'eau stérile

- *Tampon 2X SDS-loading buffer*

- 0,5 M Tris-HCl pH 6.8 0,4 % SDS : 5 ml

- Glycérol: 4 ml

- SDS 20% (v/v): 3,9 ml

- β -mercaptoéthanol : 2 ml

- Bleu de bromophénol 1% (v/v) : 1 ml

- Eau déminéralisée : 0,2 ml

- *Tampon de transfert (1l)*

- Tris : 3 g

- Glycine : 14,4 g

- Méthanol : 100 ml
- SDS 10% (v/v) : 0,5 ml
- Compléter à 1 l avec de l'eau déminéralisée
- *Tampon de migration (2l)*
- Tris : 6 g
- Glycine : 28,8 g
- SDS 20% : 10 ml
- Compléter à 2 l avec de l'eau déminéralisée
- *Tampon TBST (Tris-Buffered Saline and Tween)*
- Tris-HCl 1M pH 7.5: 50 ml
- Tween 20®: 0,5 ml
- NaCl 5M : 30 ml
- Compléter à 1l avec de l'eau stérile

Xénogreffes sous-cutanées

Dans le but de réaliser des xénogreffes sous-cutanées, les cellules sontensemencées une semaine avant l'injection dans plusieurs flasques de 75 ml afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules.

La semaine suivante, les cellules à confluence sont récupérées selon le protocole suivant :

- Travailler sous hotte stérile.
- Aspirer le milieu de culture.
- Rincer le tapis cellulaire avec 5 ml de D-PBS1X.
- Aspirer le D-PBS 1X.
- Déposer 3 ml de trypsine-EDTA (Invitrogen) sur le tapis cellulaire.
- Laisser agir dans l'étuve à 37 °C pendant 5 min.
- Inhiber la trypsine-EDTA par un ajout de 10 ml de milieu RPMI.
- Aspirer la suspension cellulaire et la mettre dans un tube de 15 ml.

- Centrifuger 5 min à 1500 tr/min.
- Eliminer le surnageant.
- Reprendre le culot cellulaire par 1 ml de RPMI.
- Compter les cellules sur lame de Malassez (cf. page 161).
- Mettre le volume de milieu correspondant à 4.10^6 cellules dans un tube stérile contenant 150 μ l de RPMI complet. Ce volume correspond à une injection pour une souris.
- Injecter 300 μ l d'un mélange 50 % cellules et 50 % Matrigel (BD 354262 BD Biosciences) au niveau du flanc d'une souris immunodéficente SCID (Severe combined immunodeficiency) (C57BL/6) âgée de 4 à 8 semaines. 10 souris sont réalisées par clones (total de 60 animaux).
- Ces souris sont ensuite hébergées au sein de l'Animalerie High Technology de l'IMPRT/IFR114 Université Lille 2, dans des conditions standard à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, avec des cycles de 14 h de lumière et de 10 h d'obscurité, ainsi qu'une alimentation standard *ad libitum*.

6 REFERENCES

- Abnet, C. C., N. D. Freedman, et al. (2008). "A prospective study of BMI and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma." Eur J Cancer **44**(3): 465-71.
- Anderson, L. A., S. J. Murphy, et al. (2008). "Relationship between Helicobacter pylori infection and gastric atrophy and the stages of the oesophageal inflammation, metaplasia, adenocarcinoma sequence: results from the FINBAR case-control study." Gut **57**(6): 734-9.
- Arul, G. S., M. Moorghen, et al. (2000). "Mucin gene expression in Barrett's oesophagus: an in situ hybridisation and immunohistochemical study." Gut **47**(6): 753-61.
- Attwood, S. E., T. C. Smyrk, et al. (1992). "Duodeno-oesophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats." Surgery **111**(5): 503-10.
- Bonde, P., G. Sui, et al. (2007). "Cytogenetic characterization and gene expression profiling in the rat reflux-induced esophageal tumor model." J Thorac Cardiovasc Surg **133**(3): 763-9.
- Brabender J, M. P., Salonga D (2004). "A multigene expression panel for the molecular diagnosis of Barrett's esophagus and Barrett's adenocarcinoma of the esophagus." Oncogene **23**: 4780-4788.
- Bremner, C. G., V. P. Lynch, et al. (1970). "Barrett's esophagus: congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog." Surgery **68**(1): 209-16.
- Bruyere, E., N. Jonckheere, et al. (2011). "The MUC4 membrane-bound mucin regulates esophageal cancer cell proliferation and migration properties: Implication for S100A4 protein." Biochem Biophys Res Commun **413**(2): 325-9.
- Buskens, C. J., J. B. Hulscher, et al. (2006). "Histopathologic evaluation of an animal model for Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the distal esophagus." J Surg Res **135**(2): 337-44.
- Buttar, N. S., K. K. Wang, et al. (2002). "Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus." Gastroenterology **122**(4): 1101-12.
- Carraway, K. L., 3rd, M. Funes, et al. (2007). "Contribution of membrane mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways." Curr Top Dev Biol **78**: 1-22.

- Carraway, K. L., V. P. Ramsauer, et al. (2002). "Cell signaling through membrane mucins." BioEssays **25**(1): 66-71.
- Carraway, K. L., V. P. Ramsauer, et al. (2003). "Cell signaling through membrane mucins." Bioessays **25**(1): 66-71.
- Carstens, M. J., A. Krempler, et al. (2004). "Cell cycle arrest and cell death are controlled by p53-dependent and p53-independent mechanisms in Tsg101-deficient cells." J Biol Chem **279**(34): 35984-94.
- Chen, K. H., K. Mukaisho, et al. (2007). "High animal-fat intake changes the bile-acid composition of bile juice and enhances the development of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma in a rat duodenal-contents reflux model." Cancer Sci **98**(11): 1683-8.
- Chen, X., G. Yang, et al. (1999). "An esophagogastroduodenal anastomosis model for esophageal adenocarcinogenesis in rats and enhancement by iron overload." Carcinogenesis **20**(9): 1801-8.
- Collet D, M. C., Meunier B (2013). "Cancer de l'oesophage." Monographie de l'association française de chirurgie.
- Colleypriest, B. J., S. G. Ward, et al. (2009). "How does inflammation cause Barrett's metaplasia?" Curr Opin Pharmacol **9**(6): 721-6.
- Cook, M. B., F. Kamangar, et al. (2010). "Cigarette smoking and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction: a pooled analysis from the international BEACON consortium." J Natl Cancer Inst **102**(17): 1344-53.
- Corfield, A. P., D. Carroll, et al. (2001). "Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease." Front Biosci **6**: D1321-57.
- Corley, D. A., A. Kubo, et al. (2008). "Abdominal obesity and the risk of esophageal and gastric cardia carcinomas." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(2): 352-8.
- Corley, D. A., T. R. Levin, et al. (2002). "Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: a population-based study." Gastroenterology **122**(3): 633-40.
- Daly, J. M., W. A. Fry, et al. (2000). "Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study." J Am Coll Surg **190**(5): 562-72; discussion 572-3.
- Debruyne, P. R., E. A. Bruyneel, et al. (2001). "The role of bile acids in carcinogenesis." Mutat Res **480-481**: 359-69.
- DeMeester, T. R. (2001). "Clinical biology of the Barrett's metaplasia, dysplasia to carcinoma sequence." Surg Oncol **10**(3): 91-102.

- Edelstein, Z. R., D. C. Farrow, et al. (2007). "Central adiposity and risk of Barrett's esophagus." Gastroenterology **133**(2): 403-11.
- Edgren, G., H. O. Adami, et al. (2013). "A global assessment of the oesophageal adenocarcinoma epidemic." Gut.
- Engel, L. S., W. H. Chow, et al. (2003). "Population attributable risks of esophageal and gastric cancers." J Natl Cancer Inst **95**(18): 1404-13.
- Faivre, J., C. Lepage, et al. (2005). "[Recent data on the epidemiology of esophageal cancer]." Gastroenterol Clin Biol **29**(5): 534-9.
- Falk GW, R. T., Goldblum JR, Richter JE. (1999). "Jumbo biopsy forceps protocol still misses unsuspected cancer in Barrett's esophagus with high grade dysplasia." Gastrointest Endosc **49**: 170-6.
- Fein, M., K. H. Fuchs, et al. (2000). "Evaluation of the intestinal microflora in the rat model for esophageal adenocarcinoma." Dis Esophagus **13**(1): 39-43.
- Fein, M., J. Maroske, et al. (2006). "Importance of duodenogastric reflux in gastro-oesophageal reflux disease." Br J Surg **93**(12): 1475-82.
- Ferlay, J., D. M. Parkin, et al. (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." Eur J Cancer **46**(4): 765-81.
- Fitzgerald, R. C. (2005). "Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: how does acid interfere with cell proliferation and differentiation?" Gut **54 Suppl 1**: i21-6.
- Fitzgerald RC, A. S., Onwuegbusi BA (2002). "Inflammatory gradient in Barrett's oesophagus: implications for disease complications." Gut **51**: 316-22.
- Flejou, J. F. (2005). "Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer." Gut **54 Suppl 1**: i6-12.
- Fortuny, J., C. C. Johnson, et al. (2007). "Use of anti-inflammatory drugs and lower esophageal sphincter-relaxing drugs and risk of esophageal and gastric cancers." Clin Gastroenterol Hepatol **5**(10): 1154-1159 e3.
- Frisa, P. S. and J. W. Jacobberger (2010). "Cytometry of chromatin bound Mcm6 and PCNA identifies two states in G1 that are separated functionally by the G1 restriction point." BMC Cell Biol **11**: 26.
- Garcia Rodriguez, L. A., J. Lagergren, et al. (2006). "Gastric acid suppression and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma: a nested case control study in the UK." Gut **55**(11): 1538-44.

- Garman, K. S., R. C. Orlando, et al. (2012). "Review: Experimental models for Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **302**(11): G1231-43.
- Gauchotte, G., C. Vigouroux, et al. (2012). "Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome." Am J Surg Pathol **36**(2): 283-91.
- Gibson, M. K., A. H. Zaidi, et al. (2013). "Prevention of Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma by smoothed inhibitor in a rat model of gastroesophageal reflux disease." Ann Surg **258**(1): 82-8.
- Gillen, P., M. McDermott, et al. (1994). "Proliferating cell nuclear antigen in the assessment of Barrett's mucosa." Br J Surg **81**(12): 1766-8.
- Glickman, J. N., P. L. Blount, et al. (2006). "Mucin core polypeptide expression in the progression of neoplasia in Barrett's esophagus." Hum Pathol **37**(10): 1304-15.
- Goldblum JR, V. J., Falk GW (1998). "Inflammation and intestinal metaplasia of the gastric cardia: the role of gastroesophageal reflux and H pylori infection." Gastroenterology **114**(633-639).
- Goldstein, S. R., G. Y. Yang, et al. (1997). "Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen." Carcinogenesis **18**(11): 2265-70.
- Gronnier, C., E. Bruyere, et al. (2013). "Operatively induced chronic reflux in rats: A suitable model for studying esophageal carcinogenesis?" Surgery **154**(5): 955-67.
- Guillem, P., V. Billeret, et al. (2000). "Mucin gene expression and cell differentiation in human normal, premalignant and malignant esophagus." Int J Cancer **88**(6): 856-61.
- Hansen, S., S. E. Vollset, et al. (2007). "Two distinct aetiologies of cardia cancer; evidence from premorbid serological markers of gastric atrophy and Helicobacter pylori status." Gut **56**(7): 918-25.
- Hao, J., B. Liu, et al. (2009). "Gastroesophageal reflux leads to esophageal cancer in a surgical model with mice." BMC Gastroenterol **9**: 59.
- Harrison RF, P. I., Jankowski JA (2000). "Barrett's mucosa: remodelling by the microenvironment." J Pathol **192**: 1-3.
- Helm J , E. S., Coppola D, Barthel JS, Kelley ST, Yeatman TJ. (2005). "Dedifferentiation precedes invasion in the progression from Barrett's metaplasia to esophageal adenocarcinoma." Clin Cancer Res **11**: 2478 -2485.

- Ho, J. J. and Y. S. Kim (1994). "Serological pancreatic tumor markers and the MUC1 apomucin." Pancreas **9**(6): 674-91.
- Hollingsworth, M. A. and B. J. Swanson (2004). "Mucins in cancer: protection and control of the cell surface." Nat Rev Cancer **4**(1): 45-60.
- Holmes, R. S. and T. L. Vaughan (2007). "Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer." Semin Radiat Oncol **17**(1): 2-9.
- Hoshino, M., A. Sundaram, et al. (2011). "Role of the lower esophageal sphincter on acid exposure revisited with high-resolution manometry." J Am Coll Surg **213**(6): 743-50.
- Hoyo, C., M. B. Cook, et al. (2012). "Body mass index in relation to oesophageal and oesophagogastric junction adenocarcinomas: a pooled analysis from the International BEACON Consortium." Int J Epidemiol **41**(6): 1706-18.
- Hsu SF, G. Y., Tsai HY, Lin R, L RT, Cheng JT (2012). "An upstream regulatory element confers orientation-independent enhancement of the TSG 101 promoter activity." Mol Biol Rep(39): 517-525.
- Hu, Y., C. Jones, et al. (2007). "Pathogenesis of Barrett esophagus: deoxycholic acid up-regulates goblet-specific gene MUC2 in concert with CDX2 in human esophageal cells." Arch Surg **142**(6): 540-4; discussion 544-5.
- Huang Q, H. L. (2010). "Biomarkers in Barrett's oesophagus." Biochem Soc Trans **38**(2): 343-347.
- Hur, C., M. Miller, et al. (2013). "Trends in esophageal adenocarcinoma incidence and mortality." Cancer **119**(6): 1149-58.
- Illig, R., E. Klieser, et al. (2013). "GERD-Barrett-Adenocarcinoma: Do We Have Suitable Prognostic and Predictive Molecular Markers?" Gastroenterol Res Pract **2013**: 643084.
- Ireland, A. P., J. H. Peters, et al. (1996). "Gastric juice protects against the development of esophageal adenocarcinoma in the rat." Ann Surg **224**(3): 358-70; discussion 370-1.
- Ishikawa N, W. D., Mahida YR. (1997). "Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. ." Gastroenterology **113**(542-549).
- Jaiswal K, M. C., Feagins LA (2007). "Charaterisation of telomerase-immortalized, noneoplastic, human Barrett's cell line (BAR-T)." Dis Esophagus **20**: 256-264.
- Jang, T. J., S. K. Min, et al. (2004). "Expression of cyclooxygenase 2, microsomal prostaglandin E synthase 1, and EP receptors is increased in rat oesophageal squamous cell dysplasia and Barrett's metaplasia induced by duodenal contents reflux." Gut **53**(1): 27-33.

- Jankowski, J., D. Hopwood, et al. (1993). "Increased expression of epidermal growth factor receptors in Barrett's esophagus associated with alkaline reflux: a putative model for carcinogenesis." Am J Gastroenterol **88**(3): 402-8.
- Jankowski, J. A., R. F. Harrison, et al. (2000). "Barrett's metaplasia." Lancet **356**(9247): 2079-85.
- Jankowski, J. A., D. Provenzale, et al. (2002). "Esophageal adenocarcinoma arising from Barrett's metaplasia has regional variations in the west." Gastroenterology **122**(2): 588-90.
- Jankowski, J. A., N. A. Wright, et al. (1999). "Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus." Am J Pathol **154**(4): 965-73.
- Jaskiewicz, K., H. D. Louwrens, et al. (1989). "Oesophageal mucosal pathology in a population at risk for gastric and oesophageal carcinoma." Anticancer Res **9**(4): 1191-5.
- Jenkins, G. J., S. H. Doak, et al. (2002). "Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma." Br J Surg **89**(7): 824-37.
- Jonckheere, N., N. Skrypek, et al. (2013). "Membrane-bound mucin modular domains: from structure to function." Biochimie **95**(6): 1077-86.
- Jonckheere, N. and I. Van Seuningen (2008). "The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies." Crit Rev Oncog **14**(2-3): 177-96.
- Jonckheere, N. and I. Van Seuningen (2010). "The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers." Biochimie **92**(1): 1-11.
- Kahrilas, P. J., W. J. Dodds, et al. (1987). "Effect of sleep, spontaneous gastroesophageal reflux, and a meal on upper esophageal sphincter pressure in normal human volunteers." Gastroenterology **92**(2): 466-71.
- Kauer, W. K., J. H. Peters, et al. (1997). "Composition and concentration of bile acid reflux into the esophagus of patients with gastroesophageal reflux disease." Surgery **122**(5): 874-81.
- Kaur, B. S., R. Ouatu-Lascar, et al. (2000). "Bile salts induce or blunt cell proliferation in Barrett's esophagus in an acid-dependent fashion." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **278**(6): G1000-9.
- Kazumori, H., S. Ishihara, et al. (2006). "Bile acids directly augment caudal related homeobox gene Cdx2 expression in oesophageal keratinocytes in Barrett's epithelium." Gut **55**(1): 16-25.

- Keswani, R. N., A. Noffsinger, et al. (2006). "Clinical use of p53 in Barrett's esophagus." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(7): 1243-9.
- Koek, G. H., D. Sifrim, et al. (2008). "Multivariate analysis of the association of acid and duodeno-gastro-oesophageal reflux exposure with the presence of oesophagitis, the severity of oesophagitis and Barrett's oesophagus." Gut **57**(8): 1056-64.
- Kubo, A. and D. A. Corley (2007). "Meta-analysis of antioxidant intake and the risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma." Am J Gastroenterol **102**(10): 2323-30; quiz 2331.
- Kubo, A., D. A. Corley, et al. (2010). "Dietary factors and the risks of oesophageal adenocarcinoma and Barrett's oesophagus." Nutr Res Rev **23**(2): 230-46.
- Kufe, D. W. (2009). "Mucins in cancer: function, prognosis and therapy." Nat Rev Cancer **9**(12): 874-85.
- Kumagai, H., K. Mukaisho, et al. (2003). "Cell kinetic study on histogenesis of Barrett's esophagus using rat reflux model." Scand J Gastroenterol **38**(7): 687-92.
- Kyrgidis, A., J. Kountouras, et al. (2005). "New molecular concepts of Barrett's esophagus: clinical implications and biomarkers." J Surg Res **125**(2): 189-212.
- Lagarde, S. M., J. B. Reitsma, et al. (2007). "Prognostic nomogram for patients undergoing oesophagectomy for adenocarcinoma of the oesophagus or gastro-oesophageal junction." Br J Surg **94**(11): 1361-8.
- Lagarde SM, t. K. F., Richel DJ, Offerhaus GJ, Van Lanschot JJ (2007). "Molecular prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction." ann surg oncol **14** 977-991.
- Lagergren, J., R. Bergstrom, et al. (2000). "Association between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk for esophageal adenocarcinoma." Ann Intern Med **133**(3): 165-75.
- Lagergren, J., R. Bergstrom, et al. (1999). "Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma." N Engl J Med **340**(11): 825-31.
- Lagergren, J. and P. Lagergren (2013). "Recent developments in esophageal adenocarcinoma." CA Cancer J Clin **63**(4): 232-48.
- Lagergren, J. and F. Mattsson (2011). "No further increase in the incidence of esophageal adenocarcinoma in Sweden." Int J Cancer **129**(2): 513-6.
- Lee HM, T. K., Dabbagh , Lausier JA, Ueki IF, Nadel JA (2000). "Agarose plug instillation causes goblet cell metaplasia by activating RGF receptors in rat airways. ." am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **278**: 185-192.

- Lepage, C. D., A; Jouve J-L; Faivre J (2013). "Epidemiology and risk factors for oesophageal adenocarcinoma." Dig Dis Liv **45**(8): 625-629.
- Liu, D. C., Z. L. Yang, et al. (2011). "Identification of PEG10 and TSG101 as carcinogenesis, progression, and poor-prognosis related biomarkers for gallbladder adenocarcinoma." Pathol Oncol Res **17**(4): 859-66.
- Lubin, J. H., M. B. Cook, et al. (2012). "The importance of exposure rate on odds ratios by cigarette smoking and alcohol consumption for esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in the Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma Consortium." Cancer Epidemiol **36**(3): 306-16.
- Luketich, J. D., A. Pennathur, et al. (2012). "Outcomes after minimally invasive esophagectomy: review of over 1000 patients." Ann Surg **256**(1): 95-103.
- Mabrut J.-Y., B. J.-M., Mezoughi S., Ducerf C. (2013). "Endobrachyoesophage : diagnostic et prise en charge thérapeutique." Monographie de l'association française de chirurgie: 25-31.
- Macke, R. A., K. S. Nason, et al. (2011). "Barrett's esophagus and animal models." Ann N Y Acad Sci **1232**: 392-400.
- Maley, C. C. (2007). "Multistage carcinogenesis in Barrett's esophagus." Cancer Lett **245**(1-2): 22-32.
- Mariette, C., M. Perrais, et al. (2004). "Transcriptional regulation of human mucin MUC4 by bile acids in oesophageal cancer cells is promoter-dependent and involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway." Biochem J **377**(Pt 3): 701-8.
- Mariette C, P. G., Balon JM, Van Seuning I, Triboulet JP (2004). "Surgery alone in the curative treatment of localised oesophageal carcinoma." Eur J Surg Oncol **377**: 701-708.
- Mariette, C., G. Piessen, et al. (2011). "Oesophagogastric junction adenocarcinoma: which therapeutic approach?" Lancet Oncol **12**(3): 296-305.
- Mariette, C., G. Piessen, et al. (2008). "Activation of MUC1 mucin expression by bile acids in human esophageal adenocarcinomatous cells and tissues is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase." Surgery **143**(1): 58-71.
- Mariette, C., G. Piessen, et al. (2007). "Therapeutic strategies in oesophageal carcinoma: role of surgery and other modalities." Lancet Oncol **8**(6): 545-53.
- Marsman WA, B. C., Wesseling JG (2004). "Gene therapy for esophageal carcinoma: the use of an explant model to test adenoviral vectors *ex vivo*." Cancer gene Ther **11**: 289-296.

- Martin Fein, K. H. F., Manfred P. Ritter, Stefan M. Freys, Johannes Heimbucher, Christian Saab, Arnulf Thiede (1998). "Application of the new classification for cancer of the cardia." Surgery **124**(4): 707-714.
- Mayne, S. T. and S. A. Navarro (2002). "Diet, obesity and reflux in the etiology of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in humans." J Nutr **132**(11 Suppl): 3467S-3470S.
- Melo, L. L., C. D. Kruel, et al. (1999). "Influence of surgically induced gastric and gastroduodenal content reflux on esophageal carcinogenesis--experimental model in Wistar female rats." Dis Esophagus **12**(2): 106-15.
- Mirvish, S. S. (1997). "Studies on experimental animals involving surgical procedures and/or nitrosamine treatment related to the etiology of esophageal adenocarcinoma." Cancer Lett **117**(2): 161-74.
- Miwa, K., H. Sahara, et al. (1996). "Reflux of duodenal or gastro-duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats." Int J Cancer **67**(2): 269-74.
- Miyashita, T., T. Ohta, et al. (2006). "Duodenal juice stimulates oesophageal stem cells to induce Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma in rats." Oncol Rep **15**(6): 1469-75.
- Moniaux N , E. F., Porchet N, Aubert JP, Batra SK (2001). "Structural organization and classification of the human mucin genes." Front Biosci **6**: 1192-1206.
- Montgomery E, H. D., Carr NJ, Holterman DA, Sobin LH, Azumi N (1996). "Barrett esophagus with dysplasia. Flow cytometric DNA analysis of routine, paraffin-embedded mucosal biopsies." Am J Clin Pathol: 298-304.
- Montgomery, E. B. M. G. J. (2001). "Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus: a reaffirmation. ." Hum Pathol **32**: 368-378.
- Moore, K. H., P. Barry, et al. (2001). "Adenocarcinoma of the rat esophagus in the presence of a proton pump inhibitor: a pilot study." Dis Esophagus **14**(1): 17-22.
- Morales CP, L. E., Shay JW (1998). "In situ hybridization for the detection of telomerase RNA in the progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. ." Cancer **83**: 652-659.
- Morales CP, S. R., Spechler SJ (2002). "Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus " Lancet: 1587-1589.
- Naya MJ, P. D., Ortego J, Alda JO, Lanás A (1997). "Superoxide anions produced by inflammatory cells play an important part in the pathogenesis of acid and pepsin induced oesophagitis in rabbits." Gut **40**(175-181).

- Nehra, D., P. Howell, et al. (1998). "Assessment of combined bile acid and pH profiles using an automated sampling device in gastro-oesophageal reflux disease." Br J Surg **85**(1): 134-7.
- Nehra, D., P. Howell, et al. (1999). "Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity." Gut **44**(5): 598-602.
- O'Doherty, M. G., N. D. Freedman, et al. (2012). "A prospective cohort study of obesity and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma in the NIH-AARP Diet and Health Study." Gut **61**(9): 1261-8.
- Oberg, S., R. V. Lord, et al. (2000). "Is adenocarcinoma following esophagoduodenostomy without carcinogen in the rat reflux-induced?" J Surg Res **91**(2): 111-7.
- Ochs-Balcom, H. M., G. Falk, et al. (2007). "Consortium approach to identifying genes for Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma." Transl Res **150**(1): 3-17.
- Okines, A. F. and D. Cunningham (2012). "Trastuzumab: a novel standard option for patients with HER-2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer." Therap Adv Gastroenterol **5**(5): 301-18.
- Olsen, C. M., N. Pandeya, et al. (2011). "Population attributable fractions of adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction." Am J Epidemiol **174**(5): 582-90.
- Orloff, M., C. Peterson, et al. (2011). "Germline mutations in MSR1, ASCC1, and CTHRC1 in patients with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma." JAMA **306**(4): 410-9.
- Oyama, K., T. Fujimura, et al. (2005). "A COX-2 inhibitor prevents the esophageal inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence in rats." Carcinogenesis **26**(3): 565-70.
- Pandeya, N., P. M. Webb, et al. (2010). "Gastro-oesophageal reflux symptoms and the risks of oesophageal cancer: are the effects modified by smoking, NSAIDs or acid suppressants?" Gut **59**(1): 31-8.
- Pera, M. (2000). "Duodenal-content reflux esophagitis induces the development of glandular metaplasia and adenosquamous carcinoma in rats." Carcinogenesis **21**(8): 1587-91.
- Pera, M., M. J. Brito, et al. (2000). "Duodenal-content reflux esophagitis induces the development of glandular metaplasia and adenosquamous carcinoma in rats." Carcinogenesis **21**(8): 1587-91.
- Pera, M., C. de Bolos, et al. (2007). "Duodenal-content reflux into the esophagus leads to expression of Cdx2 and Muc2 in areas of squamous epithelium in rats." J Gastrointest Surg **11**(7): 869-74.

- Piessen, G., N. Jonckheere, et al. (2007). "Regulation of the human mucin MUC4 by taurodeoxycholic and taurochenodeoxycholic bile acids in oesophageal cancer cells is mediated by hepatocyte nuclear factor 1alpha." Biochem J **402**(1): 81-91.
- Piessen, G., A. Wacrenier, et al. (2009). "Clinical impact of MUC1 and MUC4 expression in Barrett-associated oesophageal adenocarcinoma." J Clin Pathol **62**(12): 1144-6.
- Pigny, P., V. Guyonnet-Duperat, et al. (1996). "Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes." Genomics **38**(3): 340-52.
- Podevin, P., O. Rosmorduc, et al. (1999). "Bile acids modulate the interferon signalling pathway." Hepatology **29**(6): 1840-7.
- Pohl, H., B. Sirovich, et al. (2010). "Esophageal adenocarcinoma incidence: are we reaching the peak?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(6): 1468-70.
- Pohl, H. and H. G. Welch (2005). "The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence." J Natl Cancer Inst **97**(2): 142-6.
- Porchet, N. and J. P. Aubert (2004). "[MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]." Med Sci (Paris) **20**(5): 569-74.
- Prach, A. T., T. A. MacDonald, et al. (1997). "Increasing incidence of Barrett's oesophagus: education, enthusiasm, or epidemiology?" Lancet **350**(9082): 933.
- Raouf AA, E. D., Carton E, Mulligan E, griffin MM, Reynolds JV. (2003). "Loss of Bcl-2 expression in Barrett's dysplasi and adencarcinoma is associated with tumor progression and worse survival but not with response to neoadjuvant chemoradiation." Dis Esophagus(17-23).
- Ren, J., Y. Li, et al. (2002). "Protein kinase C delta regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in beta-catenin signaling." J Biol Chem **277**(20): 17616-22.
- Ren, J., D. Raina, et al. (2006). "MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling." Mol Cancer Res **4**(11): 873-83.
- Rehnan, A. G., M. Tyson, et al. (2008). "Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies." Lancet **371**(9612): 569-78.
- Richter, J. E. (2000). "Importance of bile reflux in Barrett's esophagus." Dig Dis **18**(4): 208-16.
- Rubenstein, J. H. and J. B. Taylor (2010). "Meta-analysis: the association of oesophageal adenocarcinoma with symptoms of gastro-oesophageal reflux." Aliment Pharmacol Ther **32**(10): 1222-7.
- Sakuramoto, S., M. Sasako, et al. (2007). "Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine." N Engl J Med **357**(18): 1810-20.

- Sampliner, R. E. (2002). "Updated guidelines for the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus." Am J Gastroenterol **97**(8): 1888-95.
- Sarosi, G., G. Brown, et al. (2008). "Bone marrow progenitor cells contribute to esophageal regeneration and metaplasia in a rat model of Barrett's esophagus." Dis Esophagus **21**(1): 43-50.
- Sato, T., K. Miwa, et al. (2002). "The sequential model of Barrett's esophagus and adenocarcinoma induced by duodeno-esophageal reflux without exogenous carcinogens." Anticancer Res **22**(1A): 39-44.
- Satoh, S., Y. Hinoda, et al. (2000). "Enhancement of metastatic properties of pancreatic cancer cells by MUC1 gene encoding an anti-adhesion molecule." Int J Cancer **88**(4): 507-18.
- Schmidt, H. G., R. H. Riddell, et al. (1985). "Dysplasia in Barrett's esophagus." J Cancer Res Clin Oncol **110**(2): 145-52.
- Schnell TG, S. S., Chejfec G. (2001). "Long-term non surgical management of Barrett's esophagus with high grade dyslasia." Gastroenterology **120**: 1607-1619.
- Schroeder, J. A., M. C. Thompson, et al. (2001). "Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland." J Biol Chem **276**(16): 13057-64.
- Shaheen, N. and D. F. Ransohoff (2002). "Gastroesophageal reflux, Barrett esophagus, and esophageal cancer: clinical applications." Jama **287**(15): 1982-6.
- Shirvani VN, O.-L. R., Kaur BS, Omary MB, Tridafilopoulos G (2000). "Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: ex vivo induction by ile sats and acid exposure." Gastroenterology **118**: 487-496.
- Singh, P. K. and M. A. Hollingsworth (2006). "Cell surface-associated mucins in signal transduction." Trends Cell Biol **16**(9): 467-76.
- Skacel M; Petras RE, G. T. S. J. R. J. G. J. (2000). "The diagnosis of low-grade dysplasia in Barrett's esophagus nd its implication for disease progression." Am J Gastroenterol **95**: 3383-3387.
- Solaymani-Dodaran, M., R. F. Logan, et al. (2004). "Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux." Gut **53**(8): 1070-4.
- Sommerer, F., M. Vieth, et al. (2004). "Mutations of BRAF and KRAS2 in the development of Barrett's adenocarcinoma." Oncogene **23**(2): 554-8.
- Souza RF, M. C., Spechler SJ (2001). "Review article: a conceptual approach to understanding the molecular mechanisms of cancer development in Barrett's oesophagus. ." Aliment Pharmacol Ther **15**: 1087.

- Streitz, J. M., Jr., C. W. Andrews, Jr., et al. (1993). "Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus. Does it help?" J Thorac Cardiovasc Surg **105**(3): 383-7; discussion 387-8.
- Su, Y., X. Chen, et al. (2004). "Phenotype of columnar-lined esophagus in rats with esophagogastrroduodenal anastomosis: similarity to human Barrett's esophagus." Lab Invest **84**(6): 753-65.
- Szentpali, K., M. Szell, et al. (2007). "Simultaneous adeno- and squamous cell carcinoma with different phenotypic profiles in a rat model of chronic gastroesophageal reflux." Dis Esophagus **20**(4): 305-10.
- Tack, J., G. Koek, et al. (2004). "Gastroesophageal reflux disease poorly responsive to single-dose proton pump inhibitors in patients without Barrett's esophagus: acid reflux, bile reflux, or both?" Am J Gastroenterol **99**(6): 981-8.
- Theisen, J., J. H. Peters, et al. (2005). "The mutagenic potential of duodeno-esophageal reflux." Ann Surg **241**(1): 63-8.
- TNCD (2013). "Thésaurus de cancérologie digestive . Cancer de l'oesophage." www.tncd.org.
- Triadafilopoulos, G. (2000). "Proton pump inhibitors for Barrett's oesophagus." Gut **46**(2): 144-6.
- Tselepis, C., C. D. Morris, et al. (2003). "Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid in vitro." Gut **52**(2): 174-80.
- Tseng EE, W. T., Yeo CJ, Heitmiller RF (2003). "Barrett's esophagus with high grade dysplasia: surgical results and long term outcomes -- an update." J Gastrointest Surg **7**: 164-170.
- Turati, F., I. Tramacere, et al. (2013). "A meta-analysis of body mass index and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma." Ann Oncol **24**(3): 609-17.
- van de Wiel-van Kemenade, E., M. J. Ligtenberg, et al. (1993). "Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction." J Immunol **151**(2): 767-76.
- van den Brandt, P. A. and R. A. Goldbohm (2006). "Nutrition in the prevention of gastrointestinal cancer." Best Pract Res Clin Gastroenterol **20**(3): 589-603.
- van der Sluis, M., M. H. Melis, et al. (2004). "The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells." Biochem Biophys Res Commun **325**(3): 952-60.
- van Kruijsdijk, R. C., E. van der Wall, et al. (2009). "Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(10): 2569-78.
- van Meijgaard, J. and J. E. Fielding (2012). "Estimating benefits of past, current, and future reductions in smoking rates using a comprehensive model with competing causes of death." Prev Chronic Dis **9**: E122.

- van Sandick, J. W., J. J. van Lanschot, et al. (1998). "Impact of endoscopic biopsy surveillance of Barrett's oesophagus on pathological stage and clinical outcome of Barrett's carcinoma." Gut **43**(2): 216-22.
- Van Seuning, I., P. Pigny, et al. (2001). "Transcriptional regulation of the 11p15 mucin genes. Towards new biological tools in human therapy, in inflammatory diseases and cancer?" Front Biosci **6**: D1216-34.
- Warson, C., J. H. Van De Bovenkamp, et al. (2002). "Barrett's esophagus is characterized by expression of gastric-type mucins (MUC5AC, MUC6) and TFF peptides (TFF1 and TFF2), but the risk of carcinoma development may be indicated by the intestinal-type mucin, MUC2." Hum Pathol **33**(6): 660-8.
- Watson, A. (2000). "Barrett's oesophagus--50 years on." Br J Surg **87**(5): 529-31.
- Wijnhoven, B. P., H. W. Tilanus, et al. (2001). "Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma." Ann Surg **233**(3): 322-37.
- Wild, C. P. and L. J. Hardie (2003). "Reflux, Barrett's oesophagus and adenocarcinoma: burning questions." Nat Rev Cancer **3**(9): 676-84.
- Williams, L. J., D. L. Guernsey, et al. (2006). "Biomarkers in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma." Curr Oncol **13**(1): 33-43.
- Winberg A, L. M., Langergren J, Dahlstrand H (2012). "Risk factors and chemoprevention in Barrett's esophagus - an update." Scand J Gastroenterol **47**: 397- 406.
- Wright, T. A., M. R. Gray, et al. (1996). "Cost effectiveness of detecting Barrett's cancer." Gut **39**(4): 574-9.
- Xu, X., J. LoCicero, 3rd, et al. (2000). "Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma in a mouse surgical model." J Surg Res **88**(2): 120-4.

7 NOTES

