



**HAL**  
open science

# Développement de vecteurs ciblants pour la détection et la thérapie des tumeurs

Anastassia Karageorgis

► **To cite this version:**

Anastassia Karageorgis. Développement de vecteurs ciblants pour la détection et la thérapie des tumeurs. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENV004 . tel-01553443

**HAL Id: tel-01553443**

**<https://theses.hal.science/tel-01553443>**

Submitted on 3 Jul 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Anastassia KARAGEORGIS**

Thèse dirigée par **Michel SEVE**

codirigée par **Jean-Luc COLL**

préparée au sein du **Centre de Recherche INSERM / UJF U823 à l'Institut Albert Bonniot**

dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du vivant**

# Développement de vecteurs ciblés pour la détection et la thérapie des tumeurs

Thèse soutenue publiquement le **21 janvier 2014**,  
devant le jury composé de :

**Monsieur Stéphane ROUX**

Professeur, Besançon, Président

**Madame Muriel GOLZIO**

Chargée de Recherche, Toulouse, Rapporteur

**Monsieur Olivier CHASSANDE**

Chargé de Recherche, Bordeaux, Rapporteur

**Monsieur Christian VILLIERS**

Chargé de Recherche, Grenoble, Membre

**Monsieur Jean-Luc COLL**

Directeur de Recherche, Grenoble, Membre

**Monsieur Michel SEVE**

Professeur, Grenoble, Membre



## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Anastassia KARAGEORGIS**

Thèse dirigée par **Michel SEVE**

codirigée par **Jean-Luc COLL**

préparée au sein du **Centre de Recherche INSERM / UJF U823 à l'Institut Albert Bonniot**

dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du vivant**

# Développement de vecteurs ciblés pour la détection et la thérapie des tumeurs

Thèse soutenue publiquement le **21 janvier 2014**,  
devant le jury composé de :

**Monsieur Stéphane ROUX**

Professeur, Besançon, Président

**Madame Muriel GOLZIO**

Chargée de Recherche, Toulouse, Rapporteur

**Monsieur Olivier CHASSANDE**

Chargé de Recherche, Bordeaux, Rapporteur

**Monsieur Christian VILLIERS**

Chargé de Recherche, Grenoble, Membre

**Monsieur Jean-Luc COLL**

Directeur de Recherche, Grenoble, Membre

**Monsieur Michel SEVE**

Professeur, Grenoble, Membre



« Ηλπίζε το ανελπιστο  
αν θελης να  
το ευρης »

(« Espère l'inespérable si tu veux l'atteindre »)

Ηρακλιτος (Héraclite),  
6e siècle. av. J.C



*Au terme de ces intenses années de travail au sein de l'Institut Albert Bonniot,  
je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin  
à l'aboutissement de ce travail.*

Je remercie **l'Université Joseph Fourier** pour avoir financé mes travaux de recherche pendant trois ans.

Je remercie les membres de mon jury de Thèse qui ont accepté de consacrer une partie de leur temps pour juger ce travail.

**Monsieur le Professeur Stéphane Roux, Président du Jury de Thèse**

Monsieur,

C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté de présider le Jury de ma Thèse.

Je vous prie de croire en ma respectueuse reconnaissance.

**Madame le Docteur Muriel Golzio et Monsieur le Docteur Olivier Chassande,  
Rapporteurs de Thèse**

Madame, Monsieur,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de juger ce travail.

Je vous prie de croire en ma profonde gratitude.

**Monsieur le Professeur Michel Sève, Directeur de Thèse**

Monsieur,

Vous avez été mon Professeur à la Faculté de Pharmacie et en Master.

Vous avez présidé le Jury de ma Thèse de Pharmacie.

Vous avez été le Directeur de ma Thèse de Sciences.

C'est un honneur pour moi.

Je vous fais part de mon profond respect.

**Monsieur le Docteur Jean-Luc Coll, Directeur scientifique de Thèse**

Monsieur,

Je vous remercie d'avoir accepté de devenir le Directeur scientifique de ma Thèse en cours de route malgré votre emploi du temps surchargé.

Vous m'avez accueillie, aidée, guidée, supervisée.

Vous m'avez permis de publier, participer à des congrès, présenter des posters.

Vous m'avez conseillée et avez relu et corrigé mes écrits.

Je vous suis profondément reconnaissante.

Je remercie le **Docteur Pierre Savatier** et le **Docteur Pascal Fender** pour le temps consacré et leurs conseils en tant que membres de mon Comité de suivi de Thèse.

Je remercie **le Docteur Claire Rome** pour m'avoir accueillie dans son « groupe » en Master 2 et en première année de Thèse. L'évolution de sa carrière nous a séparées. Je garderai son souvenir.

Je tiens à remercier sincèrement tous les membres de **l'équipe 2+5 de l'IAB**

Mes collègues de bureau **Sandrine Dufort, Daphné, Julien, Maxime, Jonathan, Mélanie, Victor, Yoon** et ceux des bureaux voisins **Amandine, Véronique, Sylvie, Béatrice, Michelle, Morgane, Delphine, Asma, Clément, Tao, Mona, Ihab, Laetitia, Chérine, Marie, Céline, Pascal, Sophie, Benoît, Floriane, Anaïs**. Avec une pensée **pour Romuald, Delphine Larrieu, Gabriele, Julien Gravier, Lucie et Benoît**. Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur, votre soutien et les moments extra-labo allant du rafting au lasergame procurant au travail quotidien une qualité exceptionnelle. C'est un honneur d'être membre de cette équipe !

Je tiens à remercier tout particulièrement **le Dr3 Sandrine Dufort** pour tout ce qu'elle m'a apporté tant au niveau personnel que professionnel. Tu as été l'actrice principale de cette aventure et les mots me manquent pour te remercier. Tu m'as appris tant de choses, allant de l'imagerie à la broderie en passant par la cuisine. Les souvenirs sont nombreux et j'espère qu'il y en aura de nombreux autres.

Merci au **Docteur Amandine Hurbin** pour son accessibilité et ses conseils avisés notamment lors de la relecture de mon travail.

Je remercie **Maxime** pour avoir volé à mon secours pour les manip durant la rédaction toujours dans la bonne humeur. Merci également à **Céline** pour ses bons conseils et ses réponses au pied levé à mes nombreuses questions. Je n'oublie pas **Laetitia**.

Je remercie **Michelle Kéramidas** pour son soutien dans les moments délicats et pour sa gentillesse. J'assure de mon amitié **Morgane**.

Merci à **Christiane-Hanna** pour les bons moments passés ensemble et les galopades parfois acrobatiques.

Un grand merci à **Sandrine Fiorucci**, en qui j'ai trouvé une amie ainsi qu'à **Molly, Anne-Sophie, Edwige, Noémie** pour leur soutien sans faille et leur bonne humeur.

Egalement un grand merci à **Alexeï Grichine, Mylène** et **Jacques** pour leur patience, leur disponibilité et leur accessibilité pour utiliser au mieux les appareils de microscopie et de cytométrie.

Je ne saurais oublier les personnes indispensables **Denise, Dalenda, Johanna, Natacha, Norbert** et **Michaelis** !

Merci à tous les « collaborateurs » avec lesquels j'ai eu la chance de travailler :

Merci aux **Docteurs Chantal Rémy et Emmanuel Barbier, à Vasile, Olivier et Régine** pour leur accessibilité, leurs bons conseils et leur patience pour me transmettre les secrets de l'IRM. A **Nicolas Coquery, Leire Azurmendi et Claire Guillier** pour les inoubliables « nuits de l'IRM ».

Merci au **Docteur Florence de Fraipont** pour son aide, ses remarques pertinentes et enrichissantes ainsi que pour ses conseils lors de la rédaction de mon travail. Merci également à **Corinne Lucas**.

Merci au **Docteur Caroline Aspod** pour sa bonne humeur, son implication et son accessibilité. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi dans le projet PoroCombo.

Merci à tous les collaborateurs du projet PoroCombo, le **Docteur Abdel Aouacheria** pour ses conseils avisés et les « chimistes » **Docteur Didier Boturyn et Michaël Claron**, ainsi que le **Docteur Gilles Subra** et le **Docteur Pascal Verdié** pour la délicate production du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 et pour leur accessibilité.

Merci au **Docteur Anne-Claude Couffin** pour la synthèse des nanoparticules greffées avec du Cetuximab, pour sa disponibilité et son accessibilité.

Merci au **Docteur Valérie Siroux** et à **Mériem** de m'avoir guidée dans le monde obscur des statistiques.

Merci à tous pour votre collaboration et votre enthousiasme.

*Que ceux que j'ai oubliés soient indulgents avec moi.*

Une pensée pour **Louis, Simone, Stella, Anastassios** et **Erick**, ces anges qui veillent sur moi.

Je remercie ma famille pour avoir cru en moi, son amour et son soutien. A mon Père pour sa réactivité, sa disponibilité et son implication dans mon avenir, pour sa stricte éducation m'ayant permis d'accéder à mon rêve de faire de la recherche. A ma Mère pour son originalité qui m'a permis de développer mon esprit créatif. A mon frère **Alexis** et à ma soeur **Antigone** pour leur soutien sans faille et pour tous les bons moments que nous passons ensemble. Ainsi qu'à mes neveux **Lucie, Augustin** et **Jean** qui illuminent notre vie avec leur sourire.

Je remercie ma Belle-Famille **Dominique** et **Serge** pour leur accueil et leur soutien permanent.

Merci à **Marjolaine** (et un peu à **Teddy**) pour son soutien sans faille, son oreille attentive et sa présence réconfortante. Les moments que nous passons ensemble sont précieux et inégalables.

Merci à **Ela**, connue de tous malgré elle, d'être à mes côtés dans toutes mes aventures.

Merci à **Olivier** pour son Amour, son soutien. Merci de me donner de la confiance en moi et d'être là dans toutes les périodes de ma vie, des plus difficiles aux plus heureuses, et de m'encourager à poursuivre mes rêves.

## AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué dans le centre de recherche INSERM/UJF U823, au sein de l'équipe 5 « thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer » dirigée par le Dr Jean-Luc COLL à l'Institut Albert Bonniot.

Il a donné lieu aux publications et communications suivantes :

### **ARTICLES DANS DES REVUES INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE**

**Karageorgis A**<sup>1,§</sup>, Sancey L<sup>2,§</sup>, Dufort S<sup>1</sup>, Henry M<sup>1</sup>, Hirsjavi S<sup>3</sup>, Benoit JP<sup>3</sup>, Passirani C<sup>3</sup>, Montigon O<sup>4</sup>, Benmerad M<sup>1</sup>, Siroux V<sup>1</sup>, Barbier E<sup>4</sup>, Coll JL<sup>1,\*</sup>

Preclinical evaluation of the Enhanced Permeability and Retention effect using fluorescence imaging can be correlated to a combination of three parameters measured by DCE-MRI.

*Article soumis au journal ACS Nano*

**Karageorgis A**, Jeannot V and Coll J-L.

Use of endogenous and exogenous fluorescence in oncology

Future Medicine, e-book, October 2013, Pages 98-111, Doi: 10.4155/ebo.13.243

Kéramidas M, de Fraipont F, **Karageorgis A**, Moisan A, Persoons V, Richard MJ, Coll JL, Rome C.

The dual effect of MSCs on tumour growth and tumour angiogenesis.

Stem cell Research & Therapy, 20 avril 2013; 4(2):41

## COMMUNICATIONS

**Karageorgis A**, Dufort S, Guidetti M, Lavaud J, Josserand V, Hurbin A, Coll JL

“Cetuximab based nanomedicine: a new tool for targeted therapy #2”

Poster – Congrès EMIM, mai 2013, Turin, Italie

**Karageorgis A**, Dufort S, Guidetti M, Lavaud J, Josserand V, Hurbin A, Coll JL

“Cetuximab based nanomedicine: a new tool for targeted therapy”

Poster – Congrès BIOMIM, avril 2013, Grenoble, France

Prix du meilleur poster de la fondation Nanosciences

**Karageorgis A**, Claron M, Juge R, Subra G, Gravier J, Seve M, Aspod C, Hurbin A, Sancey L, Plumas J, Boturyn D, Dumy P, Verdie P, Aouacheria A, Coll.JL

“RAFT-cRGD-poro2 “tracker-killer peptides” to target and destroy tumor cells”

Poster – Congrès GTRV, décembre 2012, Chilly-Mazarin, France

**Karageorgis A**: “Targeted therapies against cancer”

Communication orale – Comité de Thèse, novembre 2012, Grenoble, France

**Karageorgis A**, Dufort S, Guidetti M, Lavaud J, Josserand V, Hurbin A, Coll JL

“Cetuximab based nanomedicine: a new tool for targeted therapy”

Poster – Congrès J2R, octobre 2012, Lille, France

**Karageorgis A**: “The use of hMSC as cellular therapeutic tool in cancer models”

Communication orale – Comité de Thèse, octobre 2011, Grenoble, France

**Karageorgis A\***, Coquery N\*, Lucas C, Richard JM, Barbier E, Sève M, de Fraipont F, Rémy C, Coll JL, Rome C

« Human Mesenchymal Stem Cells for Glioblastoma Cell Therapy »

Poster – Congrès de Biovision et de CLARA, Mars 2011, Lyon, France

Résumé publié dans « Le bulletin du Cancer »

\*Co-premiers auteurs

**Karageorgis A**, Coquery N, Lucas C, Richard JM, Barbier E, Sève M, de Fraipont F, Rémy C, Coll JL, Rome C

“The use of human Mesenchymal Stem Cells as therapeutic tool in mice glioblastoma model”  
Poster – Congrès MSC, novembre 2010, Toulouse, France

**Karageorgis A** “Interest of using hMSC as an anticancerous diagnostic and therapeutic tool”  
Communication orale – Comité de Thèse, avril 2010, Grenoble, France

**Karageorgis A**, De Fraipont F, Keramidas M, Coll JL, Carrié L, persoons V, Rome C, Richard MJ

« *In vitro* and *in vivo* analysis of hMSC pro-angiogenic activity »

Poster – Congrès de la Société Française des Cellules et des Tissus, octobre 2009, Grenoble, France

### **PRIX HONORIFIQUE**

**Lauréate du prix du poster de la fondation Nanosciences**, congrès BIOMIM, avril 2013

“Cetuximab based nanomedicine: a new tool for targeted therapy”

**Karageorgis A**, Dufort S, Guidetti M, Lavaud J, Josserand V, Hurbin A, Coll JL

## TABLE DES MATIERES

<i>REMERCIEMENTS</i> .....	<i>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</i>
<i>AVANT-PROPOS</i> .....	<i>I</i>
<i>TABLE DES MATIERES</i> .....	<i>VIII</i>
<i>TABLE DES FIGURES</i> .....	<i>XIV</i>
<i>ABREVIATIONS</i> .....	<i>XVII</i>

### **INTRODUCTION..... 1**

#### **Chapitre 1 : Utilisation d'un vecteur cellulaire comme outil théranostique : les cellules souches mésenchymateuses..... 5**

1 Généralités sur les cellules souches mésenchymateuses .....	5
1.1 Définition des cellules souches mésenchymateuses .....	5
1.2 Mode d'obtention et sélection des cellules souches mésenchymateuses.....	5
1.3 L'intérêt des cellules souches mésenchymateuses .....	6
2 Cellules souches mésenchymateuses et cancer.....	7
2.1 Tropisme des cellules souches mésenchymateuses pour les tumeurs.....	7
2.2 Mécanisme d'action des CSM favorisant le développement tumoral .....	9
2.3 Mécanisme d'action anti-tumorale des CSM .....	10
2.4 Cellules souches mésenchymateuses et néoangiogénèse tumorale .....	11

#### **Chapitre 2 : Utilisation d'un vecteur synthétique comme outil théranostique : les nanoparticules..... 13**

1 Les nanoparticules .....	13
2 L'Epidermal Growth Factor Receptor .....	14
2.1 Structure et mécanisme d'action de l'EGFR .....	14
2.2 Rôle de l'EGFR dans la tumorigénèse .....	18
2.3 Intérêt de cibler l'EGFR .....	18
3 Le Cetuximab : un anticorps monoclonal anti-EGFR .....	20
3.1 Caractéristiques .....	20
3.2 Mécanisme d'interaction avec l'EGFR .....	21



3.3 Essais cliniques .....	22
<b>Chapitre 3 : Utilisation d'un vecteur synthétique de petite taille comme outil théranostique : le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> .....</b>	<b>25</b>
1 Le RAFT-c(RGD) <sub>4</sub> : un nanovecteur spécifique des tumeurs .....	25
1.1 L'intégrine $\alpha\beta 3$ .....	25
1.1.1 Structure de l'intégrine $\alpha\beta 3$ .....	25
1.1.2 Rôle de l'intégrine $\alpha\beta 3$ .....	27
1.1.3 Intérêt de cibler l'intégrine $\alpha\beta 3$ .....	28
1.1.4 Un ligand de l'intégrine $\alpha\beta 3$ : le tripeptide RGD .....	29
1.2 Le RAFT-c(RGD) <sub>4</sub> .....	30
2 Protéines pro-apoptotiques Bax : utilisation de la voie mitochondriale .....	33
2.1 Intérêt de cibler la mitochondrie .....	33
2.2 Structure et mécanisme d'action des protéines de la famille Bax .....	34
2.3 Poro-peptides .....	37
<b>Chapitre 4 : les modèles tumoraux .....</b>	<b>39</b>
1 Les modèles de xénogreffes sous-cutanées .....	40
2 Les modèles de xénogreffes orthotopiques .....	42
2.1 La vascularisation .....	42
2.1.1 La vascularisation pulmonaire .....	42
2.1.2 La vascularisation cérébrale .....	43
2.2 Les voies d'implantation des tumeurs orthotopiques .....	45
2.2.1 Tumeur pulmonaire .....	45
2.2.2 Tumeur cérébrale .....	45
3 Comparaison des modèles de xénogreffes tumorales .....	46
<b>Chapitre 5 : les méthodes d'imagerie .....</b>	<b>48</b>
1 L'imagerie par résonance magnétique .....	48
1.1 Principe .....	49
1.2 L'utilisation d'un marquage magnétique .....	50
1.3 Avantages et limites de l'IRM .....	51

2	L'imagerie optique.....	51
2.1	L'imagerie optique de fluorescence .....	51
2.1.1	<i>Principe.....</i>	51
2.1.2	<i>L'imagerie de fluorescence par réflectance.....</i>	53
2.1.3	<i>L'imagerie optique de fluorescence par transmission.....</i>	54
2.1.4	<i>L'utilisation de la fluorescence en oncologie.....</i>	56
2.1.5	<i>Fluorochromes du proche-infrarouge.....</i>	58
2.1.6	<i>Avantages et limites de la fluorescence.....</i>	59
2.2	L'imagerie de bioluminescence.....	59
3	Comparaison des méthodes d'imagerie .....	61
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>62</b>
<b>Chapitre 1 : Utilisation d'un vecteur cellulaire comme outil théranostique : Les cellules souches mésenchymateuses.....</b>		
<b>1 Objectifs du projet .....</b>		<b>64</b>
<b>2 Résultats.....</b>		<b>65</b>
2.1	Evaluation de l'utilisation des CSM comme outil théranostique dans un modèle de tumeur sous-cutanée ou de métastases pulmonaires.....	65
2.2	Evaluation de l'impact des CSM comme outil théranostique dans un modèle de glioblastome orthotopique.....	68
2.2.1	<i>Développement du modèle tumoral in vivo de glioblastome orthotopique.....</i>	68
2.2.2	<i>Evaluation de l'impact des CSM modifiées ou non sur la croissance tumorale.....</i>	69
2.2.2.1	<i>Effet des CSM natives sur la croissance tumorale .....</i>	69
2.2.2.2	<i>Impact de la modification des CSM sur la croissance tumorale.....</i>	70
2.2.3	<i>Evaluation du tropisme tumoral naturel des CSM.....</i>	77
3	Discussion.....	79
<b>Chapitre 2 : Utilisation d'un vecteur synthétique comme outil théranostique : les nanoparticules.....</b>		
<b>1 Objectifs du projet .....</b>		<b>86</b>

2 Résultats.....	88
2.1 Ciblage passif de tumeurs sous-cutanées par des nanoparticules .....	88
2.2 Ciblage actif de tumeurs pulmonaires par des nanoparticules.....	91
2.2.1 <i>Modèle de tumeur pulmonaire in vivo orthotopique</i> .....	91
2.2.2 <i>Evaluation in vivo de l'agent de ciblage : le Cetuximab</i> .....	92
2.2.3 <i>Evaluation des nanoémulsions greffées avec du Cetuximab</i> .....	96
2.2.3.1 <i>Evaluation in vitro de l'impact des nanoémulsions sur l'EGFR</i> .....	96
2.2.3.2 <i>Evaluation in vivo de la fixation des nanoémulsions</i> .....	99
3 Discussion.....	101
<b>Chapitre 3 : Utilisation d'un vecteur synthétique de petite taille comme outil théranostique : le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> .....</b>	<b>108</b>
1 Objectifs du projet .....	109
2 Résultats.....	111
2.1 Evaluation du RAFT-c(RGD) <sub>4</sub> comme outil diagnostique.....	111
2.2 Etude des peptides pro-apoptotiques issus de Bax : poro 1 et poro 2.....	112
2.3 Synthèse des composés PoroCombo .....	114
2.4 Evaluation de l'impact de la molécule sur la membrane mitochondriale.....	116
2.5 Impact du RAFT-c(RGD) <sub>4</sub> -poro2 sur la viabilité cellulaire .....	117
2.5.1 <i>Evaluation de la viabilité cellulaire</i> .....	117
2.5.2 <i>Mécanismes impliqués dans l'impact sur la viabilité cellulaire</i> .....	119
2.5.2.1 <i>Evaluation de l'apoptose tardive : marquage au Hoechst</i> .....	119
2.5.2.2 <i>Evaluation de l'activation des voies apoptotiques : marquage de la caspase 3 active</i> .....	120
2.5.2.3 <i>Evaluation de la mort cellulaire</i> .....	122
2.6 Evaluation <i>in vivo</i> de l'impact du RAFT-(cRGD) <sub>4</sub> -poro2 comme outil thérapeutique .....	123
2.6.1 <i>Protocole</i> .....	123
2.6.2 <i>Impact de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 sur la croissance tumorale</i> .....	124
2.6.3 <i>Evaluation des modifications anatomopathologiques des tumeurs suite au traitement par les molécules PoroCombo</i> .....	126
3 Discussion.....	130
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>135</b>

<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>138</b>
1 Les animaux.....	139
1.1 Souche de souris.....	139
1.2 Méthodes d'anesthésie.....	139
1.2.1 Anesthésie gazeuse.....	139
1.2.2 Anesthésie chimique.....	140
1.3 Méthodes de sacrifice des animaux.....	140
1.4 Les différentes voies d'injection.....	141
2 Les lignées cellulaires.....	142
2.1 Cellules souches mésenchymateuses humaines.....	142
2.2 Cellules de glioblastome humain.....	143
2.3 Cellules de tumeur mammaire murine.....	143
2.4 Cellules de CBNPC.....	144
2.5 Cellules de mélanome humain.....	144
3 Les modèles tumoraux.....	145
3.1 Modèle orthotopique de glioblastome humain.....	145
3.2 Modèle de tumeurs mammaires murines métastasées au niveau pulmonaire.....	146
3.3 Le modèle tumoral : modèle de CBNPC humain orthotopique.....	146
3.4 Le modèle de tumeur sous-cutanée.....	146
4 Molécules et nanoparticules utilisées.....	147
4.1 Les nanoparticules.....	147
4.2 Les molécules du projet PoroCombo.....	147
5 Cytométrie en flux.....	148
5.1 Evaluation du marquage des CSM.....	148
5.2 Analyse de la caspase 3 active par cytométrie en flux.....	148
6 Evaluation de la viabilité cellulaire : Test MTT.....	148
7 Evaluation de l'apoptose cellulaire par marquage au Hoechst.....	149
8 Evaluation <i>ex vivo</i> de la présence de CSM par Polymerase Chain Reaction.....	150

---

9	Evaluation par Western blot de l'impact du Cetuximab sur les voies de signalisation cellulaire.....	151
9.1	Préparation du lysat protéique et dosage .....	151
9.2	Electrophorèse et transfert sur membrane .....	151
9.3	Immuno-détection .....	152
10	Analyses histologiques des tumeurs .....	153
10.1	Coupes histologiques.....	153
10.2	Marquage histologique .....	153
10.2.1	<i>Marquage à l'hématoxyline/éosine .....</i>	<i>153</i>
10.2.2	<i>Marquage des vaisseaux sanguins : CD31 .....</i>	<i>154</i>
10.2.3	<i>Marquage de la prolifération : KI67.....</i>	<i>154</i>
10.2.4	<i>Marquage de l'apoptose : Caspase 3 active .....</i>	<i>155</i>
11	Les méthodes d'imagerie du petit animal .....	155
11.1	Imagerie de bioluminescence .....	155
11.2	Imagerie par Résonance Magnétique .....	156
11.3	La fluorescence .....	156
11.3.1	<i>Evaluation de l'intégrité des membranes mitochondriales in vitro par marquage au TMRM .....</i>	<i>156</i>
11.3.1	<i>La fluorescence in vivo et ex vivo.....</i>	<i>157</i>
11.4	Rayons X.....	158
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>159</b>

## TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : INCIDENCE DES CANCERS EN EUROPE DE L'OUEST EN 2008.....	2
FIGURE 2 : LES DIFFERENTES SOURCES ET MODES DE CARACTERISATION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES .....	6
FIGURE 3 : SCHEMA EXPLICATIF DU TROPISME TUMORAL NATUREL DES CSM .....	8
FIGURE 4 : LES DIFFERENTES NANOPARTICULES UTILISEES EN RECHERCHE BIOMEDICALE.....	14
FIGURE 5 : VOIES DE SIGNALISATION CONTROLEES PAR L'ACTIVATION DE L'EGFR...	15
FIGURE 6 : STRUCTURE SCHEMATIQUE DES RECEPTEURS DE LA FAMILLE HER .....	16
FIGURE 7 : LES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE FAISANT SUITE A L'ACTIVATION DE L'EGFR .....	17
FIGURE 8 : MECANISMES D'ACTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-EGFR SUR LES CELLULES TUMORALES .....	22
FIGURE 9 : LES DIFFERENTES CONFORMATIONS DE L'INTEGRINE AVB3.....	27
FIGURE 10 : STRUCTURE DE LA MOLECULE RAFT-C(RGD) <sub>4</sub> .....	31
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TRANSITION CLIC/CLAC DE BAX35	
FIGURE 12 : SCHEMA EXPLICATIF DE L'EFFET EPR.....	41
FIGURE 13 : SCHEMA DE LA VASCULARISATION ARTERIELLE CEREBRALE .....	44
FIGURE 14 : TABLEAU COMPARATIF DES MODELES TUMORAUX.....	47
FIGURE 15 : PRINCIPE DE LA RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE .....	49
FIGURE 16 : PRINCIPE DE LA FLUORESCENCE .....	52
FIGURE 17 : SYSTEME D'IMAGERIE OPTIQUE DE FLUORESCENCE PAR REFLECTANCE	54
FIGURE 18 : SYSTEME D'IMAGERIE DE FLUORESCENCE PAR TRANSMISSION (3D) .....	55
FIGURE 19 : AUTOFLUORESCENCE DES TISSUS SELON LA LONGUEUR D'ONDE.....	58
FIGURE 20 : PRINCIPE DE LA BIOLUMINESCENCE .....	60
FIGURE 21 : TABLEAU COMPARATIF DES DIFFERENTS SYSTEMES D'IMAGERIE CLINIQUES OU EXPERIMENTAUX.....	61
FIGURE 22 : DEVELOPPEMENT DU MODELE DE TUMEUR DE GLIOBLASTOME ORTHOTOPIQUE CHEZ LA SOURIS <i>NUDE</i> NMRI.....	69

FIGURE 23 : EFFET DES CSM NATIVES SUR LA CROISSANCE TUMORALE.....	70
FIGURE 24 : MARQUAGE DES CSM AVEC LA GFP ET AVEC DES NP.....	72
FIGURE 25 : EFFET DES CSM MARQUEES AVEC LA GFP SUR LA CROISSANCE TUMORALE .....	73
FIGURE 26 : IMPACT DES CSM MARQUEES AVEC LA GFP ET AVEC DES NANOPARTICULES SUR LA CROISSANCE D'UN GLIOBLASTOME ORTHOTOPIQUE.....	74
FIGURE 27 : EVALUATION DE L'IMPACT DE LA VOIE D'ADMINISTRATION DES CSM SUR LA CROISSANCE TUMORALE .....	76
FIGURE 28 : EVALUATION DU TROPISME TUMORAL DES CSM .....	78
FIGURE 29 : ETABLISSEMENT D'UNE TUMEUR PULMONAIRE <i>IN VIVO</i> ORTHOTOPIQUE	92
FIGURE 30 : EVALUATION <i>IN VIVO</i> ET <i>EX VIVO</i> DE LA FIXATION PULMONAIRE DU CETUXIMAB-ALEXA 680 APRES NEBULISATION INTRA-PULMONAIRE CHEZ DES SOURIS PORTEUSES OU NON DE TUMEURS PULMONAIRES .....	94
FIGURE 31 : QUANTIFICATION DE LA FLUORESCENCE DU CETUXIMAB-ALEXA 680 APRES NEBULISATION CHEZ DES SOURIS SAINES OU PORTEUSES DE TUMEURS PULMONAIRES .....	95
FIGURE 32 : EVALUATION PAR WESTERN BLOT DE L'IMPACT DU CETUXIMAB SEUL OU GREFFE SUR LES NP, SUR LES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION DE L'EGFR ....	98
FIGURE 33 : SUIVI <i>IN VIVO</i> DE LA FIXATION DES NANOEMULSIONS GREFFEES AVEC DU CETUXIMAB APRES NEBULISATION INTRA-TRACHEALE .....	100
FIGURE 34: EVALUATION DE LA BIODISTRIBUTION DU RAFT-RGD-A700 <i>IN VIVO</i> ET <i>EX VIVO</i> .....	112
FIGURE 35 : ETUDE DE L'EFFICACITE DES PEPTIDES « PORO 1 » ET « PORO 2 » ISSUS DE BAX SUR LA FORMATION DE PORES DANS LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE.....	114
FIGURE 36 : SYNTHESE DES COMPOSES POROCOMBO .....	115
FIGURE 37 : EVALUATION DE L'IMPACT DES MOLECULES POROCOMBO SUR LA DEPOLARISATION DE LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE.....	117
FIGURE 38 : IMPACT DES MOLECULES POROCOMBO SUR LA VIABILITE CELLULAIRE	118
FIGURE 39 : EVALUATION DE L'APOPTOSE TARDIVE SUITE AU TRAITEMENT PAR MOLECULES POROCOMBO .....	120

FIGURE 40: EVALUATION DE L'ACTIVATION DE LA CASPASE 3 SUITE AU TRAITEMENT PAR LA MOLECULE POROCOMBO ..... 121

FIGURE 41 : EVALUATION DE LA MORT CELLULAIRE PAR MARQUAGE AU BLEU DE TRYPAN APRES TRAITEMENT PAR LA MOLECULE POROCOMBO ..... 122

FIGURE 42 : PROTOCOLE DE L'EVALUATION *IN VIVO* DE L'IMPACT DU RAFT-C(RGD)<sub>4</sub>-PORO2 SUR LA CROISSANCE TUMORALE ..... 124

FIGURE 43 : EVALUATION DE L'IMPACT DE LA MOLECULE POROCOMBO SUR LA CROISSANCE TUMORALE ..... 125

FIGURE 44 : EVALUATION PAR MARQUAGE IMMUNO-HISTOLOGIQUE DE L'IMPACT DU TRAITEMENT POROCOMBO SUR LES TUMEURS ..... 127

FIGURE 45: EVALUATION QUANTITATIVE DE L'IMPACT DU TRAITEMENT POROCOMBO SUR LA VASCULARISATION ET SUR LA PROLIFERATION TUMORALE ..... 128



**ABBREVIATIONS**

<b>ADNg</b>	Acide DésoxyriboNucléique génomique
<b>AFSSAPS</b>	Agence Française pour la Sécurité SAnitaire des Produits de Santé
<b>Ang-1</b>	Angiopoïétine-1
<b>APS</b>	Ammonium PerSulfate
<b>ARNm</b>	Acide RiboNucléique messenger
<b>ART</b>	Algebraic Reconstruction Technic
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate
<b>AVC</b>	Accident Vasculaire Cérébral
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumine
<b>CBNPC</b>	Cancer Bronchique Non à Petites Cellules
<b>CCD</b>	Cooled Charge-coupled Device
<b>CCL2</b>	C-Chemokine Ligand 2
<b>CCR2</b>	C-Chemokine Receptor type 2
<b>CD</b>	Cluster de Différenciation
<b>CEA</b>	Commissariat à l'Energie Atomique
<b>CLAC</b>	Cytochrome c Liberation Associated Conformation
<b>CLIC</b>	Cytosolic Locked In Conformation
<b>CMV</b>	CytoMegaloVirus
<b>CSM</b>	Cellules Souches Mésoenchymateuses
<b>CT</b>	Computed Tomography
<b>CXCL</b>	C-X-C motif Ligand
<b>CXCR</b>	C-X-C chemokine Receptor
<b>Cy5</b>	Cyanine 5
<b>DCM</b>	Département de Chimie Moléculaire
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>dNTP</b>	désoxyriboNucleotides TriPhosphates
<b>EC</b>	Endothelial Cell
<b>ECL</b>	Enhanced ChemiLuminescence

---

<b>EDTA</b>	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
<b>EFS</b>	Etablissement Français du Sang
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>EPR</b>	Enhanced Permeability and Retention
<b>EMA</b>	European MEDicine Agency
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>fDOT</b>	fluorescent Diffuse Optical Tomography
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FLEX</b>	First Line ErbituX in lung cancer
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>FRI</b>	Fluorescence Reflectance Imaging
<b>GCSF</b>	Granulocyte Colony Stimulating Factor
<b>GCV</b>	GanCicloVir
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GvH</b>	Graft versus Host disease
<b>HER</b>	Human Epidermal growth factor Receptor
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HMGB1</b>	High Mobility Group protein B1
<b>HRP</b>	HorseRadish Peroxydase
<b>HSV-Tk</b>	Herpes Simplex Virus-Thymidine kinase
<b>IBMM</b>	Institut des Biomolécules Max Mousseron
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	InterFéroN $\gamma$
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IGF-1</b>	Insulin-like Growth Factor 1
<b>IL-6 ; IL-8</b>	InterLeukine -6 ou -8
<b>INSERM</b>	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique

<b>KLAKLAK</b>	Lysine-Leucine-Alanine-Lysine-Leucine-Alanine-Lysine
<b>Luc</b>	Luciférase
<b>LV</b>	LentiVirus
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>MCP-1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein -1
<b>MEC</b>	Matrice Extra Cellulaire
<b>MEM</b>	Minimum Essential Medium
<b>MME</b>	Membrane Mitochondriale Externe
<b>MTT</b>	bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tétrazolium
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NMRI</b>	Naval Medical Research Institute
<b>NP</b>	NanoParticules
<b>NSCLC</b>	Non Small Cell Lung Cancer
<b>ORL</b>	Oto Rhino Laryngologique
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PCNA</b>	Proliferating Cell Nuclear Antigen
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDGF</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>PE</b>	PhycoErythrine
<b>PET</b>	Positron Electron Tomography
<b>PFA</b>	ParaFormAldéhyde
<b>PI3K</b>	Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>RAFT</b>	Regioselectivity Adressable Functionalised Template
<b>cRGD</b>	cyclic Arginine - Glycine - Aspartic acid
<b>RIPA</b>	Radio ImmunoPrecipitation Assay
<b>RMN</b>	Résonnance Magnétique Nucléaire
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SCID</b>	Severe Combined ImmunoDeficiency
<b>SDF-1</b>	Stromal cell-Derived Factor-1

<b>SDS</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>SPECT</b>	Single Photon Emission Computed Tomography
<b>STAT3</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription-3
<b>TBST</b>	Tris Buffered Saline and Tween 20
<b>TGF-<math>\alpha</math> ou TGF-<math>\beta</math></b>	Tumor Growth Factor $\alpha$ ou $\beta$
<b>TMRM</b>	TetraMethylRhodamine Methylester
<b>TNF-alpha</b>	Tumor Necrosis Factor-alpha
<b>TRIS</b>	TRIShydroxyméthylaminométhane
<b>UJF</b>	Université Joseph Fourier
<b>USPIO</b>	Ultra Small super Paramagnetic Iron Oxide
<b>UV</b>	UltraViolet
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VEGFR</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

# *Introduction*

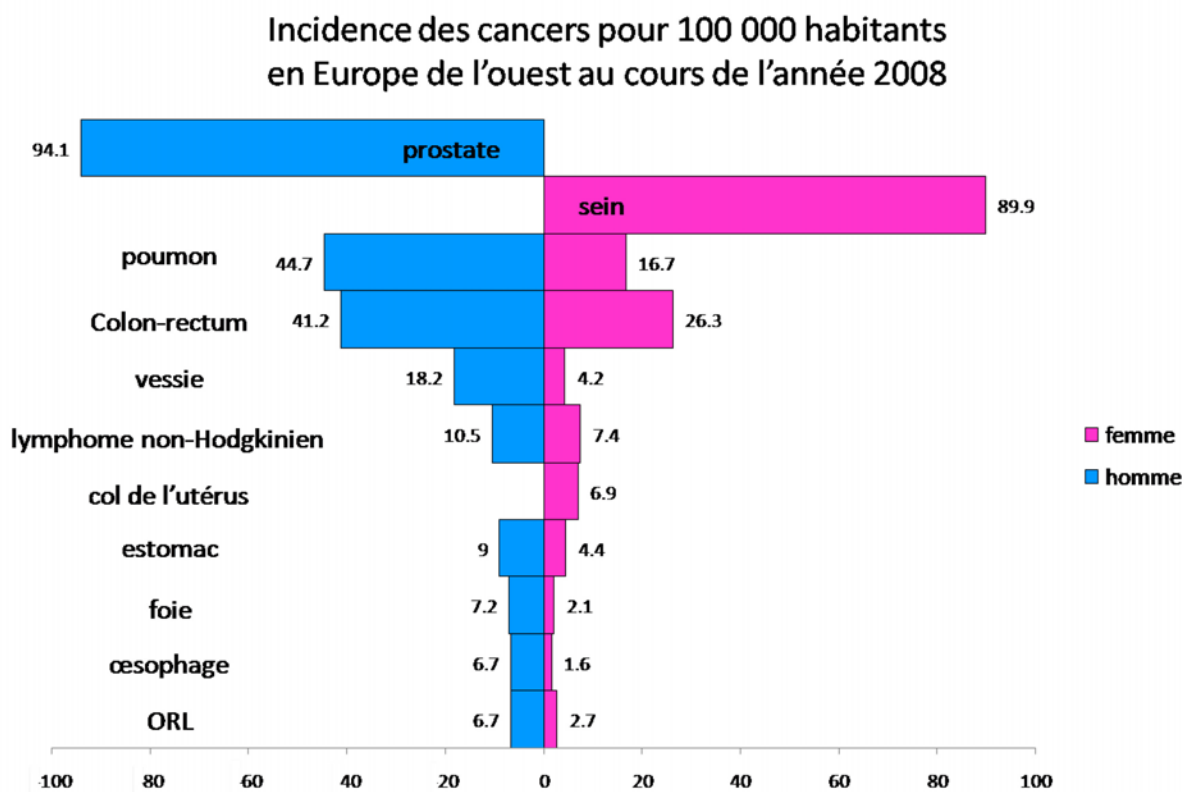
Le cancer est la première cause de décès dans les pays développés et la seconde dans les pays en voie de développement. En 2008, le nombre de cancers estimé à travers le monde est de 12,7 millions. Il est considéré comme un problème majeur de santé publique.

Parmi les différents types de cancers, certains se démarquent de par le grand nombre de patients concernés ou par l'agressivité de la maladie.

Ainsi, le Cancer Bronchique Non à Petites Cellules (CBNPC, nommé NSCLC en anglais pour *Non Small Cell Lung Cancer*) est la première cause de mort par cancer aux USA ; c'est le cancer le plus diagnostiqué chez l'homme et la principale cause de décès par cancer (Jemal, Bray et al. 2011). Il représente 80% des 170 000 nouveaux cas de carcinomes pulmonaires diagnostiqués chaque année. Le taux de guérison est directement lié au stade clinique. Or, la majorité des patients présente, lors du diagnostic, une maladie à un stade avancé, métastatique et non résecable ; la survie à cinq ans est de 15% seulement (Pisters, Evans et al. 2007). En revanche, chez la femme, c'est le cancer du sein qui est le plus fréquent (Jemal, Bray et al. 2011).

Alors que les tumeurs intra-crâniennes représentent moins de 5% de l'ensemble des cancers de l'adulte, elles représentent, en revanche, 20% des tumeurs de l'enfant (Scotté F). Malgré les nombreuses avancées réalisées dans le traitement du glioblastome par des thérapies conventionnelles, telles que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, à ce jour il n'existe pas de traitement efficace et le pronostic est très mauvais avec une médiane de survie de seulement 10 à 14 mois (Nakamura, Ito et al. 2004; Birnbaum, Roider et al. 2007; Yong, Shinojima et al. 2009; Porada and Almeida-Porada 2010).

L'augmentation du nombre de cancers chaque année dans les pays développés est due au vieillissement et à l'accroissement de la population, à des modes de vie propices au développement de cancers notamment le tabac, la sédentarité et l'alimentation « occidentale » (Jemal, Bray et al. 2011).



**Figure 1 : Incidence des cancers en Europe de l'ouest en 2008.**

Ce graphique représente l'incidence des cancers pour 100 000 habitants en Europe de l'ouest pour l'année 2008. Adaptée de (Jemal, Bray et al. 2011)

Pour tous les cancers solides le traitement principal est la chirurgie d'exérèse associée ou non à la radiothérapie et/ou à la chimiothérapie. Cependant, une chirurgie efficace n'est pas toujours possible dans les cas où la tumeur est trop développée, diffuse ou métastasée. La radiothérapie, quant à elle, peut s'appliquer uniquement sur une zone précise de l'organisme donc pour une tumeur bien localisée et peut entraîner d'importants effets indésirables. Enfin, en ce qui concerne la chimiothérapie, des molécules efficaces ont été développées. Cependant, leur manque de spécificité quant à distinguer un tissu sain d'un tissu cancéreux entraîne de forts effets indésirables empêchant parfois la poursuite du traitement et conduisant au décès par défaillance des organes vitaux. De plus, certaines localisations dans l'organisme telles que le cerveau, protégé par la barrière hémato-encéphalique, sont difficiles d'accès pour la chimiothérapie. Ainsi, une grande quantité d'agent thérapeutique devra être administrée par voie systémique pour qu'une petite proportion atteigne la zone à traiter. Par ailleurs, la trop faible quantité de molécules de chimiothérapie atteignant les cellules tumorales fait que ces dernières peuvent développer des mécanismes de résistance invalidant le traitement mis en place.

Face à ce constat, il apparaît primordial de développer des thérapies ciblées du cancer qui puissent non seulement atteindre des zones difficiles d'accès, mais également cibler uniquement le tissu pathologique en évitant d'altérer le tissu sain tout en contournant les mécanismes de résistance cellulaire tumorale.

Outre le développement de thérapies ciblées, un enjeu crucial pour la bonne prise en charge du cancer est le diagnostic précoce de la maladie pour permettre une thérapie efficace. En effet, aux stades précoces de la maladie, le nombre de cellules tumorales à éliminer est relativement faible et ces cellules ne possèdent pas toutes les anomalies génétiques qui leur permettront de s'adapter et de résister aux traitements.

C'est ainsi que depuis une dizaine d'années un travail important est réalisé pour développer des outils de « théranostic » c'est-à-dire des outils permettant à la fois la « thérapie » et le « diagnostic » des cancers.

L'objectif de ma thèse est de développer et d'évaluer différents outils théranostiques permettant non seulement la détection des cellules cancéreuses mais également de réaliser une thérapie ciblée du cancer. Chaque approche étudiée a pour but d'atteindre le maximum de cellules tumorales sans affecter le tissu sain. Ce ciblage tumoral fait appel aux propriétés naturelles des tumeurs afin de les reconnaître de manière spécifique.

Lors de ma thèse, j'ai étudié trois outils différents pour le théranostic. La première étude fait appel à un outil biologique naturel cellulaire en utilisant des cellules souches mésenchymateuses humaines. Les deux autres études mettent en œuvre des outils synthétiques. En effet, mon deuxième axe de recherche se concentre sur l'utilisation de nanoparticules ciblantes alors que mon troisième axe utilise un vecteur plus petit qui est une molécule bien étudiée par notre équipe, le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>.

Pour mon premier axe de recherche, j'ai étudié l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses comme vecteur biologique. En effet, ces cellules ont un tropisme naturel pour les sites inflammatoires ce qui devrait permettre d'atteindre des zones difficilement accessibles par des agents thérapeutiques classiques, de par leur dissémination dans l'organisme ou de par leur protection par la barrière hémato-encéphalique. De plus, ces cellules sont potentiellement actives sur les tumeurs en agissant sur l'angiogénèse et/ou sur la croissance tumorale.



La deuxième méthode a consisté à développer un agent théranostique sous forme d'un spray de nanoparticules fonctionnalisées avec un ligand ciblant les cellules tumorales. Cette méthode présente l'avantage de développer un outil peu invasif pouvant être administré chez un patient présentant un état général dégradé, ayant un cancer disséminé, comme par exemple un cancer du poumon non à petites cellules. Ces nanoparticules pourront se fixer sur les cellules tumorales disséminées afin de pouvoir les identifier pour le diagnostic et, par la suite, les traiter par une thérapie ciblée.

Enfin, la dernière méthode a pour objectif de développer un outil théranostique synthétique, bien défini structurellement, synthétisable de manière reproductible, de petite taille, puisque moléculaire, qui, après une administration systémique, puisse cibler les cellules tumorales primaires ou métastasées. Cet outil sera un outil diagnostique s'il est couplé à un fluorophore et deviendra un outil thérapeutique lors d'un couplage avec un peptide pro-apoptotique.

Chacune de ces méthodes fait l'objet d'un chapitre. Pour chaque étude j'ai utilisé un ou plusieurs modèles de cancer, adaptés à mon étude, qui puissent répondre aux questions posées. La validation des agents thérapeutiques est réalisée grâce à différentes techniques d'imagerie *in vitro* et *in vivo*.

## **Chapitre 1 : Utilisation d'un vecteur cellulaire comme outil théranostique : les cellules souches mésenchymateuses**

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) représentent un vecteur cellulaire très intéressant pour une utilisation théranostique. En effet, ces cellules souches issues de l'adulte ont un tropisme naturel pour les sites inflammatoires après une injection par voie systémique.

Par ailleurs, leur utilisation actuelle en clinique humaine pour la prise en charge de la maladie du greffon contre l'hôte (GvH) ou pour les accidents vasculaires cérébraux (AVC) permet de les transférer plus rapidement de la recherche préclinique vers la clinique humaine pour une utilisation en diagnostic et/ou en thérapie du cancer.

### **1 Généralités sur les cellules souches mésenchymateuses**

#### **1.1 Définition des cellules souches mésenchymateuses**

Une cellule souche est une cellule ayant la capacité de se différencier en un grand nombre de cellules spécialisées. Pour affirmer le caractère « cellule souche », deux propriétés sont nécessaires, à savoir la multipotence (différenciation en plusieurs lignées cellulaires) et l'auto-renouvellement (Kosztowski, Zaidi et al. 2009; Sasportas, Kasmieh et al. 2009; Charbord 2010).

Les CSM sont caractérisées par trois propriétés principales :

- i. la capacité d'adhésion au plastique ;
- ii. l'absence à plus de 95% de marqueurs d'expression endothéliaux ou hématopoïétiques (CD14-, CD11b-, CD19-, CD79a-, CD34-, CD45-, HLA-DR-, CD73+, CD90+, CD105+);
- iii. la capacité de différenciation en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro*.

#### **1.2 Mode d'obtention et sélection des cellules souches mésenchymateuses**

Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) dérivent de progéniteurs mésodermiques. Elles se trouvent dans différents tissus aussi bien adultes que fœtaux comme le cordon ombilical, les tissus adipeux et dans la moelle osseuse où les CSM forment une petite population constituant le compartiment non-hématopoïétique (Ozawa, Sato et al. 2008). Ces cellules étant facilement isolables à partir de tissus adultes, ceci évite les problèmes éthiques liés à l'utilisation des cellules souches embryonnaires.

De plus, elles sont facilement amplifiables *in vitro* en vue d'une utilisation clinique. Suite à leur aspiration dans la moelle osseuse, leur identification repose sur la combinaison de leur aptitude à se différencier *in vitro* en adipocytes/ostéoblastes/chondroblastes, à adhérer au plastique, à exprimer les marqueurs CD73, CD90, CD105 et à l'absence d'expression de marqueurs hématopoïétiques sur la surface cellulaire (Loebinger and Janes 2010) (Figure 2). En effet, aucun marqueur de surface spécifique n'a été caractérisé à ce jour (Hamada, Kobune et al. 2005; Kallifatidis, Beckermann et al. 2008; Porada and Almeida-Porada 2010).

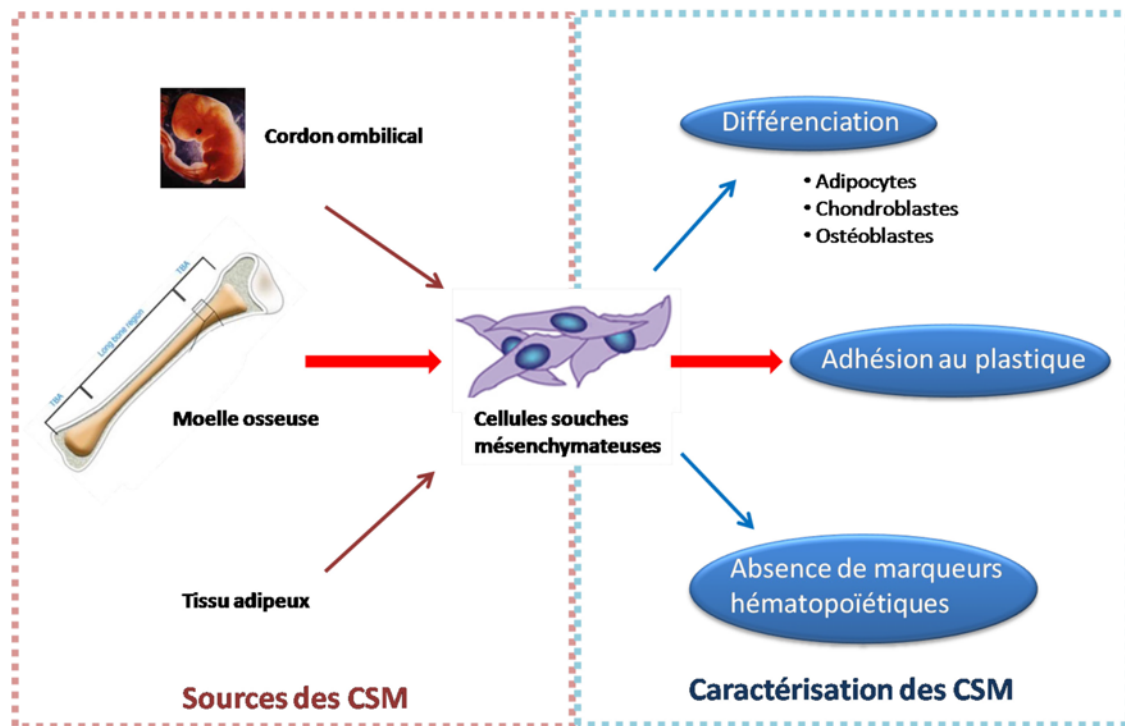


Figure 2 : Les différentes sources et modes de caractérisation des cellules souches mésenchymateuses

La partie de gauche du schéma indique les différentes sources de CSM alors que la partie de droite indique les éléments permettant de les caractériser. Les flèches rouges épaisses indiquent la source de CSM utilisée dans notre étude ainsi que le mode de caractérisation utilisé.

### 1.3 L'intérêt des cellules souches mésenchymateuses

Un outil théranostique doit permettre, après administration *in vivo*, de cibler les tumeurs présentes dans l'organisme.

C'est ainsi, que grâce à leur propriété naturelle de ciblage des sites inflammatoires mais également grâce à leur faible immunogénicité permettant de les administrer sans avoir recours à un traitement immunosuppresseur et à leur facilité d'obtention et d'amplification, les CSM représentent un outil prometteur dans la prise en charge du cancer (Birnbaum, Roider et al. 2007; Sasportas, Kasmieh et al. 2009; Yong, Shinojima et al. 2009; Hu, Fu et al. 2010; Parekkadan and Milwid 2010).

De plus, l'intérêt majeur des CSM issues de la moelle osseuse est qu'elles sont déjà utilisées en clinique dans la prise en charge de la GvH. A Grenoble, il a été ainsi mis en évidence que des CSM allogéniques, administrées à un patient présentant une GvH sévère, ont la capacité d'entraîner l'apoptose des cellules T activées tout en épargnant les cellules T quiescentes. Ceci permet d'immunomoduler l'activité du greffon et d'améliorer l'état clinique du patient dès la première injection (Plumas, Chaperot et al. 2005).

Les CSM font également l'objet d'essais cliniques variés, notamment pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux, dans le but de reperfusionner les zones hypoxiques ou pour la thérapie tissulaire réparatrice. Ainsi, les critères de sécurité sont bien déterminés et permettent d'envisager un transfert rapide de la recherche préclinique vers la clinique humaine (Parekkadan and Milwid 2010).

## **2 Cellules souches mésenchymateuses et cancer**

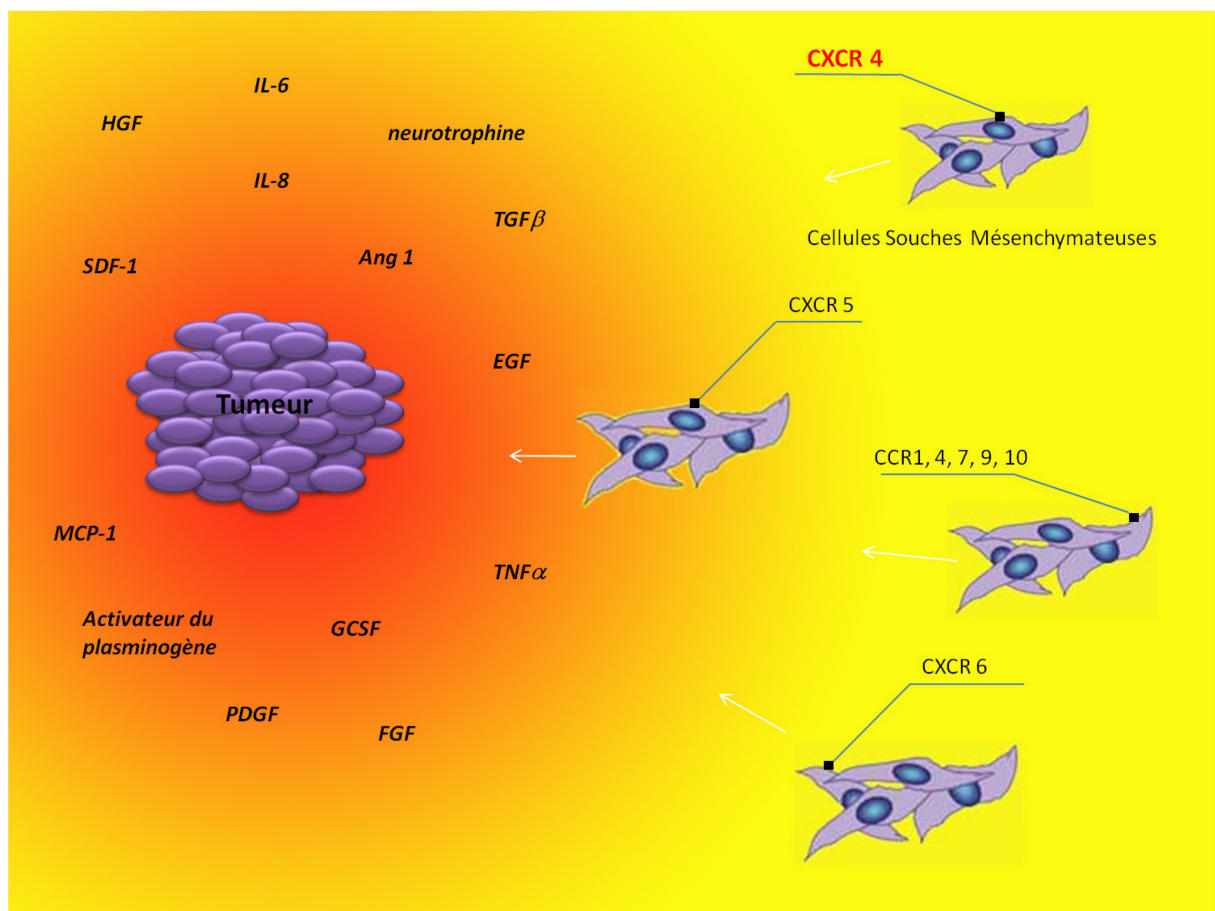
### **2.1 Tropisme des cellules souches mésenchymateuses pour les tumeurs**

Les cellules souches mésenchymateuses ont un tropisme naturel pour les sites inflammatoires. Or, une tumeur est une zone inflammatoire. Elle peut être décrite comme une plaie qui ne cicatrise jamais (« *a wound that never heal* ») (Dvorak 1986). Ainsi, il s'avère que les CSM ont un tropisme naturel pour les zones tumorales, quel que soit le type de tumeur : gliome (Birnbaum, Roider et al. 2007), pancréas (Kidd, Caldwell et al. 2010), colon (Zielske, Livant et al. 2009), poumons (Birnbaum, Roider et al. 2007; Kidd, Spaeth et al. 2009; Kosztowski, Zaidi et al. 2009; Zielske, Livant et al. 2009). En effet, les CSM administrées par voie systémique sont capables de cibler les tumeurs qu'elles soient primaires ou secondaires (Ozawa, Sato et al. 2008; Feng and Chen 2009; Loebinger, Eddaoudi et al. 2009; Balyasnikova, Ferguson et al. 2010; Loebinger and Janes 2010; Porada and Almeida-Porada 2010). Après injection systémique, les CSM se greffent au niveau du foyer inflammatoire. Elles restent détectables uniquement au niveau des sites de lésions et se localisent au niveau des sites de développements tumoraux. La capacité des CSM de se fixer au niveau des gliomes après administration vasculaire, malgré la difficulté d'accès à ce type de tumeur, leur confère une propriété intéressante pour le développement d'outils théranostiques (Kosztowski, Zaidi et al. 2009). Nakamizo et al. ont été les premiers à montrer que les CSM pourraient se greffer d'elles-mêmes dans des gliomes humains (Nakamizo, Marini et al. 2005). Par conséquent, les CSM pourraient être utilisées pour délivrer des thérapies ciblées,

notamment pour le traitement des cancers (Birnbaum, Roeder et al. 2007; Ozawa, Sato et al. 2008; Loebinger, Eddaoudi et al. 2009; Wang, Cao et al. 2009; Loebinger and Janes 2010; Motaln, Schichor et al. 2010; Porada and Almeida-Porada 2010).

Cependant, les mécanismes moléculaires exacts mis en jeu lors de la migration des CSM vers les tumeurs solides ainsi que les signaux qui guident les CSM ne sont pas complètement élucidés.

L'explication la plus probable de cette migration est que la tumeur se comporte comme un site d'inflammation chronique en libérant un gradient chemotactique de chemokines et de cytokines (Dwyer, Khan et al. 2010; Loebinger and Janes 2010). Ainsi, la tumeur libère en permanence des signaux inflammatoires, des chemokines et des cytokines qui interagissent avec les récepteurs des CSM pour les recruter (Feng and Chen 2009; Loebinger, Eddaoudi et al. 2009; Wang, Cao et al. 2009; Hu, Fu et al. 2010) (Figure 3).



**Figure 3 : Schéma explicatif du tropisme tumoral naturel des CSM**

La tumeur sécrète des cytokines, des chemokines et des facteurs solubles dans le microenvironnement tumoral et forme un gradient de concentration du plus concentré (en rouge) au moins concentré (en jaune) qui interagit avec les récepteurs membranaires des CSM. La chemokine CXCR4 (écrite en rouge) est la plus importante impliquée dans le tropisme tumoral.

Le tropisme tumoral des CSM peut faire intervenir plusieurs combinaisons de récepteurs/ligands (Hu, Fu et al. 2010). Les études qui ont tenté de déterminer le mécanisme de migration des CSM se sont basées sur l'étude *in vitro* des récepteurs chemokiniques présents sur la surface cellulaire des CSM et leur importance fonctionnelle. Cette approche a cependant conduit à un manque de consensus entre les études en raison de la différence des récepteurs étudiés. En effet, les CSM possèdent une grande variété de récepteurs cytokiniques et chemokiniques (Kallifatidis, Beckermann et al. 2008; Hu, Fu et al. 2010; Loebinger and Janes 2010). Un grand nombre de cytokines et leurs récepteurs (tels que SDF-1/CXCR4, SCF/c-Kit, HGF/c-Met, VEGF/VEGFR, MCP-1/CCR2 et HMGB1/RAGE) ainsi que des molécules d'adhésion (telles que les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$ ), de même que des facteurs solubles (tels que l'EGF-A, le FGF, le PDGF, le SDF-1/CXCL12, l'IL-8, l'IL-6, le GCSF, l'Ang1, le CCL2, le HGF, le TGF $\beta 1$  et l'activateur du plasminogène) seraient impliqués dans le tropisme tumoral des CSM (Feng and Chen 2009; Sasportas, Kasmieh et al. 2009; Dwyer, Khan et al. 2010).

De plus, il semble que les CSM utilisent un mécanisme semblable à celui utilisé par les leucocytes pour leur extravasation depuis le compartiment vasculaire en utilisant des molécules d'adhésion et des intégrines (Loebinger and Janes 2010). En effet, les récepteurs impliqués dans les mouvements tels que la fixation, le roulement, l'adhésion et la transmigration des leucocytes depuis la circulation sanguine vers les tissus sont exprimés sur les CSM (Dwyer, Khan et al. 2010).

Les CSM représentent donc un outil intéressant pour le ciblage des tumeurs *in vivo*. Cependant, il existe une controverse dans la littérature en ce qui concerne leurs propriétés naturelles pro- ou anti-cancéreuses.

## **2.2 Mécanisme d'action des CSM favorisant le développement tumoral**

La capacité des CSM à favoriser le développement tumoral serait attribuée à plusieurs phénomènes. D'une part, les CSM ont la capacité de se différencier en cellules endothéliales qui peuvent participer au processus néoplasique en facilitant la néoangiogénèse tumorale, favorisant ainsi le développement de la tumeur. En effet, les CSM expriment des facteurs pro-angiogéniques, notamment l'angiopoïétine-1, le VEGF et des facteurs de croissance tels que le PDGF, le FGF-2 et le FGF-7, mais également des cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$  ainsi que

l'activateur du plasminogène. Toutes ces molécules agissent de manière synergique sur les cellules endothéliales pour promouvoir la vasculogénèse et l'angiogénèse, favorisant ainsi le développement tumoral grâce à l'oxygénation et à l'apport de nutriments aux cellules tumorales (Feng and Chen 2009; Tang, Wang et al. 2009).

D'autre part, le pouvoir immunosuppresseur naturel des CSM fait qu'elles pourraient inhiber ou restreindre la réponse immunitaire, participant ainsi à la formation d'un microenvironnement tumoral immunodéprimé qui favoriserait la croissance tumorale et le développement de métastases (Feng and Chen 2009; Zhu, Sun et al. 2009).

Par ailleurs, en raison des propriétés de différenciation *in vitro* des CSM, Matushansky et al. ont émis l'hypothèse que des tumeurs peuvent se développer à partir de CSM transformées ayant un fort pouvoir invasif (Matushansky, Hernando et al. 2007).

Le rôle potentiel des CSM dans l'initiation ou la progression tumorale est une préoccupation importante qui doit être complètement élucidée afin de pouvoir les utiliser en diagnostic et/ou en thérapie cellulaire.

### **2.3 Mécanisme d'action anti-tumorale des CSM**

Alors qu'il s'avère que les CSM peuvent présenter des propriétés pro-cancéreuses, d'autres études au contraire mettent en évidence des propriétés anti-cancéreuses.

Après migration jusqu'à la tumeur, les CSM semblent inhiber la croissance tumorale. Peu d'éléments sont connus concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans cette inhibition (Qiao, Xu et al. 2008).

Les différentes études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont conduit à plusieurs hypothèses que ce soit un mécanisme par interaction directe cellule/cellule ou par sécrétion de cytokines (Feng and Chen 2009; Zhu, Sun et al. 2009). En effet, Matuskova et al. ont montré que les CSM interagissent avec des cellules tumorales et communiquent par l'intermédiaire de jonctions. Il a été mis en évidence que les CSM forment des jonctions avec les cellules du glioblastome et peuvent être des véhicules cellulaires pour exercer un effet cytotoxique en utilisant une combinaison enzyme/prodrogue HSV-Tk/GCV (Herpes Simplex Virus-Thymidine kinase/GanCicloVir) (Matuskova, Hlubinova et al. 2010).

Une autre explication de cette action anti-tumorale serait que les CSM augmenteraient l'expression des ARNm des régulateurs négatifs du cycle cellulaire tels que p21 et l'apoptose

associée à la protéase caspase 3. Ceci conduirait à un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et à la mort des cellules tumorales par apoptose (Feng and Chen 2009).

Par ailleurs, Motaln et al. ont mis en évidence que les CSM inhibent le phénotype malin des cellules cancéreuses en diminuant leur expression oncogénique (c-myc, PCNA et  $\beta$ -catenin) et augmentent le temps de latence de la formation tumorale (Motaln, Schichor et al. 2010). Cette inhibition du phénotype malin par les CSM a également été mise en évidence par Qiao et al. dans un modèle d'hépatocarcinome humain (Qiao, Xu et al. 2008).

Cependant, les propriétés anticancéreuses observées dépendent de la quantité de CSM utilisée car il existe un effet seuil. En dessous d'un certain seuil, à déterminer expérimentalement, aucun effet n'est observable (Feng and Chen 2009). Ainsi, il a été montré que l'injection de CSM chez des rats porteurs de carcinomes du colon entraîne une inhibition de la croissance tumorale qui devient totale lorsque la quantité de CSM injectée est au moins égale au nombre de cellules tumorales présentes (Dwyer, Khan et al. 2010).

## **2.4 Cellules souches mésenchymateuses et néoangiogénèse tumorale**

Plusieurs études ont montré que les CSM ont un rôle dans la néoangiogénèse tumorale, favorisant ainsi le développement de la tumeur en améliorant l'apport d'oxygène et de nutriments.

L'augmentation de la néoangiogénèse tumorale par les CSM se fait par deux processus.

Le premier processus implique une sécrétion paracrine de cytokines alors que le deuxième processus implique la différenciation des CSM elles-mêmes.

En effet, suite à la stimulation des CSM par des cytokines inflammatoires, telles que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , présentes dans le microenvironnement tumoral, les CSM activent les voies de signalisation HIF-1 $\alpha$ , MEK, PI3-K et, par conséquent, exercent des effets paracrines sur les cellules endothéliales en sécrétant des facteurs tels que VEGF, Ang-1, bFGF, HGF, IL-6, TGF- $\beta$  et IL-8 contribuant directement à la formation de vaisseaux dans le microenvironnement tumoral. Ceci entraîne une augmentation de l'angiogénèse tumorale (Wang, Crisostomo et al. 2008; De Luca, Gallo et al. 2011; Liu, Han et al. 2011). Le VEGF joue un rôle clef dans l'angiogénèse en stimulant les progéniteurs endothéliaux alors que l'Ang-1 joue un rôle dans la maturation des néovaisseaux et maintient l'intégrité vasculaire. Il



en résulte une augmentation de la densité en capillaires (Wu, Chen et al. 2007; Suzuki, Sun et al. 2011). De plus, ces cytokines ont un effet synergique entre elles pour augmenter l'angiogénèse (Al-Khaldi, Eliopoulos et al. 2003; Kinnaird, Stabile et al. 2004; Suzuki, Sun et al. 2011; Wang, Zhang et al. 2011).

Par ailleurs, en plus de sécréter des facteurs pro-angiogéniques, les CSM contribuent directement à la néoangiogénèse tumorale en se différenciant en cellules endothéliales ou en péricytes supportant le développement des vaisseaux sanguins (Sun, Zhang et al. 2005; Beckermann, Kallifatidis et al. 2008; Suzuki, Sun et al. 2011).

Cependant, bien que la majorité des études ait mis en évidence des propriétés pro-angiogéniques des CSM, d'autres études ont montré le contraire.

Ainsi, Menge et al. ont étudié l'impact des CSM sur les cellules endothéliales (EC), ces cellules étant les premières rencontrées par les CSM lors de leur administration par voie intravasculaire. Ils ont mis en évidence que les CSM diminuent la prolifération des cellules endothéliales et leur potentiel angiogénique par un mécanisme de contact direct CSM-EC et la production de facteurs solubles biologiquement actifs. En effet, les CSM favorisent l'interaction VE-Cadherin/ $\beta$ -catenin à la surface des cellules endothéliales, ce qui permet de stabiliser les cellules endothéliales et, par suite, de diminuer leur prolifération (Menge, Gerber et al. 2013).

## **Chapitre 2 : Utilisation d'un vecteur synthétique comme outil théranostique : les nanoparticules**

Les nanoparticules sont les outils théranostiques les plus étudiés actuellement et font l'objet de plusieurs revues. En effet, leur taille est suffisante pour permettre des fonctionnalisations multiples associant des agents d'imagerie avec des agents thérapeutiques. Ces particules sont capables d'améliorer la solubilité d'une molécule, de localiser des cellules malignes et également de cibler et d'éliminer les cellules cancéreuses avec un minimum d'effets indésirables (Svenson 2013).

Par ailleurs, en plus du ciblage actif, les nanoparticules permettent de cibler les tumeurs de façon passive grâce à l'effet *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) qui va leur permettre de s'accumuler au sein des tumeurs en quantité variable selon la lignée tumorale.

Dans le cadre de ma thèse, nous étudions l'utilisation d'un spray de nanoparticules pouvant être administré dans les poumons pour le théranostic du CBNPC. Cette méthode peu invasive peut être utilisée chez des patients ayant un cancer disséminé dans les poumons et ayant un état général dégradé. Les nanoparticules permettent le greffage de ligands à leur surface, tels que les anticorps monoclonaux spécifiques des cellules cancéreuses. Nous étudions ici l'exemple du Cetuximab.

### **1 Les nanoparticules**

L'avènement de la nanomédecine depuis une dizaine d'années, a permis d'améliorer considérablement les outils thérapeutiques en augmentant l'efficacité, la spécificité et la sécurité biologique des principes actifs en améliorant leur administration. Les nanoparticules sont définies par leur taille comprise entre 5 et 300 $\mu\text{m}$  et sont extrêmement modulables (Faraji and Wipf 2009).

Trois générations de nanoparticules ont été élaborées. La première génération de nanoparticules permettait d'encapsuler des principes actifs afin d'améliorer leur biodistribution après une administration systémique en diminuant l'élimination rénale. Cependant, de par leur caractère de corps étranger, ces particules présentaient l'inconvénient d'activer fortement le système immunitaire. Ainsi, une seconde génération de nanoparticules a été développée en les recouvrant d'une couche protectrice de polymères permettant d'échapper à leur reconnaissance par le système immunitaire. Ce sont des nanoparticules dites « furtives » (Moghimi, Hunter et al. 2001).

Enfin, afin d'améliorer le ciblage spécifique, une troisième génération de nanoparticules non seulement furtives mais également ciblantes a été développée. Ces nanoparticules, greffées avec des anticorps monoclonaux (Tada, Higuchi et al. 2007), vont permettre de reconnaître spécifiquement un tissu donné comme par exemple un tissu tumoral.

Ainsi, nous pouvons aujourd'hui développer une grande variété de nanoparticules, chacune ayant des propriétés adaptées à leur utilisation expérimentale ou clinique (Figure 4).

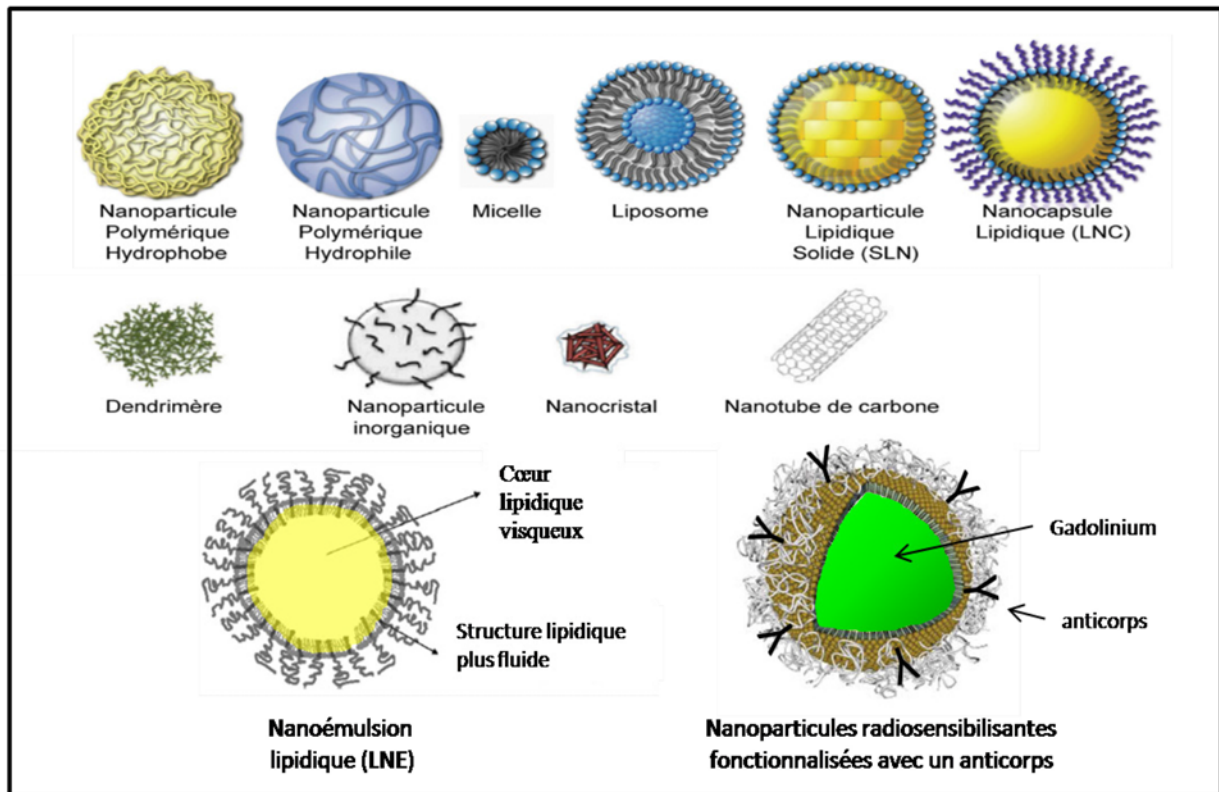


Figure 4 : Les différentes nanoparticules utilisées en Recherche biomédicale

Adaptée de (Faraji and Wipf 2009; Kabanov and Vinogradov 2009; Hirsjarvi, Dufort et al. 2013)

## 2 L'Epidermal Growth Factor Receptor

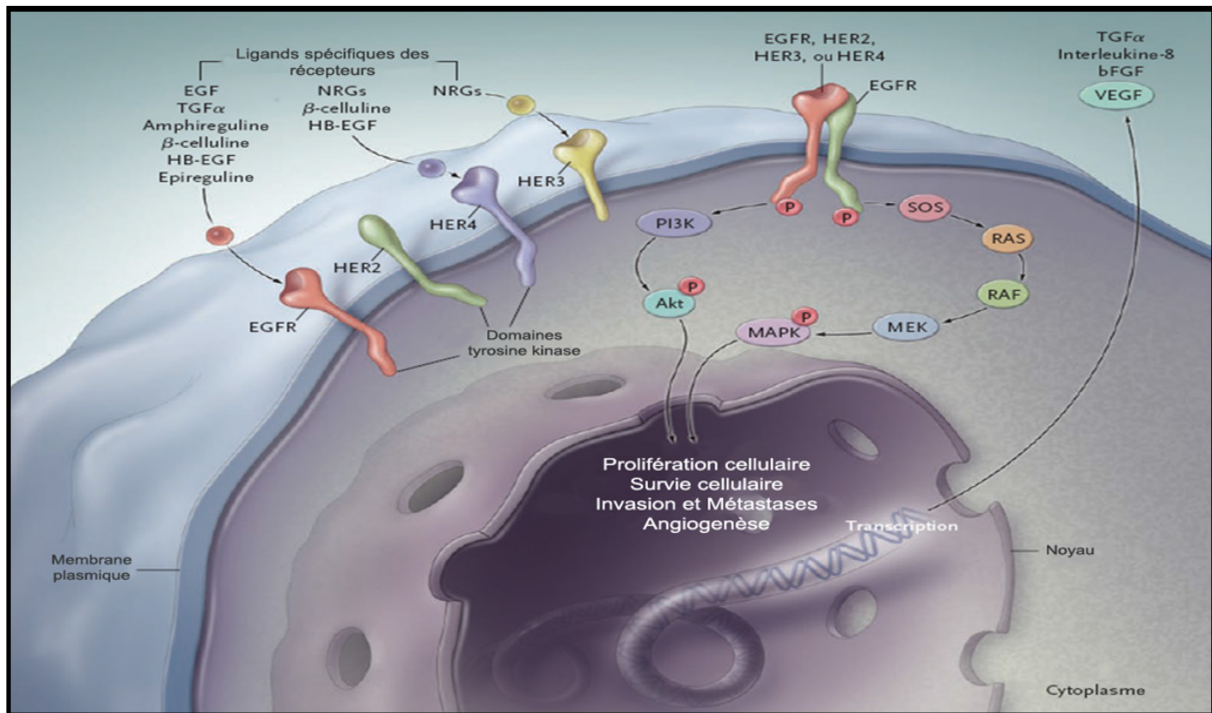
L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) est un récepteur cellulaire membranaire fortement surexprimé dans différents cancers tels que le cancer du colon, les cancers ORL et le CBNPC. Ainsi, le développement d'outils théranostiques ciblant l'EGFR permettrait un ciblage spécifique des cellules tumorales.

### 2.1 Structure et mécanisme d'action de l'EGFR

L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille HER des récepteurs à tyrosine kinase.

Cette famille HER (Human Epidermal growth factor Receptor) est également nommée Erb-B d'après son analogie avec un oncogène d'un virus d'érythroblastose aviaire.

Quatre types de récepteurs composent la famille HER : HER1 (aussi nommé EGFR ou Erb-B1), HER2 (aussi nommé neu ou Erb-B2), HER3 (aussi nommé Erb-B3) et HER4 (aussi nommé Erb-B4). Ces récepteurs jouent un rôle très important dans la croissance, la différenciation et le métabolisme cellulaire (Sibilia and Wagner 1995; Normanno, De Luca et al. 2006; Ciardiello and Tortora 2008) (Figure 5).

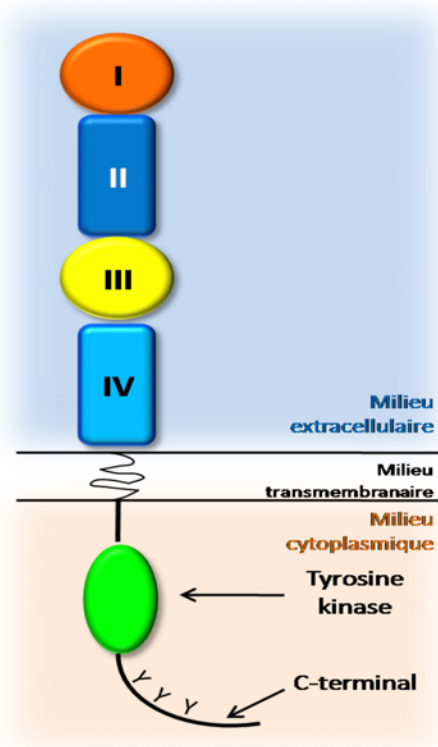


**Figure 5 : Voies de signalisation contrôlées par l'activation de l'EGFR**

La fixation du ligand sur le récepteur EGFR va permettre l'association de deux monomères en un dimère actif. Cette dimérisation du récepteur conduit à l'activation de l'activité tyrosine kinase du domaine intracellulaire qui se traduit par une autophosphorylation du récepteur au niveau de son extrémité C-terminale. Ceci va entraîner une phosphorylation en cascade de diverses voies de signalisation intracellulaire, en particulier la voie RAS/MAPK, la voie Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt (PI3K/Akt) et la voie STAT. L'activation de ces différentes voies initie la transcription d'évènements influençant l'apoptose, l'angiogenèse, la motilité cellulaire, l'invasion, l'adhésion et la réparation. D'après (Ciardiello and Tortora 2008)

Les protéines de la famille HER sont des glycoprotéines transmembranaires de 150 à 170kDa. Elles sont constituées d'un domaine extracellulaire hydrophile, d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'un domaine cytoplasmique à activité tyrosine-kinase.

Le domaine extracellulaire de chaque récepteur HER est composé de quatre sous-domaines (I à IV). Les sous-domaines I et III (aussi nommés L1 et L3) sont sous forme d'hélice beta et sont importants pour la liaison du ligand (Figure 6).



**Figure 6 : Structure schématique des récepteurs de la famille HER**

La partie extracellulaire du récepteur (~ 620 acides aminés) est composée de 4 domaines, homologues 2 à 2. Les domaines I et III, qui permettent la fixation du ligand et les domaines II et IV aussi nommés CR1 et CR2 (pour *Cystein Rich*). Suivent ensuite le domaine transmembranaire (~ 23 aa), le domaine juxtamembranaire (~ 45 aa), le domaine tyrosine kinase (~ 260 aa) et un domaine C-terminal (de 230 à 380 aa) qui peut être phosphorylé au niveau des tyrosines (Y). Adaptée de (Holbro and Hynes 2004)

Le ligand principal de l'EGFR est une hormone polypeptidique à simple chaîne, isolée de la glande sous-maxillaire des souris : l'Epidermal Growth Factor (EGF) (Schreiber, Lax et al. 1981; Normanno, De Luca et al. 2006).

Des études structurales ont montré que les domaines extracellulaires des protéines de la famille de l'EGFR ont un mécanisme particulier de dimérisation induite par un ligand ; celle-ci a un rôle important pour l'activation de leur domaine tyrosine kinase. L'interaction entre les récepteurs se fait par l'intermédiaire d'une structure en épingle à cheveux sur le sous-domaine II. La liaison d'un ligand avec le domaine extracellulaire d'un récepteur Erb-B induit la formation d'un récepteur homo ou hétérodimérique et, par suite, l'activation du domaine à activité tyrosine kinase qui permet le recrutement des protéines initiatrices (Li, Schmitz et al. 2005; Normanno, De Luca et al. 2006; Ciardiello and Tortora 2008). Ce recrutement de protéines dites adaptatrices, phosphorylées par la tyrosine kinase du récepteur, va se

poursuivre par l'activation, *via* une phosphorylation en cascade, de diverses voies de signalisation intracellulaire. D'une part, les récepteurs Erb-B induisent l'activation de la voie ras/raf/MEK/MAPK. Cette voie des MAP-kinase (*Mitogen Activated Protein Kinase*) stimule la synthèse de nombreux facteurs de transcription et est essentielle pour la prolifération et la différenciation cellulaire. D'autre part, la voie des Phosphatidyl Inositol-3 Kinases (PI3K) est activée. Cette voie joue un rôle central dans la régulation des voies antiapoptotiques par activation de la protéine kinase Akt. Enfin, la voie de STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3) est impliquée dans la prolifération, dans l'apoptose et l'angiogenèse (Figure 7).

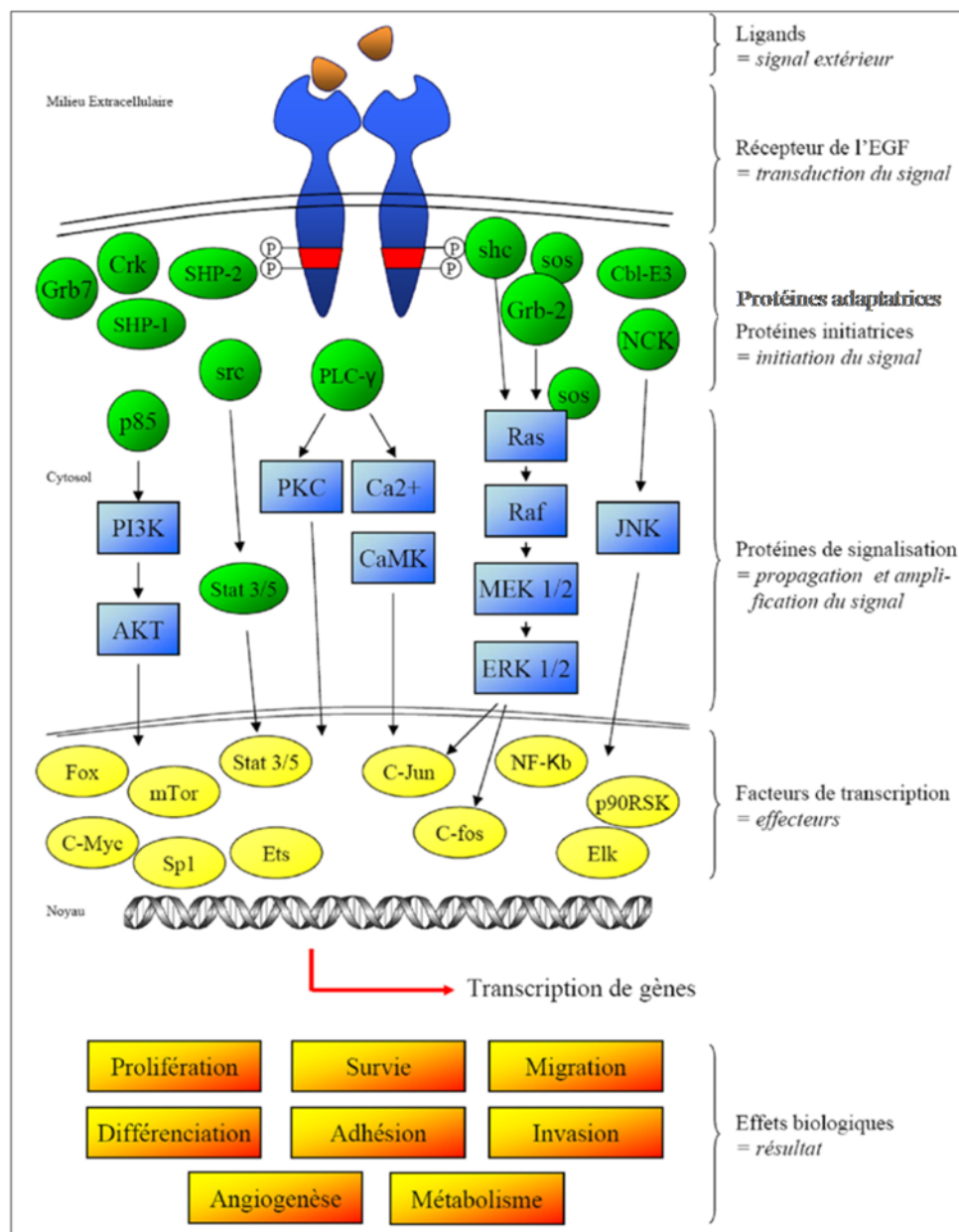


Figure 7 : Les différentes voies de signalisation cellulaire faisant suite à l'activation de l'EGFR

D'après (Holbro, Civenni et al. 2003)

## 2.2 Rôle de l'EGFR dans la tumorigénèse

L'EGFR joue un rôle physiopathologique important dans le processus tumoral. En effet, il appartient à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance. Or, la plupart des proto-oncogènes codent pour différentes protéines qui sont soit des facteurs de croissance soit des récepteurs aux facteurs de croissance ou enfin des protéines impliquées dans les voies de transduction de signaux intracellulaires. Les proto-oncogènes cellulaires activés peuvent aussi contrôler la production des facteurs de croissance endogènes et/ou la réponse des cellules tumorales à leur égard.

Différentes familles de récepteurs aux facteurs de croissance et de facteurs de croissance sont impliquées dans la croissance des cellules cancéreuses. Parmi eux, l'EGFR et les facteurs de croissance de la famille des EGF ont un rôle central dans la pathogénèse et dans la progression de différents types de carcinomes. En effet, l'autophosphorylation de l'EGFR déclenche une série de voies intracellulaires qui conduisent à la prolifération des cellules cancéreuses, à l'inhibition de l'apoptose, à l'activation de l'invasion et au développement des métastases et enfin à l'augmentation de la néovascularisation (Salomon, Brandt et al. 1995; Normanno, De Luca et al. 2006; Ciardiello and Tortora 2008; Rosell, Robinet et al. 2008).

Des études ont montré que la surexpression de l'EGFR conduit à la transformation maligne des cellules. La transformation de ces cellules par l'EGFR est dépendante de l'EGF exogène requis pour activer le récepteur. Ces données indiquent que la surexpression de l'EGFR est capable d'induire la transformation cellulaire en présence d'une quantité suffisante de ligands. De plus, le blocage de l'EGFR conduit à une inhibition de la croissance des différentes lignées cellulaires dérivant d'un carcinome humain que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Normanno, De Luca et al. 2006).

La croissance et la survie des cellules cancéreuses semblent être soutenues par des récepteurs et des ligands de la famille ErbB. Ce phénomène est important pour les approches thérapeutiques puisque la réponse aux traitements anti-EGFR dépend du niveau total d'expression des récepteurs ErbB et de leurs ligands dans les cellules tumorales (Normanno, De Luca et al. 2006).

## 2.3 Intérêt de cibler l'EGFR

L'expression d'un grand nombre de récepteurs à la surface des cellules tumorales est d'une importance majeure pour le devenir de la tumeur. En effet le grand nombre de récepteurs peut

augmenter la sensibilité des cellules tumorales à une faible concentration de facteurs de croissance tumoraux (Normanno, De Luca et al. 2006).

L'EGFR est impliqué dans le développement des cancers épithéliaux dont le cancer du sein, du colon, du rein, du poumon, du pancréas et de la prostate. Une grande quantité de récepteurs a été retrouvée dans 30 à 40% des carcinomes mammaires où leur expression est inversement corrélée à l'expression des récepteurs aux œstrogènes et semble conférer un mauvais pronostic. Dans les tumeurs astrocytaires, l'amplification du gène *egfr* est préférentiellement associée à une tumeur de haut grade (grade III ou IV) et est présente dans 40% des glioblastomes multiformes (Garcia de Palazzo, Adams et al. 1993; Moscatello, Holgado-Madruga et al. 1995; Li, Schmitz et al. 2005). De même, l'EGFR est surexprimé dans la majorité des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) et dans 30 à 50% des carcinomes pancréatiques humains où il contribue à la physiopathologie des tumeurs. Il joue un rôle de stimulateur de la prolifération cellulaire en augmentant leur survie, en facilitant leur migration et en favorisant leur angiogénèse (Overholser, Prewett et al. 2000; Pallis, Serfass et al. 2009).

La co-expression de l'EGFR avec l'EGF ou avec le Tumor Growth Factor ( $TGF-\alpha$ ) est associée à la taille de la tumeur, à l'avancée dans le stade clinique et à la diminution de la survie du patient. En effet, la mutation activatrice de l'EGFR dans une cellule cancéreuse est un facteur important dans la croissance de la cellule tumorale en bloquant l'apoptose, en augmentant la production de facteurs angiogéniques et en facilitant les processus de métastases. Ces études suggèrent que le blocage de l'EGFR présent sur les cellules pancréatiques tumorales peut être un moyen de limiter la progression de la maladie en inhibant la croissance des cellules tumorales ou en induisant leur apoptose (Overholser, Prewett et al. 2000). Le Gécitinib est une petite molécule inhibitrice de la tyrosine kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique et est un traitement efficace pour les patients ayant une tumeur avec mutation activatrice de la tyrosine kinase de l'EGFR. Ainsi, notre groupe a développé des méthodes de pyroséquençage permettant de détecter les deux mutations majeures de l'EGFR et les mutations de KRAS afin de prédire la sensibilité des patients au traitement par Gécitinib (Dufort, Richard et al. 2009; Dufort, Richard et al. 2011).

Cependant, l'EGFR comme facteur de pronostic dans le cancer du poumon est sujet à controverse dans la littérature.



En effet Salomon *et al.* ont montré que c'est un facteur pronostique important dans le CBNPC puisqu'un niveau d'expression élevé est retrouvé dans les stades avancés (stade III) alors qu'il ne l'est pas pour des stades précoces (stades I et II). Ils ont également montré que la surexpression de l'EGFR est associée à un potentiel métastatique élevé et à une forte prolifération tumorale entraînant un mauvais pronostic pour le patient (Salomon, Brandt et al. 1995).

Inversement, Nicholson *et al.* indiquent que l'EGFR n'est pas un facteur pronostique dans le cas du CBNPC alors qu'il l'est dans les cancers ORL, des ovaires, du col de l'utérus, de la vessie et de l'œsophage. Cette affirmation est confirmée par Garcia de Palazzo *et al.* Dans ces cancers, une augmentation de l'expression de l'EGFR est associée à des rechutes fréquentes et à une diminution du taux de survie. En effet chez des patients porteurs d'un cancer de l'œsophage, la survie à cinq ans est de 69% dans le cas de faibles taux d'EGF et d'EGFR alors qu'elle est de 14% chez des patients avec un taux élevé d'EGF et d'EGFR. En revanche, dans les cancers de l'estomac, du sein, de l'endomètre et du colon, l'EGFR n'est pas un facteur pronostique (Garcia de Palazzo, Adams et al. 1993; Nicholson, Gee et al. 2001).

En conclusion, la forte expression de l'EGFR dans un grand nombre de cancers en fait une cible de choix pour la détection et le traitement tumoral mais également pour la distinction des cellules saines des cellules cancéreuses. En effet, des études d'imagerie faites sur des patients présentant un cancer des poumons ont révélé que plus de 94% des lésions primaires et des métastases présumées ont été détectées grâce à un anticorps anti-EGFR (Garcia de Palazzo, Adams et al. 1993).

### **3 Le Cetuximab : un anticorps monoclonal anti-EGFR**

#### **3.1 Caractéristiques**

Depuis 20 ans, un panel d'anticorps anti-EGFR a été développé en immunisant des souris avec des cellules épidermoïdes humaines A431 qui surexpriment l'EGFR. Les anticorps se liant au domaine extracellulaire de l'EGFR ont été sélectionnés et enfin seuls ceux inhibant la liaison à l'EGF et la phosphorylation du récepteur ont été conservés. Un de ces anticorps a été produit sous forme chimérique. Cet anticorps, le Cetuximab (précédemment nommé IMC-C225), a fait l'objet d'une importante étude pour son utilisation comme agent anticancéreux et a été approuvé par la FDA en février 2004 pour son utilisation dans le traitement des cancers colorectaux avancés surexprimant l'EGFR (Li, Schmitz et al. 2005).

Le Cetuximab (Erbitux®) est un anticorps monoclonal chimérique humain-murin anti-EGFR, de type immunoglobuline G1. Le Cetuximab a une forte affinité pour le domaine extracellulaire de l'EGFR, conduisant à l'internalisation du récepteur, à l'inhibition de la phosphorylation et au blocage de la voie de signalisation (Lilenbaum 2006; Ciardiello and Tortora 2008; Pirker, Pereira et al. 2009).

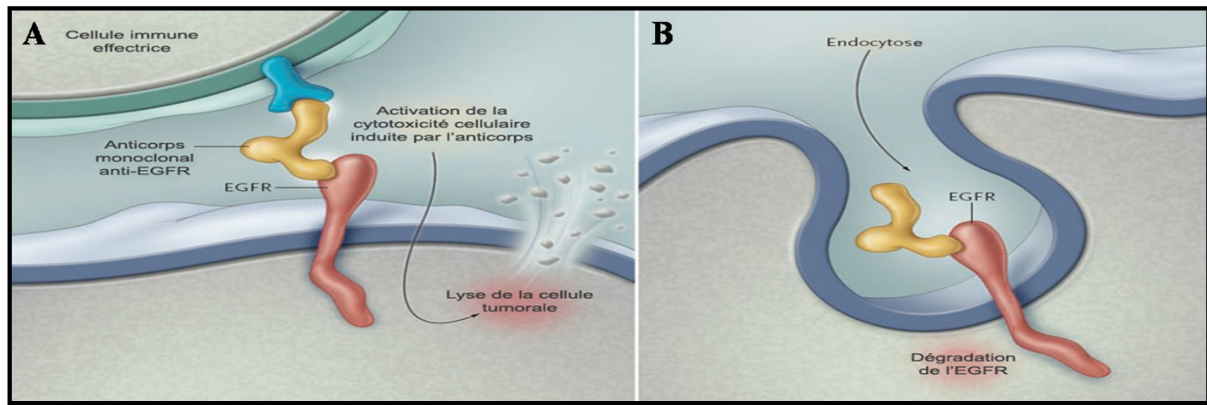
### **3.2 Mécanisme d'interaction avec l'EGFR**

Le Cetuximab est un anticorps monoclonal se liant au domaine extra-cellulaire de l'EGFR de manière compétitive. Ainsi, il empêche la liaison d'un ligand exogène sur l'EGFR. Sa liaison sur l'EGFR entraîne la formation d'un complexe anticorps-récepteur qui sera internalisé, diminuant ainsi le nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire. De plus, les voies de signalisation dépendantes de l'EGFR ne pourront plus être activées (Overholser, Prewett et al. 2000; Pallis, Serfass et al. 2009; Pirker, Pereira et al. 2009).

Le Cetuximab interagit exclusivement avec le sous-domaine III de la partie soluble extracellulaire de l'EGFR, en occultant partiellement la région de liaison avec le ligand et évite, en créant une gêne stérique, que le récepteur n'adopte une forme adaptée pour la dimérisation (Li, Schmitz et al. 2005; Lilenbaum 2006).

Cet anticorps a cinquante fois plus d'affinité pour l'EGFR que l'EGF n'en a. En effet la surface d'interface avec l'anticorps est plus polaire que celle des facteurs de croissance et permet ainsi la formation d'un plus grand nombre de liaisons hydrogènes et donc la formation d'un complexe plus stable.

Une fois le Cetuximab lié à l'EGFR, la région  $V_H$  de l'anticorps bloque stériquement le sous-domaine I, empêchant la fixation du ligand et empêche le sous-domaine II d'adopter la conformation requise pour la dimérisation, diminuant ainsi l'affinité de l'EGFR. Le Cetuximab prévient la liaison d'un ligand sur l'EGFR, inhibe la dimérisation du récepteur et bloque l'autophosphorylation et, par suite, l'activation du récepteur (Figure 8). De plus, le Cetuximab ne se dissocie pas de l'EGFR dans l'endosome car il est moins sensible au pH et doit passer par une dégradation lysosomale. Ceci entraîne une nette diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire (Li, Schmitz et al. 2005).



**Figure 8 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux anti-EGFR sur les cellules tumorales**

Le Cetuximab (anticorps monoclonal anti-EGFR), qui est une immunoglobuline G1, peut susciter la réponse immune anti-tumorale de l'hôte, impliquant une cytotoxicité à médiation cellulaire, dépendante de l'anticorps (partie A). De plus, les anticorps monoclonaux anti-EGFR peuvent induire l'internalisation de l'EGFR et sa diminution d'expression, régulant ainsi la dégradation du récepteur (partie B). Ces deux mécanismes semblent contribuer de manière importante à l'activité anti-tumorale des anticorps anti-EGFR. D'après (Ciardiello and Tortora 2008)

L'intérêt d'utiliser un anticorps monoclonal est, outre d'inhiber la liaison des ligands avec l'EGFR, de bénéficier des effets immunologiques de l'anticorps lui-même avec des effets de cytotoxicité et les effets dus à l'activation du complément mais également de reconnaître les cellules tumorales (Li, Schmitz et al. 2005; Lilenbaum 2006; Pirker, Pereira et al. 2009).

### 3.3 Essais cliniques

Le Cetuximab a fait l'objet de nombreux essais cliniques durant les vingt dernières années dans la prise en charge de certains cancers en association avec la radio et/ou la chimiothérapie conventionnelle.

En 1995, Moscatello *et al.* ont montré que des anticorps monoclonaux, conjugués avec un marqueur radioactif  $I^{131}$  Iode, peuvent entraîner la régression tumorale chez des souris porteuses de tumeurs qui surexpriment l'EGFR. Un essai clinique de phase II a ensuite été réalisé pour évaluer l'efficacité de ciblage du récepteur EGFR par ces anticorps monoclonaux chez des patients porteurs d'un glioblastome (Moscatello, Holgado-Madruga et al. 1995).

Le Cetuximab a montré son efficacité en combinaison avec une chimiothérapie conventionnelle chez des patients présentant un cancer ORL. L'anticorps a donc été testé en essais cliniques de phase III pour la prise en charge des carcinomes ORL. Les résultats ont mis en évidence un effet antitumoral marqué lors de son association avec des sels de platine (Cisplatine). De plus, le Cetuximab a permis une augmentation de la survie des patients

lorsqu'il est associé à la radiothérapie en comparaison avec la radiothérapie seule. Une autorisation de mise sur le marché (AMM) a été accordée par l'AFSSAPS (Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) pour la prise en charge des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, dans les formes localement avancées, en association avec la radiothérapie ou dans les formes récidivantes ou métastatiques en association avec les sels de platine (Overholser, Prewett et al. 2000; Lilenbaum 2006; Pirker, Pereira et al. 2009).

Le Cetuximab a été testé dans le cancer pancréatique humain. Il a été montré que l'anticorps affecte la croissance des tumeurs pancréatiques en inhibant la prolifération et la survie cellulaire dépendante de l'EGFR. Des études ont montré que le traitement avec le Cetuximab associé à la chimiothérapie conventionnelle et à la radiothérapie entraîne une nette diminution de la croissance tumorale chez des souris *Nude* porteuses de cellules pancréatiques cancéreuses humaines xénotreffées. Les résultats de ces études suggèrent que le blocage de l'EGFR peut-être une stratégie utile dans le traitement des cellules pancréatiques surexprimant l'EGFR. Un essai clinique de phase II est en cours pour l'utilisation du Cetuximab dans le carcinome pancréatique humain (Overholser, Prewett et al. 2000).

Le traitement adjuvant du carcinome colorectal avec une chimiothérapie conventionnelle associée au Cetuximab inhibe de manière significative la croissance des cellules tumorales et induit la mort cellulaire. Ainsi, le Cetuximab a été approuvé par la FDA et par l'EMEA (European Medicine Agency) pour la prise en charge du cancer colorectal réfractaire à la chimiothérapie à base d'Irinotecan (Ciardiello and Tortora 2008; Sobrero, Maurel et al. 2008).

La plupart des cancers bronchiques non à petites cellules surexpriment l'EGFR ; ainsi il est intéressant d'utiliser le Cetuximab en thérapie. Les résultats d'un essai randomisé de phase II chez 86 patients avec un CBNPC localement avancé et surexprimant l'EGFR ont montré une augmentation de la réponse au traitement et une augmentation de la survie des patients qui ont reçu du Cisplatine et de la Vinorelbine associés au Cetuximab en comparaison avec ceux recevant la chimiothérapie conventionnelle seule. Suite à cela, un essai clinique de phase III nommé FLEX (First Line ErbituX in lung cancer) a été mis en place dans le but de démontrer une augmentation de la durée de survie par rapport à la chimiothérapie conventionnelle seule, en première ligne de traitement chez des patients avec un CBNPC surexprimant l'EGFR. Cependant, le résultat de cette étude a été décevant avec une médiane de survie des patients traités avec le Cetuximab de 11,3 mois alors qu'elle est de 10,1 mois pour le groupe recevant la chimiothérapie conventionnelle seule. De même, un an après le traitement, 47% des

patients du groupe recevant le Cetuximab étaient vivants contre 42% pour le groupe témoin (Lilenbaum 2006; Ciardiello and Tortora 2008; Pallis, Serfass et al. 2009; Pirker, Pereira et al. 2009).

Enfin, les études de toxicité ont mis en évidence un autre avantage d'utiliser le Cetuximab. En effet, les résultats mettent en évidence un profil de toxicité des anticorps monoclonaux favorable avec seulement quelques rashes cutanés et des épisodes diarrhéiques comme effets indésirables majeurs (Lilenbaum 2006).

## **Chapitre 3 : Utilisation d'un vecteur synthétique de petite taille comme outil théranostique : le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>**

Le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> est un vecteur peptidique de petite taille, très bien défini structurellement, qui va pouvoir diffuser dans tout l'organisme après une administration *in vivo*. La structure comporte quatre groupements cRGD qui vont permettre un ciblage spécifique des intégrines  $\alpha\beta3$ . Ces intégrines sont des cibles de choix pour le développement d'outils diagnostiques car elles sont surexprimées sur les cellules endothéliales des néo-vaisseaux et sur les cellules tumorales. Ainsi, après administration par voie systémique, le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> va circuler dans l'organisme et se fixer au niveau des tumeurs.

Afin de développer un outil non seulement diagnostique mais également thérapeutique, nous avons greffé un peptide pro-apoptotique sur le complexe peptidique RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>. Ce peptide pro-apoptotique agit sur la voie apoptotique mitochondriale moins sujette aux mécanismes de résistance cellulaire.

### **1 Le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> : un nanovecteur spécifique des tumeurs**

Les outils diagnostiques et thérapeutiques ciblant la vascularisation tumorale représentent une approche puissante du traitement du cancer. En effet, non seulement l'angiogénèse est un phénomène essentiel pour la croissance tumorale mais, de plus, les cellules endothéliales vasculaires sont génétiquement stables et donc moins sujettes à des phénomènes de résistance. Par ailleurs, le contact direct des cellules endothéliales avec le flux sanguin les rend accessibles aux petites et grosses molécules véhiculées par le sang (Temming, Schiffelers et al. 2005).

#### **1.1 L'intégrine $\alpha\beta3$**

L'intégrine  $\alpha\beta3$  a été la première intégrine  $\alpha\beta$  identifiée pour réguler l'angiogénèse.

##### *1.1.1 Structure de l'intégrine $\alpha\beta3$*

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques transmembranaires qui jouent un rôle central dans le processus d'adhésion à la matrice extracellulaire.

Elles sont des glycoprotéines membranaires constituées d'un hétérodimère cationique composé de sous-unités alpha ( $\alpha$ ) et beta ( $\beta$ ) reliées de façon non covalente. Chaque sous-unité est composée d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. La combinaison des sous-unités alpha et beta détermine la spécificité du ligand et les propriétés de signalisation d'une intégrine donnée (Sancey, Ardisson et al. 2007; Avraamides, Garmy-Susini et al. 2008; Danhier, Le Breton et al. 2012).

Il existe dix-huit sous-unités  $\alpha$  et huit sous-unités  $\beta$ . Leur association en hétérodimères conduit à la formation de vingt-quatre intégrines hétérodimériques différentes, chacune ayant ses propres propriétés de liaison à la matrice extracellulaire (Byzova, Rabbani et al. 1998; Avraamides, Garmy-Susini et al. 2008; Desgrosellier and Cheresh 2010).

Les sous-unités  $\alpha_v$  et  $\beta_3$  ont un poids moléculaire apparent de  $\sim 150$  et  $\sim 100$  KDa respectivement. La sous-unité  $\alpha_v$  est composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère de 120 et 25KDa respectivement alors que la sous-unité  $\beta_3$  est constituée d'une seule chaîne lourde. La chaîne lourde de la sous-unité  $\alpha_v$  est entièrement extracellulaire alors que sa chaîne légère est transmembranaire (Byzova, Rabbani et al. 1998).

Le domaine extracellulaire de l'intégrine peut avoir deux conformations : courbée ou dépliée. Sous sa forme courbée, le site de fixation extracellulaire n'est pas accessible aux molécules de liaison ; l'intégrine est inactive. Inversement, une fois le ligand lié à l'intégrine, cette dernière adopte une conformation dépliée et devient active (Danhier, Le Breton et al. 2012).

Les intégrines se présentent naturellement sous une conformation courbée, donc de basse affinité envers les ligands. Leur conformation et leur affinité varient en réponse à des stimulations micro-environnementales et cellulaires. Des signaux intracellulaires sont nécessaires pour entraîner un *switch* des intégrines de la conformation courbée inactive vers la conformation dépliée active (Figure 9). Parmi les signaux intracellulaires entraînant le *switch* conformationnel, nous retenons la diminution du pH intracellulaire, l'augmentation du taux de calcium et de magnésium. La liaison d'un ligand avec l'intégrine entraîne un regroupement des intégrines et induit la transduction d'un signal intracellulaire (Byzova, Rabbani et al. 1998; Sancey, Garanger et al. 2009).

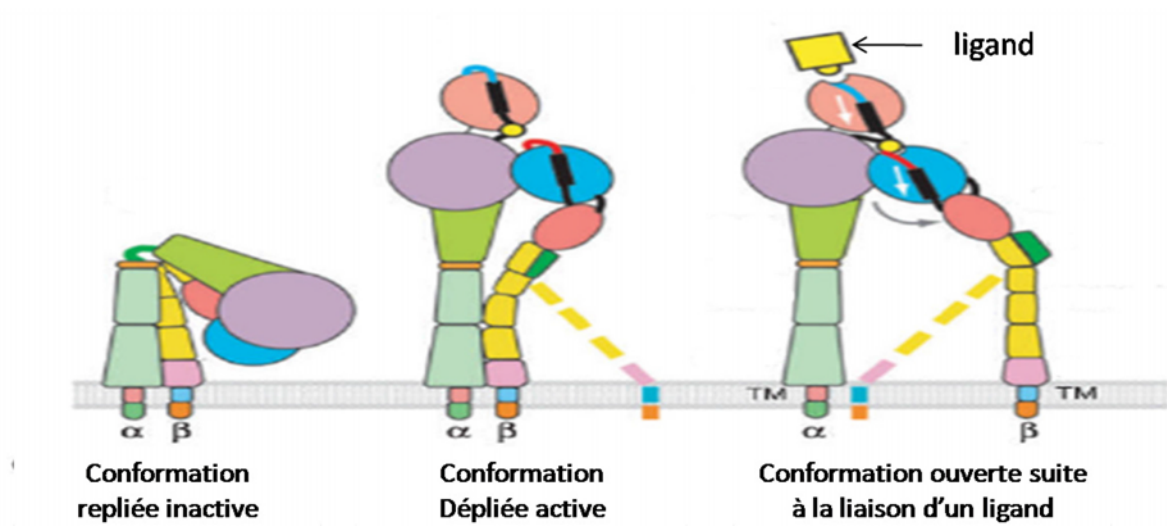


Figure 9 : Les différentes conformations de l'intégrine  $\alpha\beta 3$

D'après (Luo, Carman et al. 2007)

### 1.1.2 Rôle de l'intégrine $\alpha\beta 3$

Tout au long de leur vie, les cellules sécrètent, assemblent et remodelisent un ensemble protéique insoluble qui constitue la matrice extra-cellulaire (MEC). La MEC exerce un contrôle important sur le comportement des cellules. En effet, elle contrôle la prolifération cellulaire mais aussi l'arrêt de croissance, la migration et la mort cellulaire par apoptose (Guo and Giancotti 2004).

Les intégrines peuvent influencer l'adhésivité cellulaire durant les différents stades de l'évolution cancéreuse tels que la transformation maligne, la progression de la croissance tumorale, l'invasion veineuse et lymphatique et les métastases.

L'intégrine  $\alpha\beta 3$  est connue pour influencer tout particulièrement la survie cellulaire des cellules endothéliales. En effet, non seulement après fixation des cellules endothéliales à la fibronectine par l'intermédiaire des intégrines  $\alpha\beta 3$ , des cascades de signalisation protègent les cellules endothéliales de l'apoptose mais, en plus, les intégrines favorisent la migration des cellules endothéliales lors des phénomènes de néoangiogénèse (Avraamides, Garmy-Susini et al. 2008; Cox, Brennan et al. 2010; Danhier, Le Breton et al. 2012).

Parmi toutes les intégrines,  $\alpha\beta 3$  est l'intégrine la plus impliquée dans la régulation de l'angiogénèse. Son expression sur les cellules endothéliales est stimulée par des facteurs pro-angiogéniques tels que le FGF-2, TNF-alpha et IL-8 qui sont abondants dans les sites tumoraux et dans les sites d'inflammation.



Des études pré-cliniques et cliniques avec différents antagonistes des intégrines ont montré leur efficacité dans le blocage de la progression tumorale. Le Cilengitide, un antagoniste des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  a fait l'objet d'essais cliniques récents. Les résultats de phase I et II ont mis en évidence une bonne efficacité avec peu d'effets indésirables chez des patients porteurs d'un glioblastome de même que chez des patients avec un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) ou un cancer de la prostate, lors d'une association à la chimiothérapie conventionnelle. Ces découvertes cliniques ont conduit à la poursuite de ces tests en phase III pour le glioblastome en association avec le Témzolomide. Malheureusement, les résultats de l'essai clinique, parus en février 2013, n'ont pas mis en évidence une amélioration de la survie des patients (Avraamides, Garmy-Susini et al. 2008; Cox, Brennan et al. 2010; Desgrosellier and Cheresch 2010).

La reconnaissance des intégrines présente un intérêt pour le développement de l'imagerie tumorale mais également pour la thérapie ciblée des cancers de par la surexpression de ces intégrines sur les cellules tumorales et sur les vaisseaux tumoraux.

### *1.1.3 Intérêt de cibler l'intégrine $\alpha\beta3$*

L'expression de l'intégrine  $\alpha\beta3$  varie considérablement entre un tissu sain et un tissu tumoral. Ainsi, dans un tissu sain, elle se trouve à un niveau quasiment indétectable car elle n'est pas présente sur les cellules endothéliales quiescentes. En revanche, elle est fortement surexprimée dans les tissus tumoraux, sur les vaisseaux sanguins et sur les cellules endothéliales activées, où elle a un rôle essentiel dans le processus angiogénique, ainsi que sur les cellules tumorales selon la lignée cellulaire (Haubner, Wester et al. 2001; Garanger, Boturyn et al. 2005; Temming, Schiffelers et al. 2005; Desgrosellier and Cheresch 2010).

De plus, une étude a mis en évidence que la surexpression des intégrines peut être associée à une augmentation de la croissance tumorale et à son caractère invasif et est associée à des métastases osseuses. De même, dans le glioblastome, l'intégrine  $\alpha\beta3$  est surexprimée au niveau des marges tumorales et la quantité de fibronectine est augmentée ce qui entraîne une augmentation de la motilité cellulaire et une résistance à l'apoptose (Danhier, Le Breton et al. 2012).

L'expression dans les tissus tumoraux fait de l'intégrine  $\alpha\beta3$  une cible diagnostique et thérapeutique de choix. Les agents ciblant les intégrines peuvent être utiles pour délivrer des molécules chimiothérapeutiques spécifiquement aux tumeurs, tout en diminuant la toxicité générale de la molécule.

#### 1.1.4 Un ligand de l'intégrine $\alpha\beta3$ : le tripeptide RGD

Depuis quelques dizaines d'années les peptides RGD sont devenus des outils de choix pour la vectorisation de molécules thérapeutiques et d'agents d'imagerie de la vascularisation tumorale.

La séquence RGD a été identifiée pour la première fois dans les années 1970 par E. Ruolahti comme un site de fixation cellulaire à la fibronectine. La plupart des intégrines reconnaissent leurs protéines respectives de la matrice extracellulaire (MEC) grâce à un petit peptide constitué de trois acides aminés Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD) (Danhier, Le Breton et al. 2012).

La séquence RGD est conservée dans tous les ligands de l'intégrine  $\alpha\beta3$ , qu'ils soient naturels ou non. L'affinité et la spécificité de ces peptides et protéines sont déterminées par les autres résidus aminés présents de part et d'autre de la séquence RGD, tout particulièrement du côté de l'acide aspartique (Temming, Schiffelers et al. 2005).

Des améliorations de la conformation de la séquence RGD ont été apportées afin de procurer aux ligands RGD une meilleure stabilité, une meilleure affinité, une meilleure spécificité et une facilité de couplage chimique.

Ainsi, la cyclisation de la séquence RGD est communément utilisée pour améliorer les propriétés de fixation en donnant une rigidité à la structure. Inversement les séquences linéaires du peptide RGD sont plus sujettes aux dégradations chimiques qui sont dues à la réaction de l'acide aspartique avec la structure peptidique de base. De même, l'introduction d'acides aminés en conformation D permet l'amélioration de la stabilité peptidique.

Enfin, c(RGDfK) est souvent utilisé pour le développement de thérapies ciblées. En effet le résidu lysine (K) permet une meilleure stabilité et une facilité de couplage chimique (Temming, Schiffelers et al. 2005; Danhier, Le Breton et al. 2012).

C'est ainsi qu'un *screening* de cyclopeptides contenant la séquence RGD a permis au groupe Kessler la découverte d'un peptide de première génération très actif c[-RGDfV-] dont l'analogue alkylé c[-RGDf(NMe)V-] est un inhibiteur angiogénique connu sous le nom de Cilengitide.

Ces peptides contenant une séquence RGD représentent des composés clefs pour cibler et suivre l'expression de l'intégrine  $\alpha\beta3$ , que ce soit sur les cellules tumorales ou endothéliales

durant la néoangiogénèse dans les domaines de la recherche diagnostique et/ou thérapeutique (Boturyn, Coll et al. 2004).

Une étude clinique d'imagerie PET utilisant du <sup>18</sup>F-galacto-RGD a été réalisée. Elle a montré une bonne pharmacocinétique et une bonne imagerie de l'expression de l'intégrine  $\alpha\beta3$ . Il a également été montré que ce traceur, associé à un PET scan chez le petit animal, permettrait de monitorer le blocage de l'intégrine  $\alpha\beta3$  par des antagonistes spécifiques *in vivo* chez la souris (Haubner, Wester et al. 2001).

De nombreuses équipes de recherche ont testé l'utilisation du peptide RGD dans différents modèles.

Gerlag *et al.* ont utilisé un peptide RGD cyclique dans un modèle de souris avec des inflammations articulaires. Le peptide RGD cyclique s'est lié à l'intégrine  $\alpha\beta3$  des vaisseaux de l'articulation enflammée et a permis de diminuer l'inflammation (Gerlag, Borges et al. 2001).

Avraamides et al. ont montré que des peptides cycliques RGD PEGylés marqués avec du <sup>18</sup>F ou du <sup>64</sup>Cu permettent la détection, par imagerie, de tumeurs mammaires ou cérébrales xéno greffées à partir d'une taille de 1,5mm de diamètre (Avraamides, Garmy-Susini et al. 2008).

## 1.2 Le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>

Des ligands présentant des motifs RGD multimériques ont été décrits. De par le fonctionnement naturel des intégrines qui utilisent des interactions multivalentes, cette approche permettrait une meilleure affinité des molécules mais aussi un système qui pourrait améliorer le ciblage cellulaire. En effet, l'interaction multivalente des RGD induit une voie d'endocytose dépendante des intégrines (Boturyn, Coll et al. 2004; Garanger, Boturyn et al. 2005; Temming, Schiffelers et al. 2005; Danhier, Le Breton et al. 2012).

Notre groupe a développé une plateforme peptidique RAFT (*Regioselectivity Adressable Functionalised Template*), sur laquelle quatre séquences cRGD sont greffées, qui a montré des propriétés de fixation spécifique à l'intégrine  $\alpha\beta3$  *in vitro* (Figure 10).

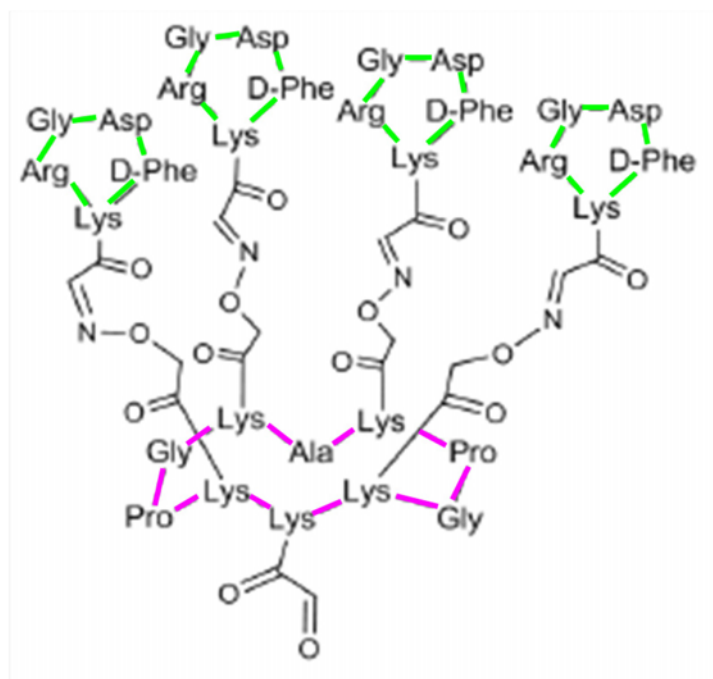


Figure 10 : Structure de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>

Le motif décapeptidique RAFT (surligné en rose) soutient 4 motifs c(RGD) (surlignés en vert)

Plusieurs avantages sont attribuables aux molécules transporteuses de RGD :

Les molécules thérapeutiques fixées dessus peuvent être internalisées avec une meilleure affinité. La filtration glomérulaire rénale est diminuée grâce à l'augmentation de la taille de la molécule transporteuse. Ceci permet une présence prolongée de la molécule dans la circulation sanguine avec une augmentation du temps de demi-vie plasmatique et, ainsi, une augmentation de la probabilité de fixation de la molécule sur son récepteur (Garanger, Boturyn et al. 2005; Temming, Schiffelers et al. 2005).

Notre groupe a décrit la synthèse d'un motif décapeptidique cyclique (RAFT) mesurant 10 Angströms qui présente deux domaines fonctionnels avec un arrangement spatial contrôlé : un domaine de plusieurs ligands pour la reconnaissance de l'intégrine et pour le ciblage cellulaire et un domaine de marquage pour la détection et la caractérisation de cette liaison. Les premières études ont montré que ces systèmes multivalents conservent les propriétés de reconnaissance, de sélectivité et d'internalisation dans les cellules exprimant l'intégrine  $\alpha\beta_3$  (Boturyn, Coll et al. 2004).

Par la suite, nous avons utilisé ce vecteur pour l'imagerie tumorale. Sur la face supérieure du RAFT, quatre copies du motif peptidique c[RGDfK] ont été greffées pour reconnaître l'intégrine  $\alpha\beta_3$ . La face inférieure peut être utilisée pour lier une ou deux molécules thérapeutiques et/ou pour l'imagerie moléculaire.

Notre groupe a montré l'intérêt de la multivalence du RGD comme outil théranostique pour améliorer le ciblage tumoral. En effet, lorsque nous administrons du Cy5-RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub> par voie intraveineuse chez des souris porteuses de tumeurs exprimant l'intégrine  $\alpha\beta_3$ , le ratio de la fluorescence tumeur/peau est de 15. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation de la durée de demi-vie plasmatique de la molécule entraînant son accumulation tumorale mais également à l'amélioration de l'internalisation grâce à la multivalence des RGD et donc une amélioration du ciblage tumoral (Garanger, Boturyn et al. 2005; Garanger, Boturyn et al. 2006; Jin, Josserand et al. 2007).

Nous avons montré par une technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Bleaching) que le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> inhibe la mobilité latérale de l'intégrine  $\alpha\beta_3$  dans la membrane cytoplasmique, probablement à cause de la formation de clusters d'intégrines. Ceci met en évidence que deux motifs cRGD fixés sur une même plateforme RAFT peuvent se lier à deux intégrines. La microscopie électronique a établi la relation entre la présentation multimérique, l'augmentation de l'affinité et la co-internalisation contrôlées par les intégrines. Des analyses FCS ont mis en évidence que le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-Cy5 tétramérique a une affinité dix fois supérieure pour son récepteur intégrine  $\alpha\beta_3$  soluble par rapport à un motif cRGD-Cy5 monomérique. En effet, la constante d'affinité (Kd) du RAFT-RGD pour les intégrines purifiées passe de 3,87nmol/L pour le RAFT-RGD à 41,70nmol/L pour le cyclo(-RGDfK). Le RAFT-c(RAD)<sub>4</sub>-Cy5, non spécifique, n'a pas interagi avec l'intégrine  $\alpha\beta_3$  (Sancey, Garanger et al. 2009).

Enfin, nous avons mis en évidence qu'une molécule de <sup>99m</sup>Tc-RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> permet une imagerie moléculaire de l'intégrine  $\alpha\beta_3$  *in vivo* dans un modèle de développement tumoral chez la souris. La molécule a été principalement éliminée par les reins ce qui est généralement le cas pour les molécules peptidiques (Briat, Wenk et al. 2012). Par ailleurs, il a été montré que des injections intratumorales répétées de RAFT-(cRGD)<sub>4</sub> chez la souris *Nude* réduisent la croissance tumorale. De plus le RAFT-(cRGD)<sub>4</sub> augmente significativement le ciblage spécifique des tumeurs sous-cutanées de même que des métastases après une injection intraveineuse (Garanger, Boturyn et al. 2005; Jin, Josserand et al. 2006).

Enfin, le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> ciblant les intégrines  $\alpha\beta_3$  surexprimées au niveau des néo-vaisseaux, son couplage avec un fluorophore permet d'imager l'angiogénèse après une administration par voie systémique. Ainsi, notre groupe a mis en évidence que le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-A700 permet d'évaluer les modifications angiogéniques *in vivo* avec une méthode non-invasive, rapide, précise et reproductible (Keramidas, Josserand et al. 2013).

L'intérêt du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> par rapport à d'autres molécules porteuses de RGD est que sa synthèse chimique est facile et bien caractérisée, ce qui permet d'obtenir une molécule avec une pharmacocinétique bonne et reproductible.

Ainsi, le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> a été construit sur deux postulats. D'une part le RAFT est une molécule rigide qui présente des motifs RGD de façon contrainte ce qui permet le clustering par dimérisation des intégrines et une internalisation active de la molécule dans la cellule cible. Grâce à sa structure, le RAFT est un espaceur naturel qui isole les motifs RGD en les fixant dans une conformation spatiale optimale pour la réactivité des RGD et permet un greffage multiple sans affecter dramatiquement les paramètres pharmacocinétiques ou la réactivité. D'autre part, la multivalence RGD sur le RAFT améliore la force du RGD et son affinité pour les intégrines purifiées ou les cellules, ce qui permet un meilleur ratio tumeur/bruit.

Le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> est un excellent outil théranostique car il présente une bonne pharmacocinétique et une forte capacité de ciblage des tumeurs primaires ou métastasées après administration systémique. Ainsi, le couplage du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> avec un fluorophore permet d'obtenir un outil puissant pour le diagnostic tumoral alors que son couplage avec un peptide pro-apoptotique puissant fait de lui un outil de choix pour la thérapie anti-cancéreuse.

## **2 Protéines pro-apoptotiques Bax : utilisation de la voie mitochondriale**

L'apoptose dépend de la reconnaissance de signaux intra ou extracellulaires multiples, de l'intégration de ces signaux et de l'activation d'une famille de protéases effectrices nommées « caspases ». Il existe deux voies conduisant à l'apoptose. Une voie extrinsèque qui implique un récepteur de mort cellulaire (Fas ou TNF *Tumor Necrosis Factor*) qui active les caspases et une voie intrinsèque qui conduit à la libération du cytochrome c de la mitochondrie. Cette voie est contrôlée par la famille des protéines Bcl-2 (Weissleder and Mahmood 2001).

### **2.1 Intérêt de cibler la mitochondrie**

Bien que les voies conduisant à l'apoptose soient souvent compromises lors de la transformation cellulaire maligne, les facteurs apoptogéniques mitochondriaux sont toujours présents dans les cellules cancéreuses. Ainsi, il est intéressant de développer des peptides capables d'induire leur relargage pour entraîner la mort cellulaire. Ces peptides auront la

capacité d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par action directe et donc d'outrepasser la résistance des cellules cancéreuses aux processus apoptotiques.

L'intégrité de la membrane mitochondriale est l'élément clef entre la survie cellulaire et la mort par apoptose. La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, qui est entraînée par des protéines de la famille pro-apoptotique B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) telles que Bax, est considérée comme un point de non retour dans l'initiation de la mort cellulaire apoptotique.

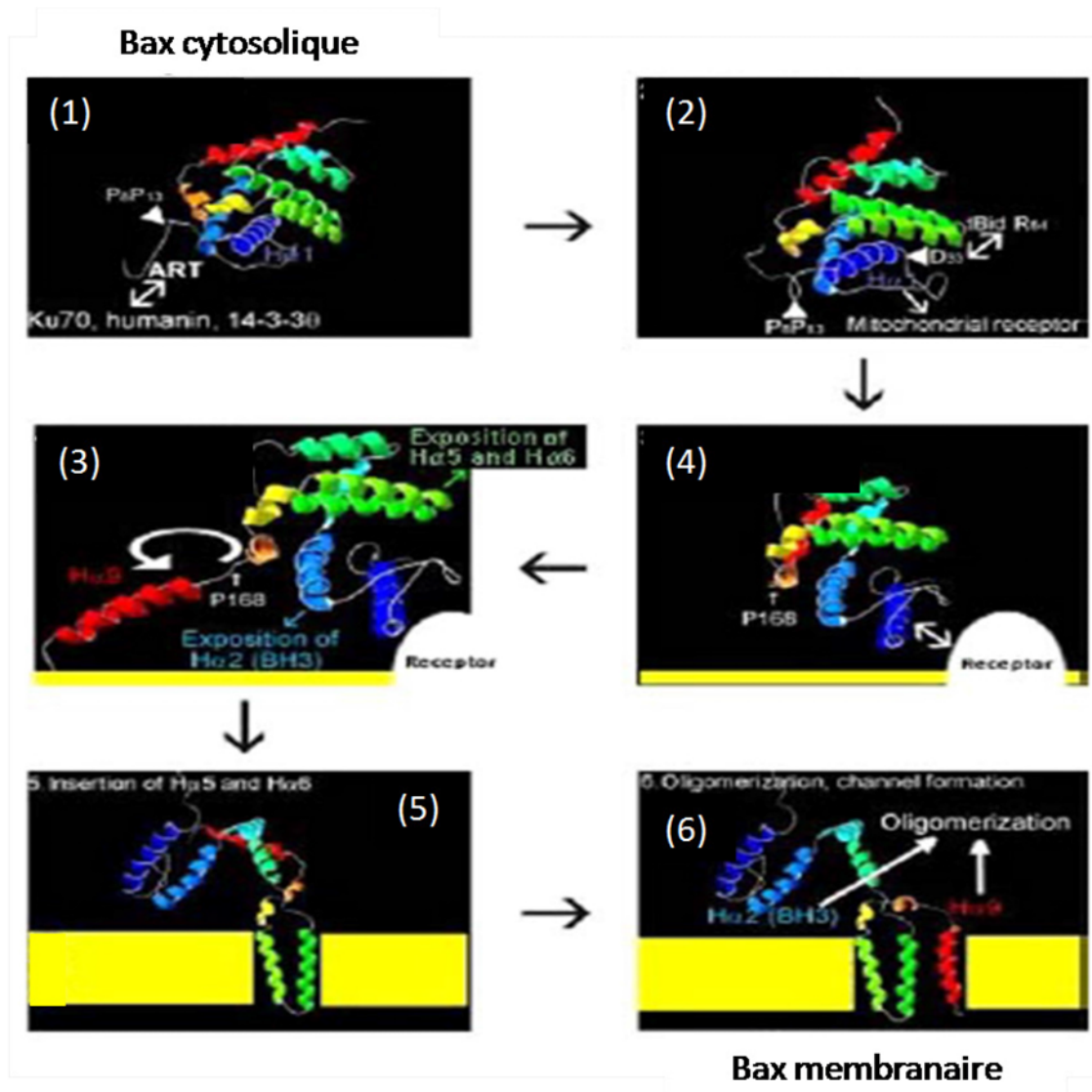
Ainsi, en contrôlant la perméabilité de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome c, les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs majeurs de la mort cellulaire induite par la voie mitochondriale (Guillemin, Lopez et al. 2010; Valero, Sancey et al. 2011).

## **2.2 Structure et mécanisme d'action des protéines de la famille Bax**

Les protéines de la famille Bcl-2 sont divisées en trois catégories d'après leur fonction et d'après leurs motifs structuraux : les protéines « multidomaines » anti-apoptotiques telles que Bcl-xL qui ont quatre domaines (BH1 à BH4), les protéines « multidomaines » pro-apoptotiques telles que Bax qui possèdent trois domaines (BH1 à BH3) et les protéines pro-apoptotiques « BH3-Only Proteins » (BOP) (Lalier, Cartron et al. 2007; Guillemin, Lopez et al. 2010; Xu, Zhai et al. 2013). La structure « multidomaines » est composée d'un groupe de 9 hélices  $\alpha$  amphiphiles reliées par des boucles. Deux hélices centrales en épingle à cheveux (H $\alpha$ 5 et H $\alpha$ 6) constituent le cœur de la protéine. Les hélices  $\alpha$ 5 et  $\alpha$ 6 sont entourées d'un côté par les hélices  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 et de l'autre côté par les hélices  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 4 et enfin au-dessus par les hélices  $\alpha$ 7 et  $\alpha$ 8. Les trois domaines présents dans la séquence Bax (BH1, 2 et 3) forment une poche hydrophobe qui est occupée par l'hélice  $\alpha$ 9 sous la forme native de Bax (Lalier, Cartron et al. 2007).

Les hélices H $\alpha$ 5 et H $\alpha$ 6 sont des domaines transmembranaires nécessaires à l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale. Ces hélices sont similaires aux sous-unités de la Colicine A et de la toxine diphtérique qui forment des pores. De même, comme ces toxines qui agissent en formant des pores, les protéines de la famille Bcl-2 ont une double nature structurale avec une conformation soluble en milieu aqueux et une conformation insoluble intégrée dans la membrane (Guillemin, Lopez et al. 2010).

L'induction de l'apoptose par Bax est associée à une modification de la localisation cellulaire et au changement conformationnel d'une forme soluble cytosolique à une forme membranaire. En effet, Bax existe sous deux conformations stables : Bax native monomérique présente dans le cytosol (CLIC : Cytosolic Locked In Conformation) et Bax activée oligomérique membranaire permettant la perméabilisation de la membrane mitochondriale (CLAC : Cytochrome c Liberation Associated Conformation) (Lalier, Cartron et al. 2007) (Figure 11).



**Figure 11 : Représentation schématique de la transition CLIC/CLAC de Bax**

(1) Bax, sous sa forme CLIC est protégée par les séquences N- et C-ART. (2) tBid rompt la liaison intramoléculaire entraînant l'exposition de la séquence d'adressage à la mitochondrie. (3) Bax interagit avec un récepteur protéique présent sur la membrane mitochondriale externe (MME). (4) Une rotation de l'hélice  $\alpha 9$  autour du résidu P168 libère de la poche hydrophobe. Cette torsion induit l'exposition des hélices  $\alpha 5$ -  $\alpha 6$  et du domaine BH-3. (5) Les hélices hydrophobes  $\alpha 5$ -  $\alpha 6$  s'insèrent dans la MME. L'interaction avec le récepteur mitochondrial est rompue. (6) L'homo-oligomérisation CLAC de Bax est simultanée à la formation du canal. L'hélice  $\alpha 9$  s'insère dans la MME et participe à l'oligomérisation de Bax et à la formation du canal. D'après (Lalier, Cartron et al. 2007)



Des études *in vitro* ont mis en évidence que la perméabilisation membranaire se déroule par étapes. Bax sous sa forme native inactive est cytoplasmique. La transition de Bax vers sa forme pro-apoptotique active passe par une liaison membranaire réversible, distincte de l'intégration membranaire. L'intégration de Bax dans la membrane mitochondriale est l'étape limitante du processus durant laquelle Bax subit d'importantes modifications conformationnelles (Xu, Zhai et al. 2013).

La perte de la forme globulaire de la protéine Bax entraîne une exposition des hélices H $\alpha$ 5-H $\alpha$ 6. Ces hélices en épingle à cheveux sont un élément clef de la formation de monomères qui s'oligomérisent. En effet, les hélices centrales de Bax ont une grande capacité pour interagir avec la membrane mitochondriale à pH physiologique, pour s'insérer profondément dans la membrane et pour s'homo-oligomériser, créant des pores de 25 à 100nm de diamètre qui permettent la libération du cytochrome c et, par suite, la mort cellulaire (Guillemin, Lopez et al. 2010).

Notre groupe a étudié l'implication de Bax dans l'apoptose cellulaire passant par la voie mitochondriale. Nous avons mis en évidence que l'expression de p53 entraîne l'augmentation de l'expression de Bax ainsi que sa translocation à la mitochondrie grâce à la caféine. Ces événements entraînent des changements conformationnels de la protéine Bax conduisant à l'apoptose cellulaire (Dubrez, Coll et al. 2001).

Nous avons également étudié l'implication de Bax dans les mécanismes de résistance cellulaire à l'apoptose. Ainsi, nous avons montré que dans un modèle de CBNPC, l'Amphiréguline et l'Insulin Growth Factor-1 coopèrent pour empêcher l'apoptose et promouvoir la survie cellulaire en utilisant une voie dépendante de PKC-p90<sup>rsk</sup> qui conduit à l'inactivation de Bad et Bax. En effet, ces deux facteurs de croissance entraînent la phosphorylation et donc l'inactivation de Bad, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2. Une fois phosphorylé, Bad est complexé avec une protéine cytosolique, ce qui empêche son interaction avec la protéine anti-apoptotique BclX<sub>L</sub>, favorisant ainsi la survie cellulaire (Hurbin, Coll et al. 2005). De plus, nous avons mis en évidence que lors d'un traitement par Gefitinib, un inhibiteur de tyrosine kinase utilisé dans le traitement du CBNPC, l'Amphiréguline diminue l'expression de Bax en stimulant la dégradation lysosomale et inhibe ses changements conformationnels et sa translocation mitochondriale, empêchant ainsi l'apoptose. Notre étude a mis en évidence que les cellules du CBNPC sont moins sensibles au

traitement par Gefitinib en présence d'Amphiréguline alors qu'en l'absence de cette dernière le Gefitinib induit l'apoptose en augmentant l'expression et l'activation de Bax (Busser, Coll et al. 2009; Busser, Sancey et al. 2010; Hurbin, Wislez et al. 2011).

### 2.3 Poro-peptides

Des peptides issus des deux fragments des hélices  $\alpha$  en épingle de Bax ( $\alpha 5$ -  $\alpha 6$ ) sont porteurs par eux-mêmes d'une information structurale minimale permettant l'insertion dans une membrane lipidique et la formation de pores, mimant en partie l'action de la protéine Bax complète (Guillemin, Lopez et al. 2010).

Notre groupe a mis en évidence que des segments actifs de Bax peuvent directement induire la libération de facteurs apoptogéniques mitochondriaux et entraîner les cellules tumorales vers la voie apoptotique mitochondriale dépendante des caspases. Un peptide basé sur la séquence de l'hélice  $\alpha 5$  de la séquence de Bax, permettant la formation de pores, cible les mitochondries et induit le relargage du cytochrome-c et conduit à l'apoptose. Ce « poro-peptide » entraîne la régression tumorale après injection péritumorale dans un modèle *in vivo* de souris *Nude* xéno greffées (Valero, Sancey et al. 2011).

Cependant, afin d'être utilisables en thérapie anticancéreuse, il est important que les poropeptides éliminent les cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines. Il est donc primordial de les associer à un système de ciblage spécifique des cellules tumorales comme par exemple la plateforme peptidique bien décrite RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>.

Afin d'utiliser le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> comme outil de thérapie ciblée, notre groupe a synthétisé une molécule de RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> couplée à une séquence peptidique pro-apoptotique (KLAKLAK)<sub>2</sub> par l'intermédiaire d'un pont disulfure.

(KLAKLAK)<sub>2</sub> est un antibiotique naturel avec une structure amphipathique. Une fois dans le cytoplasme cellulaire, il va entraîner la rupture de la membrane mitochondriale, chargée négativement, ce qui va induire la mort cellulaire. De plus, sa spécificité d'action sur les membranes chargées négativement et non pas sur les membranes zwitterioniques telles que les membranes plasmiques fait qu'il altèrera uniquement les cellules dans lesquelles il est internalisé.

Grâce à l'utilisation d'une technique de FRET, en marquant le RAFT-(cRGD)<sub>4</sub> avec un fluorophore et en marquant la séquence proapoptotique avec un autre fluorophore, nous avons mis en évidence un relargage rapide du peptide en milieu acide, après internalisation cellulaire dans des vésicules d'endocytose, grâce à la rupture du pont disulfure.

Nous avons montré que la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-(KLAKLAK)<sub>2</sub> permet de transporter et d'internaliser la séquence (KLAKLAK)<sub>2</sub> entraînant la dépolarisation de la membrane mitochondriale *in vitro* dans différentes lignées de cellules tumorales. De plus, son administration intrapéritonéale répétée dans un modèle *in vivo* de tumeur sous-cutanée a confirmé la capacité de ciblage tumoral de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-(KLAKLAK)<sub>2</sub> ainsi que la diminution de la croissance tumorale (Sancey, Dufort et al. 2009; Dufort, Sancey et al. 2011).

## **Chapitre 4 : les modèles tumoraux**

Le développement de nouveaux outils théranostiques pour la prise en charge du cancer implique de pouvoir les tester sur des modèles tumoraux. Ceux-ci peuvent servir à l'évaluation du ciblage des cellules cancéreuses par la molécule étudiée ou à l'évaluation des mécanismes apoptotiques mis en jeu par la cellule traitée ou encore à caractériser les cellules tumorales. Or, il existe de nombreux modèles tumoraux différents par leur implantation à savoir *in vitro* ou *in vivo*, orthotopique ou ectopique sous-cutanée mais également par la lignée de cellules cancéreuses utilisée. Chaque type de modèle présente des avantages et des limites. Ainsi, il est primordial de choisir le modèle le plus adapté.

Les modèles tumoraux les plus simples d'utilisation et de mise en œuvre sont les *modèles in vitro*. Bien que très éloignés de la réalité clinique, ils permettent, outre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'étudier les mécanismes cellulaires mis en jeu, d'évaluer la dose efficace d'une molécule thérapeutique afin d'avoir une idée de la quantité de molécules à tester dans les modèles *in vivo*. Ainsi, les tests *in vitro* représentent une étape primordiale dans l'évaluation de l'efficacité d'une molécule thérapeutique. Une fois les résultats *in vitro* obtenus, les tests *in vivo* chez le petit animal peuvent être entrepris.

Il existe plusieurs types de modèles *in vivo* de tumeurs chez le petit animal en fonction de la localisation de la tumeur, son apparition spontanée ou non et, le cas échéant, selon la voie d'implantation des cellules tumorales. Nous nous intéresserons ici aux modèles de tumeurs non spontanées avec des greffes de cellules tumorales humaines ou murines chez la souris.

L'avènement des techniques de xénogreffe de tumeurs humaines chez le petit animal a permis de grandes avancées dans l'évaluation des traitements pour la prise en charge du cancer. Bien que présentant des limites telles que l'absence de réponse du système immunitaire et la présence d'un stroma murin et non humain, ils permettent d'étudier la biodistribution, le comportement et l'effet d'un agent thérapeutique chez un mammifère (Kahn, Tofilon et al. 2012; Ruggeri and Camp 2013).

Par ailleurs, l'utilisation de lignées tumorales caractérisées ne prend pas en compte l'hétérogénéité habituellement rencontrée avec des cellules provenant de biopsies tumorales et l'étude des mécanismes moléculaires apparaissant lors des traitements anti-tumoraux est

biaisée. Cependant, l'utilisation de lignées connues permet de connaître les caractéristiques des cellules tumorales, de tester des molécules visant des cibles tumorales spécifiques et d'avoir un modèle reproductible au fur et à mesure des expérimentations (Perez-Soler, Kemp et al. 2000).

Il n'existe aucun modèle de cancer chez l'animal qui soit parfait pour représenter la complexité et la diversité des cancers humains. Cependant, les modèles de cancer humain chez le petit animal nous permettent d'évaluer des processus biologiques de pharmacocinétique, de pharmacodynamique et des informations pharmacologiques afin de :

- (i) Comprendre la physiopathologie des cancers avec l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques
- (ii) Evaluer des agents thérapeutiques
- (iii) Etudier des mécanismes intrinsèques et la résistance acquise par les tumeurs traitées par des agents cytotoxiques.

Deux types de modèles *in vivo* peuvent être distingués : le modèle ectopique sous-cutané et le modèle orthotopique. Chacun de ces modèles possède des avantages et des limites. Ainsi selon le stade de l'évaluation pré-clinique de la molécule mais également selon la question scientifique à laquelle nous voulons répondre, un modèle sera privilégié par rapport à l'autre (Ruggeri and Camp 2013)

## 1 Les modèles de xénogreffes sous-cutanées

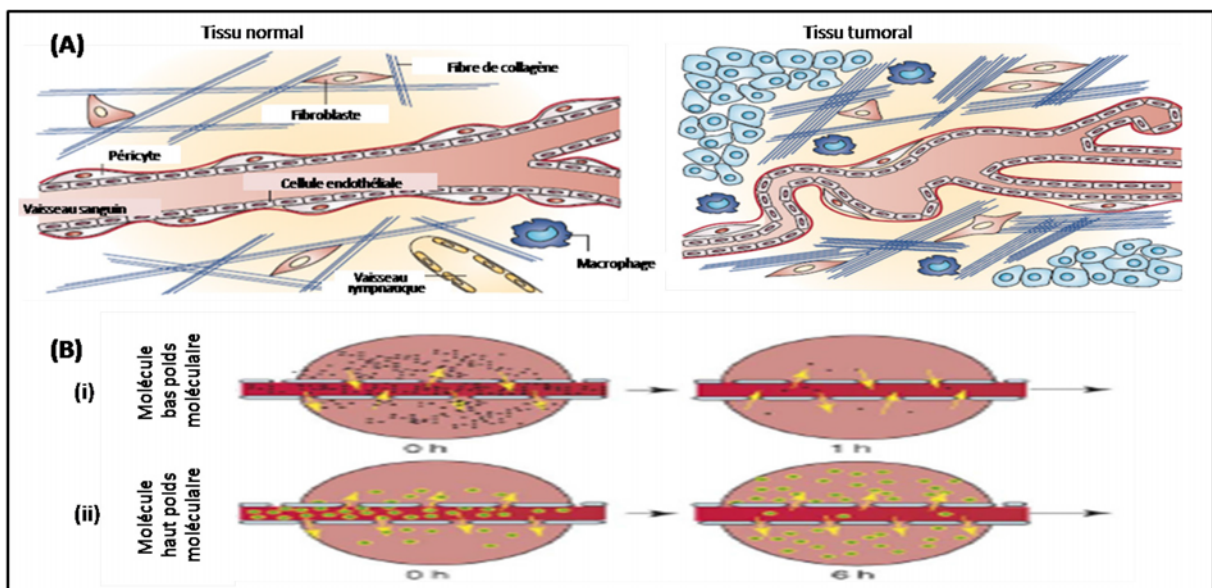
Le modèle de xénogreffe sous-cutanée est le modèle de cancer *in vivo* le plus simple à mettre en œuvre. Il s'agit d'injecter en sous-cutanée des cellules tumorales et d'observer leur croissance.

Des paramètres pharmacologiques et toxicologiques des traitements anti-tumoraux ont été étudiés sur des modèles de tumeurs sous-cutanées chez la souris *Nude*. Ces paramètres sont le délai de croissance tumorale, la perte de poids de l'animal et la mortalité.

Le modèle de xénogreffe *in vivo* sous-cutanée est un modèle intéressant pour l'évaluation de l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). L'effet EPR est un ciblage passif des tumeurs solides *in vivo* par des macromolécules. Il a été décrit par Matsumura *et al.* en 1986 qui ont mis en évidence que des macromolécules sans agent de ciblage s'accumulent et sont retenues plus longtemps au sein des tumeurs que des molécules plus petites. Ceci peut

s'expliquer par les caractéristiques de la vascularisation tumorale et par le faible nombre de vaisseaux lymphatiques à ce niveau (Matsumura and Maeda 1986).

En effet les vaisseaux sanguins tumoraux sont différents des vaisseaux sanguins des tissus sains. Au sein des tumeurs, les vaisseaux sont larges, tortueux, désorganisés avec de larges fenestrations permettant le passage de macromolécules alors que les vaisseaux lymphatiques sont quasi absents. Ceci, associé au faible retour veineux, entraîne une rétention des macromolécules au sein de la tumeur pendant que l'extravasation de nouvelles molécules continue dans la tumeur entraînant leur accumulation (Iyer, Khaled et al. 2006) (Figure 12).



**Figure 12 : Schéma explicatif de l'effet EPR**

(A) Différences structurales entre les tissus normaux et tumoraux affectant la pression interstitielle des fluides.

Le tissu normal contient des vaisseaux sanguins linéaires constitués d'une couche de cellules endothéliales et de péricytes maintenant leur intégrité. La matrice extracellulaire est composée d'un réseau lâche de collagène et de fibres et contient peu de fibroblastes et de macrophages. Des vaisseaux lymphatiques sont également présents dans le tissu sain. Dans le tissu tumoral, les vaisseaux sanguins sont anormaux (perméables, irréguliers, recouverts de peu de péricytes) ; le flux sanguin est inefficace. La majorité des tumeurs ne présente pas de vaisseaux lymphatiques. La matrice extracellulaire est constituée d'un réseau dense et épais de fibres de collagène. Ainsi, le tissu tumoral est plus rigide que le tissu conjonctif normal qui est lâche. De plus, les tumeurs contiennent plus de fibroblastes qui lient les fibres de collagène de manière intégrine-dépendante et exercent ainsi une augmentation des tensions entre les fibres. Le nombre de macrophages et de cellules inflammatoires est également augmenté ; ces cellules produisent des cytokines et des facteurs de croissance qui agissent sur les cellules endothéliales et les fibroblastes et augmentent alors la pression interstitielle des fluides.

(B) Représentation de la diffusion de molécules de bas poids moléculaire (points noirs) à partir des vaisseaux sanguins vers une tumeur (cercles roses) (i) en comparaison avec la diffusion de molécules de haut poids moléculaire (points verts et jaunes) (ii). Les molécules de bas poids moléculaire diffusent librement à partir et vers la tumeur grâce à leur petite taille. Ainsi, leur concentration diminue au cours du temps. En revanche les molécules de haut poids moléculaire vont vers la tumeur mais leur taille les empêche de retourner dans la circulation sanguine entraînant une accumulation dans la tumeur. L'effet EPR augmente avec le temps. Adaptée de (Heldin, Rubin et al. 2004; Iyer, Khaled et al. 2006)

L'effet EPR est un élément important dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques même ceux conjugués avec des anticorps monoclonaux, tel le Cetuximab, visant une cible tumorale particulière. En effet, l'intérêt majeur de l'effet EPR est le ciblage tumoral passif, peu coûteux et quasiment universel puisqu'il s'applique à un grand nombre de tumeurs solides (Maeda 2012).

Notre équipe a étudié l'effet EPR de plusieurs tumeurs solides implantées en sous-cutanée en utilisant des nanoparticules. Il s'avère que selon la rapidité de croissance tumorale, les vaisseaux des tumeurs sont plus ou moins désorganisés. Ainsi, certaines tumeurs vont être « faiblement EPR » comme l'hépatocarcinome humain HUH7 alors que d'autres vont être caractérisées de « fortement EPR » comme le glioblastome humain U87MG (Hirsjarvi, Dufort et al. 2013).

## **2 Les modèles de xénogreffes orthotopiques**

Un modèle orthotopique est un modèle dans lequel les cellules tumorales sont implantées dans leur organe ou tissu d'origine, remettant en situation les cellules tumorales avec le microenvironnement local dans lequel une tumeur primaire évolue et à partir duquel elle métastase. En effet, les composants cellulaires non malins résidant dans le microenvironnement tumoral incluent des facteurs inflammatoires, des macrophages, des fibroblastes et des cellules endothéliales de même que des cytokines et des protéines d'adhésion à la matrice extracellulaire qui influent sur la prolifération tumorale, l'angiogénèse, la diffusion et les métastases mais qui sont aussi capables d'altérer la sensibilité à des agents thérapeutiques (Ruggeri and Camp 2013).

Afin de prendre en compte l'influence du microenvironnement, des modèles orthotopiques ont été développés comme par exemple des tumeurs du pancréas, de la prostate, du sein, des poumons et du cerveau (Kahn, Tofilon et al. 2012). Nous nous concentrerons ici sur les tumeurs orthotopiques pulmonaires et cérébrales.

### **2.1 La vascularisation**

#### *2.1.1 La vascularisation pulmonaire*

La vascularisation pulmonaire est très riche et double. Elle est composée d'une vascularisation nourricière qui permet de vasculariser les cellules pulmonaires et bronchiques

et d'une vascularisation fonctionnelle qui permet d'oxygéner le sang. La vascularisation nourricière est très importante pour le développement des tumeurs pulmonaires puisqu'elle va alimenter les cellules tumorales. La vascularisation fonctionnelle, quant à elle, a un intérêt particulier pour l'apport des molécules thérapeutiques au niveau des poumons après une administration par voie intraveineuse, voie utilisée couramment en clinique.

L'unité anatomique et physiologique de base du poumon est représentée par le lobule pulmonaire. Les lobules pulmonaires ont des formes et des dimensions variables et sont en nombre indéterminé. Chaque lobule est appendu à une bronche terminale qui se ramifie en un nombre variable de bronchioles terminales. Chaque bronchiole terminale se poursuit en formant un canal alvéolaire à l'extrémité duquel s'ouvrent plusieurs alvéoles.

La bronche lobulaire est alimentée par l'artère lobulaire, branche de l'artère pulmonaire ; l'artère lobulaire va se ramifier en formant un réseau capillaire artériel qui se continue par un réseau capillaire veineux très dense au niveau des alvéoles pulmonaires.

Par ailleurs, le réseau lymphatique pulmonaire est très développé. Il permet un drainage important des poumons. La circulation lymphatique pulmonaire comprend deux réseaux *quasi* indépendants: le superficiel est destiné à la plèvre et le profond au parenchyme pulmonaire. Chaque réseau renferme des capillaires lymphatiques très perméables et des vaisseaux collecteurs plus larges et relativement imperméables (Bouchet Alain 1971).

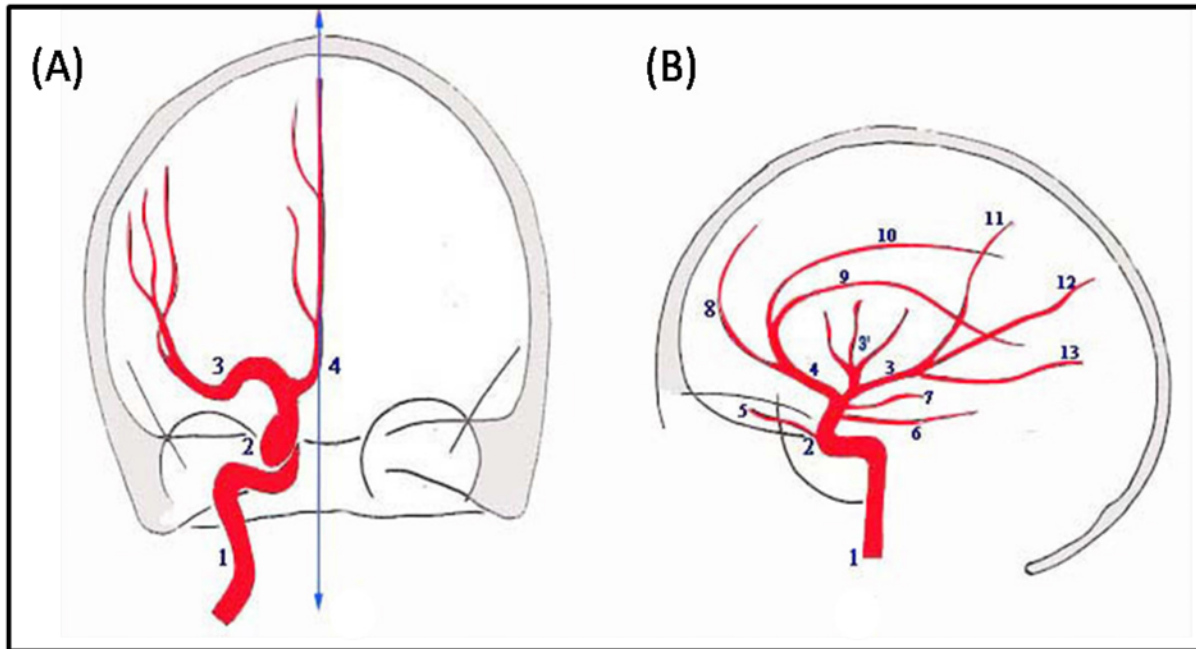
La richesse et l'abondance de la vascularisation pulmonaire, l'immense surface d'échanges artério-veineux, la basse pression avec laquelle le sang circule dans l'artère pulmonaire ainsi que la double vascularisation pulmonaire, fonctionnelle et nourricière, sont non seulement à l'origine de l'important développement des tumeurs pulmonaires mais également la cause d'un lieu privilégié pour le développement de métastases (Manzotti, Audisio et al. 1993; Doki, Murakami et al. 1999).

### 2.1.2 *La vascularisation cérébrale*

Le cerveau est vascularisé par quatre artères, deux carotides internes (gauche et droite) et deux artères vertébrales (gauche et droite) qui s'unissent sous forme d'un cercle, le polygone de Willis, à partir duquel s'épanouissent les troncs artériels destinés à l'irrigation des



différentes zones du cerveau. A partir du polygone de Willis, les artères sont terminales et peu nombreuses (Figure 13).



**Figure 13 : Schéma de la vascularisation artérielle cérébrale**

(A) coupe frontale, (B) : coupe longitudinale

1 : carotide interne ; 2 : siphon carotidien ; 3 : artère cérébrale moyenne ; 4 : artère cérébrale antérieure

Par ailleurs, le cerveau est protégé par la barrière hémato-encéphalique. Cette barrière est constituée par des vaisseaux dont les cellules endothéliales sont liées par des jonctions serrées et qui sont entourés d'astrocytes. Cette barrière ainsi que le réseau artériel pauvre rendent le cerveau, et donc les tumeurs cérébrales, quasiment inaccessible aux molécules thérapeutiques. Il faudra donc une grande quantité de chimiothérapie avec des effets indésirables majeurs pour qu'une quantité suffisante d'agent thérapeutique administré par voie intraveineuse atteigne une tumeur cérébrale.

Le réseau veineux n'est pas superposable à la vascularisation artérielle. Il comprend un réseau de veines superficielles et profondes qui se drainent dans les sinus veineux de la dure-mère.

Enfin, il est important de noter que le cerveau est le seul organe à être privé de circulation lymphatique (Bouchet Alain 1971).

L'anatomie de la vascularisation cérébrale met en évidence la difficulté de traiter les tumeurs cérébrales mais également la fragilité de cet organe vital.

## 2.2 Les voies d'implantation des tumeurs orthotopiques

### 2.2.1 *Tumeur pulmonaire*

Actuellement il existe peu de modèles orthotopiques de cancers des poumons. Leur délicatesse de mise en place associée à la difficulté de suivre leur évolution fait que la plupart des thérapies pour le cancer des poumons sont testées sur des modèles ectopiques sous-cutanés.

Il existe différentes méthodes d'implantation des cellules tumorales au niveau pulmonaire. Ces méthodes sont plus ou moins invasives et, selon la voie d'injection, miment un stade plus ou moins avancé du cancer pulmonaire. Ainsi, l'injection des cellules tumorales pulmonaires dans le médiastin de souris *Nude* mime un cancer pulmonaire à un stade avancé avec envahissement médiastinal.

L'injection directe des cellules tumorales par voie intercostale dans le parenchyme pulmonaire, conduit au développement d'un nodule associé à des métastases dans les ganglions lymphatiques (Doki, Murakami et al. 1999; Li, Torossian et al. 2011).

Onn *et al*, quant à eux, ont administré des cellules de CBNPC dans un poumon de souris *Nude* par injection percutanée alors que Acuff et al, ont choisi d'administrer des cellules tumorales directement dans la trachée des souris afin de tapisser les poumons de cellules tumorales avec une méthode peu invasive (Onn, Isobe et al. 2003; Acuff, Sinnamon et al. 2006).

Par ailleurs, des modèles *in vivo* orthotopiques de métastases pulmonaires de différentes lignées tumorales sont utilisés depuis de nombreuses années. Pour cela les cellules tumorales sont administrées par voie intraveineuse. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, le poumon est un organe très richement vascularisé qui draine tout le sang veineux de l'organisme grâce à un réseau de capillaires très fins. Ainsi, l'administration de cellules cancéreuses par voie intraveineuse entraîne la rétention de ces cellules au niveau pulmonaire et, par suite, le développement tumoral à ce niveau.

### 2.2.2 *Tumeur cérébrale*

L'implantation de cellules tumorales dans le cerveau du petit animal est une méthode chirurgicale invasive.

Chez le petit animal le striatum est une zone cérébrale centrale dans chaque hémisphère. Cette zone est large et le tissu est homogène ; c'est la zone privilégiée pour implanter les cellules tumorales.

L'implantation de tumeurs cérébrales se fait en stéréotaxie en implantant les cellules dans une zone donnée en se basant sur des coordonnées crânielles connues. Cette méthode est bien paramétrée et de plus en plus utilisée. Cependant elle est relativement longue à mettre en œuvre, demande un matériel spécifique et peut entraîner le décès de l'animal par hémorragie cérébrale.

### **3 Comparaison des modèles de xénogreffes tumorales**

Il existe de nombreux modèles tumoraux, chacun présentant des avantages et des limites. Nous étudions ici les modèles *in vitro* ainsi que les modèles de xénogreffes *in vivo* ectopiques sous-cutanés ou orthotopiques.

Modèle tumoral	Avantages	Limites
<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilité de mise en œuvre</li> <li>• Peu de ressources nécessaires</li> <li>• Identification de nouvelles cibles thérapeutiques</li> <li>• Etude des voies de signalisation impliquées dans la réponse tumorale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le microenvironnement tumoral n'est pas pris en compte</li> <li>• Très éloigné de la réalité clinique</li> </ul>
<b>Xénogreffe</b> <i>In vivo</i> ectopique (sous-cutanée)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilité de mise en œuvre</li> <li>• Présence d'un micro-environnement tumoral</li> <li>• Facilité de mesure du volume tumoral et donc de l'évaluation de l'efficacité d'une molécule</li> <li>• Injection localisée de molécules thérapeutiques sans affecter les organes vitaux</li> <li>• Pratiquement toutes les lignées tumorales peuvent être testées</li> <li>• Bonne reproductibilité</li> <li>• Etude des voies de signalisation impliquées dans la réponse tumorale</li> <li>• Faible coût</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le phénotype tumoral est différent par rapport à une tumeur <i>in situ</i></li> <li>• Pertinence physiopathologique limitée</li> <li>• Faible prédictibilité du modèle</li> <li>• Absence du stroma naturel de la tumeur</li> <li>• Peu ou pas d'interaction avec les cellules immunitaires</li> </ul>
<b>Xénogreffe</b> <i>In vivo</i> orthotopique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microenvironnement tumoral proche de celui naturellement présent</li> <li>• Réponse immunologique et pathologique</li> <li>• Mesure de l'importance de l'interaction tumeur-stroma</li> <li>• Mesure de l'impact sur l'angiogénèse, la diffusion, les métastases et la surveillance immunitaire de la tumeur</li> <li>• Mesure de l'impact de l'administration répétée sur la survie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implantation tumorale plus délicate</li> <li>• Morbidité associée à l'implantation tumorale</li> <li>• Nécessité de méthodes d'imagerie pour évaluer l'impact sur la croissance tumorale</li> <li>• Critères stricts à déterminer pour évaluer l'efficacité clinique de la molécule testée</li> <li>• Difficulté d'accès à la tumeur par les molécules thérapeutiques</li> <li>• peu reproductible</li> <li>• Durée de prise tumorale longue</li> <li>• Coûteux à mettre en place et à suivre</li> </ul>

Figure 14 : Tableau comparatif des modèles tumoraux

Adaptée de (Talmadge, Singh et al. 2007; Kahn, Tofilon et al. 2012; Ruggeri and Camp 2013)

## **Chapitre 5 : les méthodes d'imagerie**

Le développement des outils d'imagerie, que ce soit pour l'imagerie *in vitro* ou pour l'imagerie médicale adaptée au petit animal pour la recherche préclinique, a permis de grandes avancées en recherche. En effet, chaque système d'imagerie présente des avantages et des limites. L'utilisation de différents systèmes permet d'évaluer au mieux un traitement anti-cancéreux que ce soit au niveau des mécanismes moléculaires mis en jeu ou au niveau de la biodistribution d'un agent thérapeutique *in vivo*. Ainsi, selon l'étude réalisée, différents systèmes d'imagerie pourront être utilisés.

Deux approches sont utilisées pour développer des systèmes d'imagerie *in vivo* du petit animal. La première est la « miniaturisation » des outils déjà utilisés en clinique humaine. C'est le cas des techniques de PET (Positron Emission Tomography), de SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), d'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), des ultrasons et du scanner à rayons X. Ces méthodes sont plus sensibles et plus résolutive quand elles sont adaptées au petit animal. La deuxième approche consiste en des méthodes d'imagerie photonique telles que la fluorescence, la bioluminescence, l'imagerie multiphotonique et l'imagerie confocale (Ntziachristos, Ripoll et al. 2005; Pysz, Gambhir et al. 2010).

Nous étudierons tout particulièrement l'imagerie par résonance magnétique ainsi que l'imagerie optique de fluorescence et de bioluminescence.

### **1 L'imagerie par résonance magnétique**

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique non invasive hautement résolutive permettant d'obtenir des images anatomiques des tissus mous *in vivo*. L'IRM possède une bonne résolution spatiale mais une faible sensibilité.

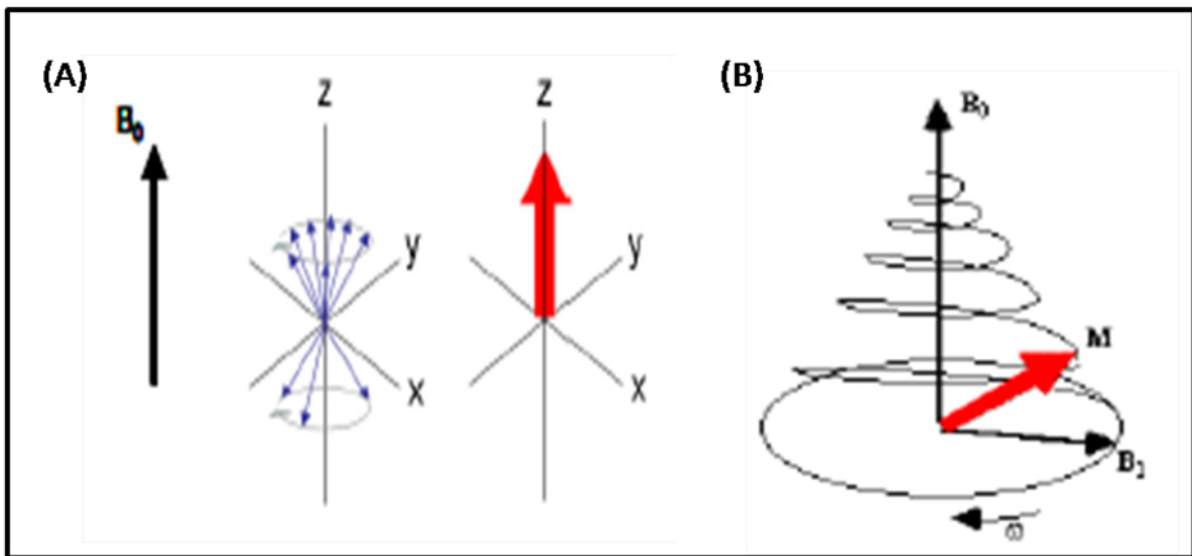
L'IRM est basée sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), une technique spectroscopique utilisée par les scientifiques pour obtenir des informations physiques et chimiques microscopiques des molécules.

Félix Bloch et Edward Purcell ont chacun mis en évidence le phénomène de résonance magnétique en 1946, découverte pour laquelle ils ont été récompensés par le prix Nobel en 1952. Il a fallu attendre 1971 pour que Raymond Damadian mette en évidence une différence de temps de relaxation magnétique nucléaire entre les tissus sains et les tissus pathologiques.

## 1.1 Principe

Les noyaux de certains atomes, tels que l'hydrogène, possèdent un moment dipolaire magnétique résultant de leur charge électrique et de leur spin.

Lors de l'imagerie par résonance magnétique, l'objet étudié est placé dans un champ magnétique continu  $B_0$ . Le spin de chaque atome d'hydrogène est modifié en fonction de ce champ. Lors de l'acquisition, une pulsation magnétique ponctuelle  $B_1$  perpendiculaire à  $B_0$  est appliquée perturbant le spin des électrons. Le retour à l'état d'équilibre des électrons se fait par un phénomène de relaxation (Figure 15).



**Figure 15 : Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire**

A l'état d'équilibre, le moment magnétique (flèche rouge) est aligné suivant l'axe z qui est l'axe du champ magnétique  $B_0$  (A). Pour acquérir une image IRM, l'état d'équilibre est perturbé avec une impulsion magnétique  $B_1$  perpendiculaire à  $B_0$  (B). Suite à cette perturbation nous observons le retour des spins à l'état d'équilibre selon l'axe z (T1: temps de relaxation longitudinale) ou selon les axes x, y (T2: temps de relaxation transversale)

Chaque proton réagit différemment selon l'environnement et donc selon le tissu dans lequel il se trouve. En IRM les spins les plus affectés par les champs magnétiques sont ceux des atomes d'hydrogène présents dans l'eau. Or l'eau représente 70 à 90% de la plupart des tissus. Ainsi, l'analyse des signaux provenant des atomes d'hydrogène permet la détermination d'une structure anatomique des tissus mous de l'objet étudié. Le processus de relaxation correspondant au retour à l'état basal des spins peut être décrit par deux constantes fondamentales : T1 (relaxation longitudinale) et T2 (relaxation transversale) (Cassidy and Radda 2005).

## 1.2 L'utilisation d'un marquage magnétique

L'imagerie par résonance magnétique est utilisée pour la visualisation des tissus mous. L'utilisation d'agents de contraste permet de réaliser de l'imagerie moléculaire. Ces agents de contraste influencent les temps de relaxation T1 et T2.

Ces agents peuvent être des nanoparticules superparamagnétiques, des nanoparticules d'oxyde de Gadolinium ou des chélates de Gadolinium.

Les agents de contraste pour le T1 sont basés sur des ions paramagnétiques qui ont un faible temps de demi-vie. Le Gadolinium est le meilleur agent de contraste visible en T1 utilisé en clinique. L'agent de contraste est capté par les cellules par endocytose et permet d'avoir la meilleure sensibilité de détection possible. Tseng et al. ont développé des nanoparticules d'hexanedione de gadolinium ayant des propriétés hydrophobes afin de faciliter leur contact avec les membranes cellulaires et ainsi faciliter leur internalisation (Tseng et al., 2010). Les agents de contraste visibles en T1 augmentent le taux d'énergie échangé entre les spins. Ils produisent une augmentation du signal visible sur les images d'IRM. Ils permettent une détection de l'ordre du micromolaire.

Les agents de contraste T2 utilisent principalement des ions ferromagnétiques. Ce sont généralement des nanoparticules composées d'un cœur d'oxyde de fer. Ces nanoparticules connues sous le terme général USPIO (*Ultra Small super Paramagnetic Iron Oxide*) ont une taille inférieure à 50nm. Elles augmentent le taux d'énergie perdu par les spins en introduisant une perturbation du champ magnétique ce qui se traduit par une perte de T2 et par une diminution de l'intensité du signal. Les agents de contraste T2 entraînent donc un signal négatif sur l'image d'IRM (Cassidy and Radda 2005; Kircher and Willmann 2012).

De même, l'utilisation du fer comme agent de marquage perturbe le champ magnétique et un signal hypointense est visible en T2\*. Les nanoparticules permettent un marquage cellulaire par simple endocytose sans avoir recours à la transfection (Loebinger, Kyrtatos et al. 2009).

Par conséquent, un des principaux challenges de l'imagerie cellulaire est de développer des techniques optimisées de marquage cellulaire qui permettent d'obtenir un compromis entre la concentration minimale nécessaire pour la sensibilité de détection cellulaire et la concentration maximale qui ne perturbe pas la fonction cellulaire (Boddington, Henning et al. 2010).

### **1.3 Avantages et limites de l'IRM**

L'imagerie par résonance magnétique est une méthode d'imagerie non ionisante. Ainsi, un suivi longitudinal de la croissance tumorale peut être réalisé en sécurité.

L'IRM offre un excellent contraste au niveau des tissus mous mais ne permet pas la visualisation des tissus durs tels que l'os. La sensibilité de la méthode est faible (de l'ordre du mM) mais sa résolution spatiale est très bonne (de l'ordre de 100 $\mu$ m). Cette technique est la méthode d'imagerie structurelle la plus performante. Cependant, les acquisitions en trois dimensions augmentent fortement la durée d'acquisition qui est alors de l'ordre de plusieurs heures. L'inconvénient majeur de cette méthode est que l'appareillage est coûteux (Cassidy and Radda 2005). De plus, le temps d'acquisition nécessaire pour obtenir une bonne résolution empêche un suivi de biodistribution dans des temps rapprochés et limite le nombre d'animaux pouvant être analysés dans une même journée.

## **2 L'imagerie optique**

L'imagerie optique est une technique non invasive, peu coûteuse, rapide, simple d'utilisation et non ionisante permettant le suivi en temps réel de molécules avec une bonne résolution spatiale (de l'ordre du nanomètre au millimètre) et temporelle (de quelques microsecondes à quelques minutes), allant de l'échelle cellulaire jusqu'à quelques centimètres, et ce, de manière semi-quantitative (2D) ou quantitative (3D) (Sancey, Dufort et al. 2009; Dufort, Sancey et al. 2010).

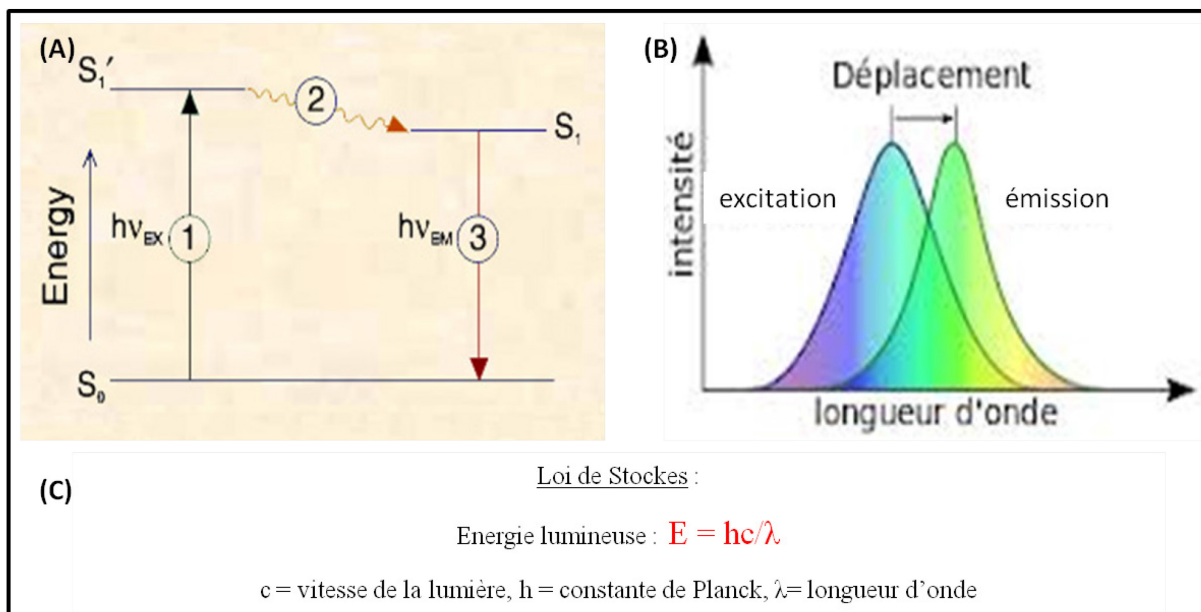
### **2.1 L'imagerie optique de fluorescence**

L'imagerie de fluorescence se base sur l'utilisation d'un fluorophore pour marquer un élément biologique que ce soit *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

#### *2.1.1 Principe*

La fluorescence est un phénomène lors duquel une molécule nommée fluorochrome ou fluorophore émet une lumière de longueur d'onde donnée suite à l'absorption d'énergie lumineuse. Ce phénomène est décrit par le diagramme de Jablonski (Figure 16).





**Figure 16 : Principe de la fluorescence**

(A) diagramme de Jablonski, (B) déplacement de la longueur d'onde de fluorescence entre l'excitation et l'émission, (C) la loi de Stokes

En l'absence de source lumineuse d'énergie suffisante, les doublets électroniques du fluorochrome sont à l'état fondamental d'énergie  $S_0$ .

Un photon d'énergie  $E_{excitation}$ , fourni par une source lumineuse externe telle qu'un laser, est absorbé par le fluorochrome permettant le passage des doublets électroniques à un état excité ( $S_1'$ ) (1). Cet état excité persiste durant un temps très court de l'ordre de la nanoseconde et est appelé *temps de vie de fluorescence*. Pendant ce temps le fluorochrome subit des changements conformationnels. L'énergie  $S_1'$  est partiellement dissipée soit sous forme de chaleur soit par transfert d'énergie entre les fluorochromes ; c'est le phénomène de relaxation (2). Le fluorochrome possède alors une énergie  $S_1$  plus faible que l'énergie  $S_1'$  initiale. Enfin, afin de retourner à son état fondamental, le fluorochrome ré-émet un photon d'énergie  $E_{émission}$  (3). Les doublets électroniques sont de retour à l'état fondamental  $S_0$  (Figure 16 A).

D'après la loi de Stokes, l'énergie est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Or l'énergie d'excitation  $S_1'$  est plus grande que l'énergie d'émission  $S_1$  étant donné qu'une partie s'est dissipée sous forme de chaleur. Par conséquent la longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) est inférieure à la longueur d'onde d'émission du fluorochrome ( $\lambda_{em}$ ). Le décalage de longueur d'onde correspond au déplacement de Stokes (Figure 16 B).

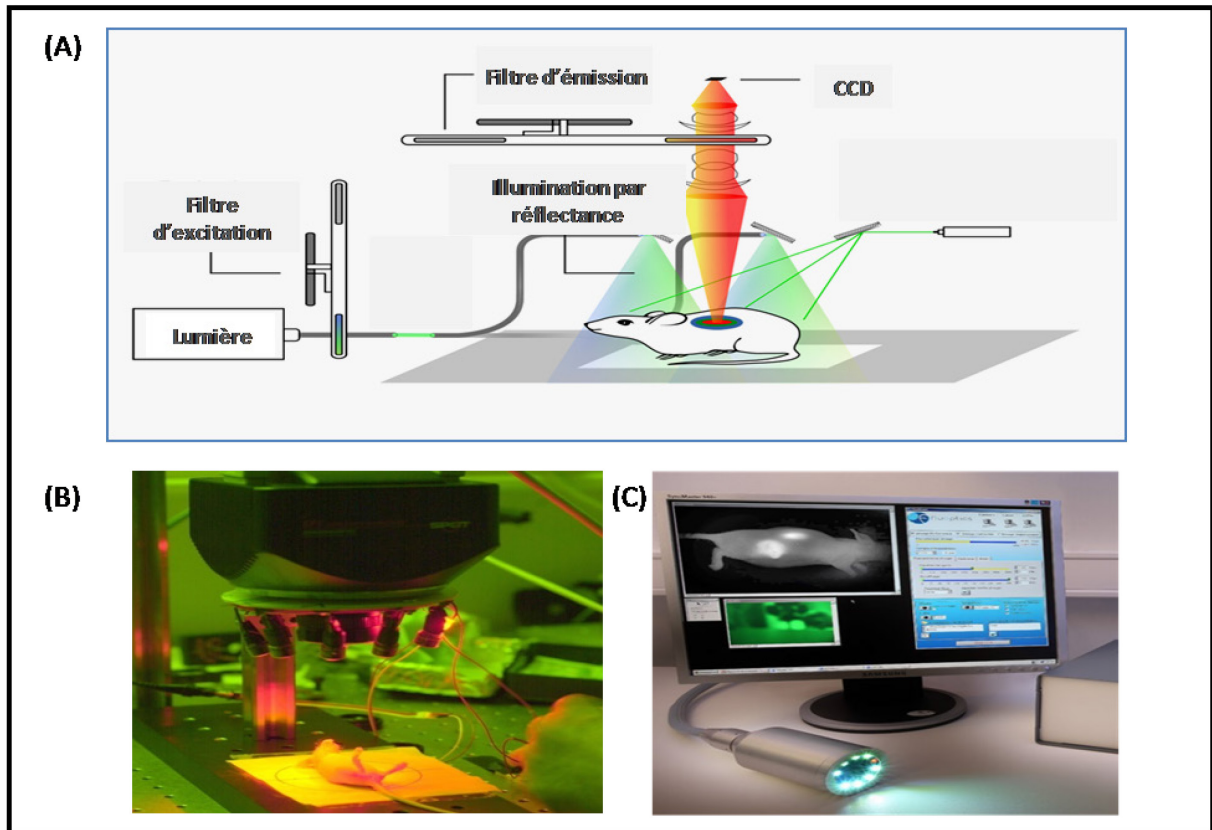
Un fluorochrome peut être caractérisé par différentes propriétés physiques :

- La longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission spécifiques : les fluorochromes sont différenciables entre eux par l'énergie dont ils ont besoin pour passer à un état excité et par leur énergie d'émission et, par conséquent, par des longueurs d'onde d'excitation et d'émission caractéristiques.
- Le rendement quantique de fluorescence : c'est le rapport entre le nombre de photons absorbés et le nombre de photons ré-émis par le fluorochrome lors de la fluorescence. Un rapport se rapprochant de 1 indique une bonne efficacité de fluorescence.
- La durée de vie de fluorescence : c'est le temps au cours duquel le fluorochrome reste dans l'état excité  $S_1$  avant de ré-émettre un photon pour revenir à l'état fondamental.
- Photo-blanchiment : c'est la perte d'intensité de fluorescence d'un fluorochrome au cours du temps lors d'une excitation en continu. Ce phénomène s'explique par la réaction du fluorochrome avec d'autres éléments, tels que l'oxygène, entraînant sa destruction.

### 2.1.2 *L'imagerie de fluorescence par réflectance*

Le système d'Imagerie de Fluorescence par Réflectance (FRI) consiste en une source d'excitation (lampe proche-infrarouge ou laser), des filtres d'excitation et d'émission et d'une caméra *Cooled Charge-coupled device* (CCD) qui permettent d'obtenir des images en deux dimensions. Les filtres permettent de distinguer la lumière ré-émise par les fluorochromes et d'éliminer les photons directement reflétés par l'objet. Les images de fluorescence sont superposées à l'image en lumière blanche pour déterminer la provenance du signal de fluorescence (Figure 17).

Des techniques d'analyse spectrale permettent de distinguer la fluorescence des différents fluorochromes lors d'une acquisition. La durée d'acquisition est de l'ordre de la seconde ou de la milliseconde selon le signal du fluorochrome (Ntziachristos, Ripoll et al. 2005; Weissleder and Pittet 2008).



**Figure 17 : Système d'imagerie optique de fluorescence par réflectance**

Les traceurs fluorescents injectés sont excités à une longueur d'onde donnée. Le signal émis est capté par une caméra CCD, équipée de filtres capables de séparer le rayonnement d'excitation diffusé des signaux de fluorescence émis par les traceurs.

(A) principe de l'imagerie de fluorescence par réflectance (FRI)

(B) Exemple d'un système d'imagerie *in vivo* en 2D

(C) Exemple d'un système FRI portatif: la sonde per-opératoire (Fluobeam™, Fluoptics).

Différents systèmes tels que l'IVIS kinetic (Perkin Elmer), Hamamatsu (PDE; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan), ou Fluobeam™ (Fluoptics, Grenoble, France) sont disponibles sur le marché.

Cette méthode est utile pour l'imagerie des tumeurs superficielles ainsi que pour l'imagerie per-opératoire des organes exposés. Cependant, la fluorescence en deux dimensions a une limite de détection en profondeur de 3 à 5mm et n'est pas quantitative.

### 2.1.3 L'imagerie optique de fluorescence par transmission

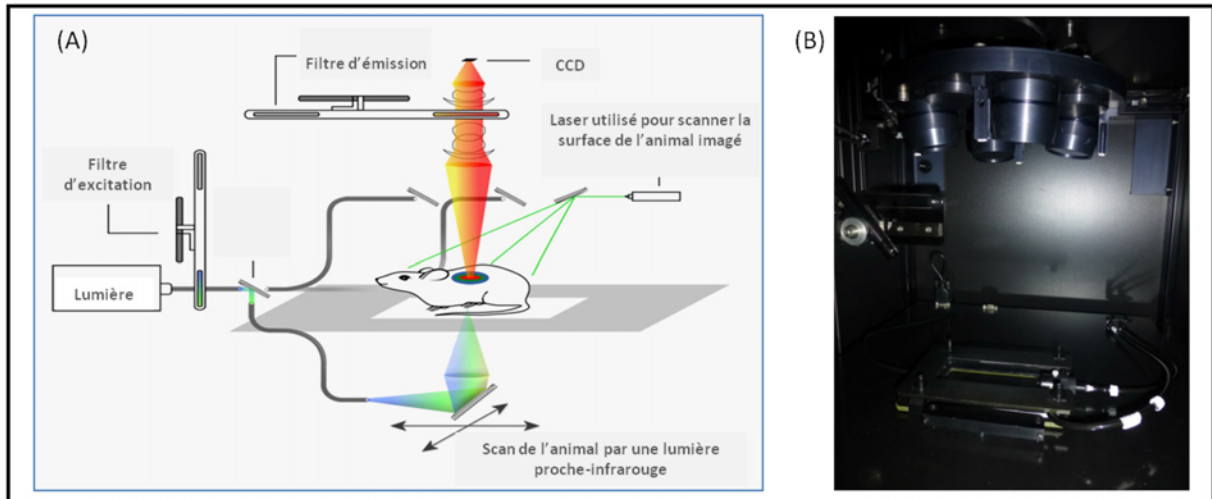
L'imagerie optique de fluorescence par transmission est réalisée avec un système de tomographie de fluorescence optique diffuse (fDOT) (Tomographe-3D) qui permet de réaliser des images en trois dimensions d'un signal de fluorescence.

Ce système, développé par le CEA-Leti (Grenoble, France) permet, après l'injection d'un marqueur fluorescent proche-infrarouge spécifique des cellules tumorales, d'enregistrer le signal de fluorescence transmis et d'en déduire la localisation de la tumeur.

L'animal, ayant reçu l'injection du marqueur fluorescent, est placé entre deux plaques de plexiglass sur un lit chauffant, puis est scanné avec une lumière infrarouge sur l'ensemble de la zone choisie. Pour chaque point de mesure, le système enregistre le signal de fluorescence émis et transmis puis, à l'aide d'un algorithme de « technique de reconstruction algébrique » (ART), reconstruit le signal de fluorescence 3D permettant de déterminer la localisation du marqueur fluorescent (Koenig, Herve et al. 2010).

L'avantage majeur du Tomographe-3D est d'obtenir des images de fluorescence-3D d'une zone de l'organisme très hétérogène et fortement atténuante telle que les poumons sans avoir recours à une technique d'immersion. En effet, l'imagerie pulmonaire est délicate de par la présence sur une même zone d'une grande quantité d'air et de sang. De plus, l'imagerie *in vivo* implique que la souris respire et donc entraîne un mouvement sur cette zone lors de l'acquisition.

Cependant, cette méthode ne permet, de même que les méthodes en deux dimensions, qu'une quantification relative du signal de fluorescence (Weissleder and Pittet 2008).



**Figure 18 : Système d'imagerie de fluorescence par transmission (3D)**

L'acquisition est réalisée par transillumination. La souris est scannée par le dessous à l'aide d'un laser proche-infrarouge. La lumière transmise et la fluorescence émise sont recueillies par une caméra CCD. Après balayage précis de la surface d'intérêt par un laser et l'utilisation d'un algorithme de traitement du signal, il est possible d'obtenir des reconstructions en 3D incluant la localisation spatiale des sources fluorescentes.

(A) principe de la fluorescence par transmission (B) exemple d'un système d'imagerie : le Tomographe 3D

#### 2.1.4 *L'utilisation de la fluorescence en oncologie*

L'utilisation de la fluorescence en oncologie permet d'améliorer considérablement le diagnostic mais également la thérapie lorsqu'elle est utilisée pour assister la chirurgie.

Ainsi, la mesure de la fluorescence endogène aide au diagnostic et à la détection des cancers en se servant des informations données par la quantité d'oxy et de déoxy-hémoglobine, de lipides et d'eau qui absorbent la lumière ou sur l'épaisseur des tissus superficiels alors que la fluorescence exogène repose sur la génération de sondes fluorescentes qui sont riches en informations fonctionnelles.

Actuellement, la chirurgie assistée par fluorescence est l'application la plus courante en oncologie clinique. Elle est l'objet de nombreuses études pré-cliniques et est de plus en plus testée en clinique.

Ce chapitre a fait l'objet d'un e-book en 2013 dans le journal Future Science

# Use of endogenous and exogenous fluorescence in oncology

**Anastassia Karageorgis**, Victor Jeannot, Jean-Luc Coll

Future Medicine, e-book, October 2013, Pages 98-111, Doi: 10.4155/ebo.13.243

# About the Authors



## Anastassia Karageorgis

Anastassia Karageorgis is a doctor of pharmacy. She graduated in 2010 from the University of Grenoble, France. After a master degree, she is now studying for her PhD at Albert Bonniot Institute, National Institute of Health and Medical Research (INSERM) U823 (Grenoble, France). Since her master degree, she has been interested in targeted therapies against cancer and new theranostic tools.



## Victor Jeannot

Victor Jeannot obtained his PharmD and the Erasmus Mundus 'Biohealth computing European master' (specialty biotechnology) scholarship in 2012. He is currently studying for his PhD in oncology within INSERM U823. He is in particular involved in the development of targeted drug delivery in lung cancer using optical imaging tools.



## Jean-Luc Coll

As Director of Research at INSERM, Jean-Luc Coll is heading a research team focused on the development of targeted molecules and optical instrumentation. His main interest is the introduction of optics for diagnostics and targeted treatment of cancer in clinical trials. In particular, his group is trying to develop systems for optical guided surgery of cancer.

# Chapter 1

## Use of endogenous and exogenous fluorescence in oncology

Anastassia Karageorgis,  
Victor Jeannot &  
Jean-Luc Coll

*In vivo* near infrared fluorescence imaging has recently proved its potential and interest in preclinical studies, and is now being introduced in medical applications. Indeed, with its high sensitivity, ease of manipulation and reduced cost in comparison with other molecular imaging techniques optical imaging is extremely promising. More importantly, the optical imaging method intrinsically provides functional information on the biology of the sample or disease of interest.

doi:10.4155/EBO.13.243



Optical imaging uses photons. When a photon encounters living matter, it can be absorbed, diffused, transmitted or reflected. It is possible to withdraw information from each scenario, and the investigator can get a glimpse of the biology behind the modification brought by the excitation light. Clinical applications based on the detection of endogenous or exogenous fluorophores will be presented in this chapter and special attention will be paid to the use of the derived optical methods for image-guided surgery in oncology.

Surgical resection of a tumor, if feasible, is correlated with the survival rate of the patients. Long-term survival is directly linked to the obtention of the so-called 'R0-resection', which defines complete removal of all of the tumors, even after a microscopic examination of the tumor margins. Therefore, the more complete the surgery, the more improved the survival rate. Although highly efficient preoperative imaging methods, such as x-ray computed tomography (X-CT), MRI, positron emission tomography (PET), single-photon emission computed tomography (SPECT) or ultrasound imaging, are currently used for diagnosis, translating these images to the operation field is difficult, and, ultimately, the surgeon is usually guided only by the visual appearance and palpation so as to discriminate between the tumor and normal tissues. Furthermore, surgeons are also confronted by other challenges during surgical procedures, such as avoiding vital anatomical structures.

Fluorescence-guided surgery is currently emerging as a method that can improve surgical practice, especially to aid in detecting small (infiltrative) tumors while evaluating their margins, and that can also help detecting sentinel lymph nodes (SLNs). It uses light in the visible or near-infrared (NIR) spectra, coming either from exogenous fluorophores or **endogenous-fluorescent** properties of the tissues. In exogenous fluorescence, the presence of an injected fluorescent contrast agent that can be detected is more or less specific to the disease, while in endogenous fluorescence, physiopathological parameters of the tissues specific to an anomaly can be accessed. These two aspects will be presented in the following chapters.

### Methods based on endogenous fluorescence

#### Autofluorescence bronchoscopy

Autofluorescence bronchoscopy (AFB) was introduced in 1991. It is a method of *in vivo* spectroscopy that utilises the autofluorescence emission from endogenous fluorophores. When exposed to



**Endogenous fluorescence:** the natural fluorescence of an organism. Indeed, in mammalian tissues, nicotinamide adenine dinucleotide, flavins and proteins of the extracellular matrix, such as collagens and elastin, are the main natural fluorophores emitting in the visible spectrum, while porphyrins are the most abundant ones in the near-infrared spectrum.

violet-blue light (442 nm), normal bronchial tissue has a relatively strong fluorescence in the range of 500–520 nm and therefore appears green. The development from normal bronchial epithelium to invasive cancer, via dysplasia and carcinoma *in situ*, is characterized by a progressive decrease in the overall fluorescence intensity, along with a relative shift in the emission towards the red end of the spectrum. This contrast is the result of differences in the chemical constituents of the respective tissue histology, metabolic state as well as blood flow. Therefore, in the case of neoplastic changes, the epithelial layer is both thicker and contains a lower concentration of fluorophores. As a result, there is a decrease in the intensity of fluorescent emission of the connective tissue beneath the epithelium. In addition, there is a relative shift in the spectral emission from green (normal) to red (abnormal).



Autofluorescence bronchoscopy is a method of *in vivo* spectroscopy where the green autofluorescence of normal bronchial tissue progressively decreases in intensity and shifts to red from dysplasia to carcinoma *in situ*.

When it was accepted by the US FDA in 1996, AFB was using a helium–cadmium laser. Since then, different systems were developed, and it is now routinely used for the detection of preneoplastic lesions and lung cancer [1]. In recent devices, white light (WL) is produced by a xenon lamp and a diode laser (408 nm) serves for the detection of autofluorescence. The signal is collected by a color charged-coupled-device video-endoscope. The sensitivity of AFB is much better than that of WL bronchoscopy (91 vs 58%). This improvement mainly comes from the fact that AFB is adding functional information (i.e., loss of autofluorescence of the normal tissue) on top of the standard macroscopic examination provided by WL bronchoscopy. However, it also has a lower specificity, with 26 versus 50%. The two methods are therefore complementary and improve the early detection of premalignant and malignant lesions.

Nonetheless, even if AFB is widely used as a diagnostic tool in clinic, this approach is strongly surface weighted and cannot detect deep defects, mainly because it is working at visible wavelengths where light absorption in living tissues is the strongest due to the presence of nicotinamide adenine dinucleotide, flavins and of proteins of the extracellular matrix such as collagens and elastin. Shifting to NIR wavelengths greatly augments approximately  $10^4$ -times the capacity of photons, penetrating deeper into tissues. This penetration usually ranges from a few micrometers for visible light to several millimeters depth using NIR, although this is greatly depending on tissue's type. In the visible spectrum, hemoglobin is the main 'absorber' of photons. In the NIR spectrum, porphyrins are the most important endogenous fluorophores.

Interestingly, porphyrins are usually more concentrated in malignant than benign tissues. Therefore, this is the appropriate spectral window, ranging from 650 to 900 nm, into which prototypes of NIR endoscopes are currently being developed [2].

The use of optical probes that bring additional functional information and accurate specificity for the disease tissue can also contribute very significantly to the use of optics as well as to the detection of endogenous molecules. Therefore, it is important to develop fluorescent probes specific to a target that can be used in clinic.

### Methods based on exogenous fluorescence

Only three fluorescent dyes are currently approved by the FDA for medical use: fluorescein, 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and indocyanine green (ICG). Accordingly, the first human trials were performed using these dyes.

#### Fluorescein detection

A very good example concerning the use of fluorescein was published on glioblastoma multiform surgery. Fluorescein sodium is used to detect the disruption of the blood–brain barrier. In the presence of a brain tumor, and therefore a rupture of the blood–brain barrier, an intravenous injection of 20 mg/kg fluorescein sodium is able to stain tumors with 100% sensitivity, despite its absence of specificity. This allows the visualization of the tumor below the brain surface and across healthy tissues. It also provides visual information on the blood vessels within or surrounding the tumors. Such a technique allows for a safer surgery owing to the identification of the anatomical structure and also permits the control of total resection, as shown initially on ten patients [3].

Fluorescein can also be linked to a tumor-specific ligand such as folate. Since the folate receptor is overexpressed in >90% ovarian cancer, folate-fluorescein isothiocyanate injected intravenously significantly augments the number of detectable and resected tumor nodules, compared with a conventional visual inspection [4]. The authors are now changing the fluorophore, in order to replace fluorescein with a NIR dye. Therefore, they expect to augment the sensibility of the method.



5-aminolevulinic acid presents 100% tumor specificity, 85% sensitivity for glioma and a sensitivity and specificity of 100% and 68.5%, respectively, in bladder cancer.

Fluorescein sodium is a tracer of the blood–brain barrier disruption, which is able to stain brain tumors with 100% sensitivity, despite a specificity of 0%.

#### 5-ALA detection

The pro-drug 5-ALA is not fluorescent but after its intracellular accumulation it is turned into fluorescent porphyrins, a family

of molecules known as photosensitizers. Neoplastic cells synthesise abundant intracellular protoporphyrin IX after systemic or topical administration of 5-ALA. Illumination of protoporphyrin IX at an appropriate UV wavelength (440 nm) induces a visible (635 nm) red fluorescence. Therefore, it allows for the detection of small tumors. In glioma, 5-ALA presents a 100% specificity and 85% sensitivity, which justified its utilization in surgery in a randomized multicenter Phase III trial on 322 patients. This study established that 5-ALA-guided surgery facilitated a complete tumoral resection, associated with a better outcome of the patients [5]. This was also applied to fluorescence-guided cranial meningioma surgery, where a less aggressive 'total' resection was also achieved [6].

5-ALA has also been shown to have a sensitivity and specificity of 100 and 68.5%, respectively, in bladder cancer. In this case also, its utilization for fluorescence-guided endoscopy augmented the number of detected bladder tumors by 30% and reduced cancer recurrence [7].

### Indocyanine green

ICG presents an absorption peak at 780 nm and an emission at 820 nm. It is therefore ranging within the optimum NIR window. After intravenous injection, ICG binds to plasma proteins and is rapidly taken up by the liver and eliminated from the blood stream. It is secreted nonmetabolized into the bile and will not bind to normal liver tissue. It has been widely used for the determination of cardiac or hepatic blood flow. Beside vascular surgery applications, which are not developed here, ICG has been mainly used for the detection of SLNs and tumor detection.

### SLN detection using ICG

The SLN is the first draining lymph node downstream of the tumor. SLN mapping in various cancers may have prognostic and therapeutic significance, but currently available techniques based on the peritumoral injection of methylene blue or <sup>99m</sup>Tc colloids to detect them during surgery are not optimal. Several teams started to investigate how optical imaging could improve intraoperative detection. This has been applied to many protocols in breast, skin, head and neck, colorectal as well as lung cancers in more than 25 trials (for review, see [8]). Altogether, the results presented are quite excellent in breast and skin cancers compared with nuclear-based methods or coloration with methylene blue. The number of patients enrolled in other cancers is still too small to provide statistically significant information. In addition, ICG presents a rapid (10 min) distribution in the lymph node, faster than



Indocyanine green is taken up more rapidly than nanocolloids currently used for sentinel lymph node detection. In addition, it has the capacity to accumulate in hepatocarcinoma cells.

currently used colloids, which is an advantage during surgery, in addition to not being radioactive [9]. This is a main advantage for the patients and the medical staffs.

A protocol using a peritumoral injection of 10 mg ICG in 2 ml around non-small-cell lung tumors was recently developed. This allowed efficient sentinel node identification 10 min after injection of ICG with a rate similar to radioactive-tracer injection while avoiding the problems of using radiation. Intraoperative ICG fluorescence detection avoided unnecessary lymph node dissection in these patients [10]. In a more recent study, the same group also evaluated, on 61 human patients, the difficulties associated with the use of **2D-fluorescent reflectance imaging** (2D-FRI) in SLNs. In particular, they showed that SLNs located deeply in the lung parenchyma or fat tissues were not visible [11].

### Detection of hepatic lesions using ICG

Surgery is the best available therapy for patients with hepatic tumors, but survival is directly linked to the complete removal of all tumors. Despite the use of sophisticated preoperative contrast computed tomography and MRI imaging as well as intraoperative ultrasonography, visual appearance and palpation is still the only way to discriminate between tumor and normal tissue during surgery.

As seen before, ICG injected intravenously is rapidly taken up and eliminated from the blood stream by the liver and excreted into the bile. Therefore, it is normally used for the measurement of the hepatic function. However, in pathological situations such as hepatocellular carcinoma (HCC), ICG accumulates inside HCC cells where it can stay for several days [12]. In all the 63 patients studied, HCC tumors were fluorescent, allowing a complete resection. Only five false-positive nodules were problematic. Furthermore, this strategy allowed new nodules to be detected that were not detected during preoperative examinations [13].

Aa

**2D-fluorescent reflectance imaging:** the sample is submitted to an excitation light that can be absorbed by a fluorophore, which then fluoresces at a longer wavelength. Since the lamp and charged-coupled-device camera are located at the same place the photons that will be collected are reflected. Sensitivity is very good in the near-infrared spectrum, ( $10^{-12}$  M), spatial resolution varies from 100  $\mu\text{m}$  to 2 mm. Temporal resolution is in the range of milliseconds. 2D-fluorescent reflectance imaging is highly surface-weighted, allowing detection at  $\pm 5$  mm depth, and quantification is at best semiquantitative.

ICG-based NIR detection of HCC lesions is also used for optic-guided surgery of metastases of liver cancer that can occur in distant organs such as the lungs or lymph nodes because ICG will be also trapped in these modified cancerous cells of hepatic origin [14]. By contrast, ICG can also delineate metastasis of extra-hepatic origin located in the liver (in particular colorectal carcinoma (CRC) metastasis). In these CRC

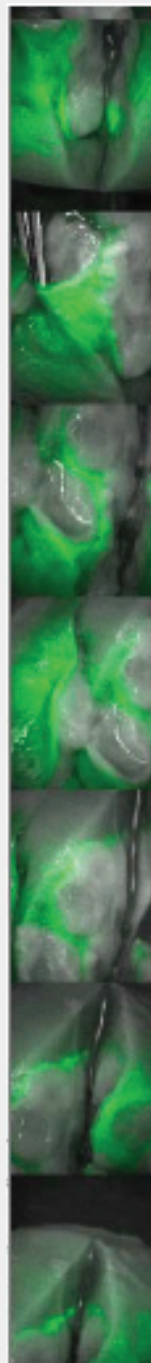
metastases, ICG does not stain the metastatic tumor itself, but will rather accumulate and stain the noncancerous liver parenchyma in the immediate vicinity of the lesion. This could be due to the fact that hepatocytes surrounding the growing metastasis are compressed and/or modified and will not be able to excrete ICG that they collect into the bile. CRC metastasis are therefore delineated as rim-fluorescing lesions. This ring of ICG-positive normal liver tissue (**Figure 1**) is a powerful help for the surgeon since it improves his vision in real-time and helps him to reach a R0 resection by removing all of the fluorescent surroundings and potentially invaded tissues [12].

### Examples of current technical developments in optics & instrumentation

The noninvasive *in vivo* biodistribution of the fluorescent probes can be evaluated in small animals by whole-body imaging using 2D-FRI. The authors have developed the vector 'RAFT-(cRGD)<sub>4</sub>' based on a decapeptide scaffold that presents four copies of the cyclic RGD tripeptide, a motif for targeting tumor and endothelial cells expressing the integrin  $\alpha_v\beta_3$  receptor [15]. Using a 2D-FRI imaging system, the authors demonstrated that an intravenous injection of Angiostamp™ (Fluoptics, Grenoble, France), the NIR-labeled commercial version of RAFT-(cRGD)<sub>4</sub>, can improve the quality of surgery of peritoneal carcinomatosis-bearing mice by doubling the number of nodules detected and significantly reducing the duration of surgery [16]. In addition, the authors proved that it is possible to use this method to improve highly infiltrative spontaneous fibrosarcoma surgery in cats in a clinical veterinary phase. All tumors were labeled by the tracer and had an overall tumor-to-healthy tissue ratio of  $14 \pm 1$  during surgery (**Figure 2**) [17]. This paved the way towards clinical applications, and Angiostamp is now currently being produced and tested for future human applications.

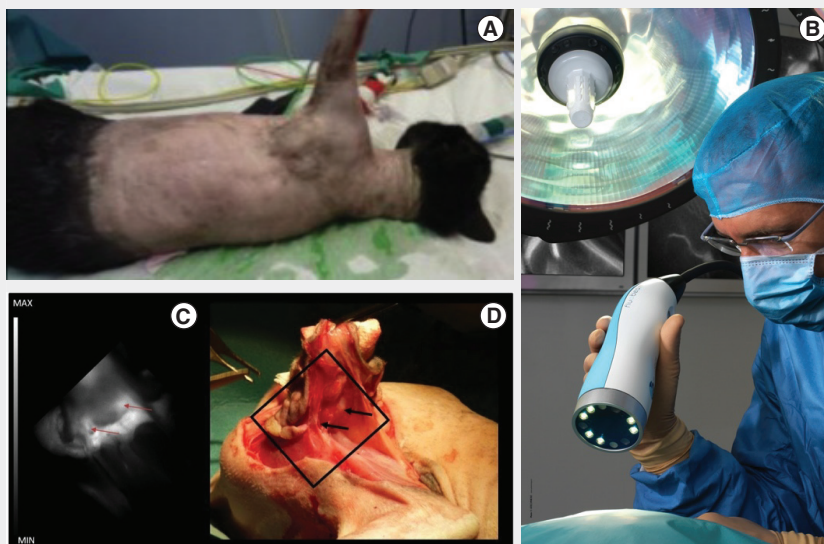
These developments of the molecule for targeting tumors were also associated with the fabrication of a clinical-grade 2D-FRI-imaging system. It consists of a NIR laser and a charged coupled device camera, equipped with several filters in order to separate the scattered light and to

**Figure 1.** Serial images acquired during optical-guided liver surgery 24h after indocyanine green administration.



The rim of fluorescent signal surrounds this colorectal metastasis located in the liver and helps the surgeon to remove possibly cancerous parenchyma tissues. Images courtesy of Barabino G, Centre Hospitalier Universitaire St Étienne, France, Coutard JG and Berger M (CEA-Leti, Grenoble, France).

**Figure 2. Optical guided surgery of fibrosarcoma in a cat.**



(A) The cat received an intravenous injection of Angiostamp™ (Fluoptics, Grenoble, France) the day before surgery (B) and is operated on with the help of a 2D-fluorescent reflectance imaging device (Fluobeam™, Fluoptics) that allows the surgeon to see immediately where the separation is between this infiltrative tumor and the surrounding healthy tissues. (C) The fluorescent signal can be seen during surgery (D) and corresponds to tumor sites seen with white light. The arrows point to the infiltrated areas that should be removed surgically. This experiment was performed by CH Wenk with the help of the group of Vetagro-Lyon (F Ponce and C Carruso).

eliminate the photons directly reflected by the object. Several imaging systems based on 2D-FRI are now commercially available, such as the Photodynamic Eye (PDE; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) and the Fluorescence-Assisted Resection and Exploration (FLARE™) system from the Frangioni Laboratory (MA, USA). Two smaller systems are the Mini-FLARE™ and the Fluobeam™ (Fluoptics; the authors' consortium developed). The authors also made a more recent miniaturized version of Fluobeam adapted to the surgery of small cavities such as the mouth (Figure 3) [18].

However, no fluorescence can be detected using 2D-FRI when Angiostamp is injected in a mouse with lung tumors because the signal is too weak and too deep to be visualized noninvasively by this method (Figure 4). This enlightens the fact that 2D-FRI is limited to the detection of fluorescence close to the surface and that we need to generate more powerful optical



devices. As explained before, the depth accessible to 2D-FRI imaging is usually a question of millimeters ( $\pm 5$  mm), and the lung is one of the most difficult organ to image since it is rich in hemoglobin and also surrounded by the rib cage onto which the emitted photons will bounce several times before they can exit.

More sophisticated methods, such as **diffuse optical tomography (DOT)**, are therefore developed for the detection of NIR signal in thick ( $<3$  cm) living tissues (**Figure 5**). DOT can detect exogenous fluorescence inclusions (in this case we call it fDOT for fluorescence DOT [19]), but can also provide quantitative information on endogenous tissue chromophores, such as oxy- or deoxy-hemoglobin, lipids and water that absorb light. Since the molar absorption spectra of these chromophores are known, their concentration can be estimated at several centimeters under the skin, opening new fields of investigation in pathologies such as breast, thyroid or prostate cancers. Moreover, combinations of DOT with techniques showing high resolution but low specificity to distinguish tumors (e.g., x-ray or echography) in a bimodal imaging system, offer the opportunity to improve tumor detection and diagnosis. One difficulty of tomography is to satisfy at the same time the cost of the instrumentation and the time of investigation with the spatial and spectral sampling necessary to yield accurate measurements of the chromophore concentration. As opposed to the cost-efficient **continuous wave** sources of light, frequency- or time-resolved methods are more expensive but provide data related to both optical absorption and scattering. However, the measurements need to be acquired at several wavelengths, covering the full spectrum of absorption of interest. This

**Figure 3. A miniaturized 2D-fluorescent reflectance imaging system especially adapted for oral surgery.**

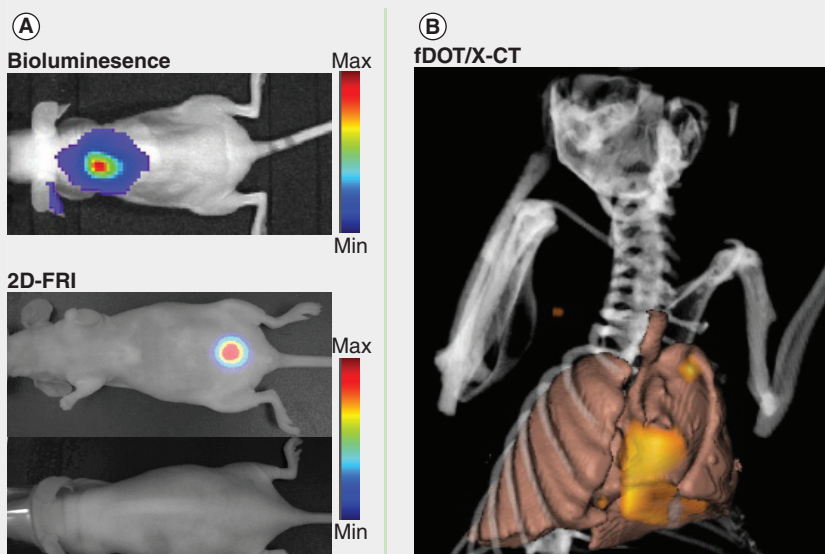


Taken from [18].

**Ac** **Diffuse optical imaging and diffuse optical tomography:** In biological tissues, photons propagate through highly scattering media in a diffusive manner. Therefore this requires the use of a diffusion model for deep tissue imaging. The commonly admitted model for deep tissue light propagation relies on the radiative transfer equation, which can be simplified into the diffusion equation (DE). The DE contains different factors, including the photon diffusion coefficient (related to the reduced scattering coefficient,  $\mu_s$ ), absorption coefficient ( $\mu_a$ ), the photon fluence rate, the speed of light and the source term. DE admits algebraic solutions in the simplest geometry, but requires numerical methods for more complex surfaces. Successful solving of the DE leads to 3D imaging of the tissues. Diffuse optical imaging can be used to map the tissues with various chromophores and interesting parameters: blood concentration, oxymetry and fluorescence (endogenous or exogenous).



Figure 4. Interest of optical tomography to detect deep tumors in mice.



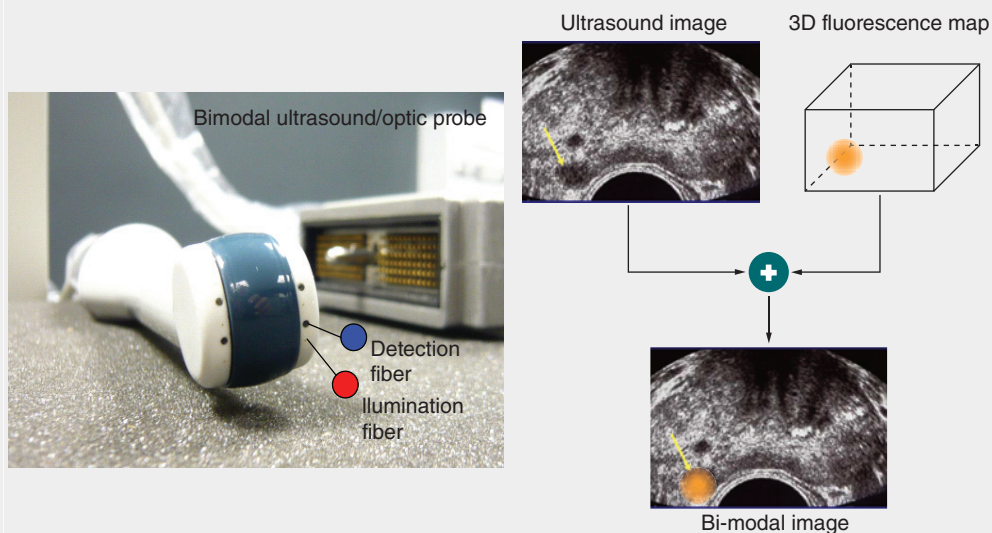
(A) The presence of luciferase positive lung tumors is detected by bioluminescence but no signal in the lung can be detected by 2D-FRI, although the Angiostamp™ (Fluoptics, Grenoble, France) fluorescent tumor-targeting agent is actually positively staining the lung tumor. This shows the limitation of 2D-FRI for detecting deep events. This problem is solved using fDOT, which indeed reveals the presence of a fluorescent signal in the invaded lung of this mouse. (B) This signal can then be fused with a CT image at high resolution in which the fluorescent inclusions are pseudo colored in yellow. 2D-FRI: 2D-fluorescent reflectance imaging; fDOT: Fluorescence diffuse optical tomography; X-CT: X-ray computed tomography. Image from Lavaud J, Josserand V, Optimal, Grenoble, France.

allows better measurement of the concentration of the molecules of interest but also augments the duration of the examination. In addition, time-resolved DOT requires the use of expensive parts, such as a pulsed laser and a time-resolved detector, to measure the time a photon will travel through the tissues.

**Aa** Continuous wave, frequency domain and time domain: continuous wave uses continuous wave laser diodes or light emitting diodes. Frequency domain uses radio frequency-modulated laser diodes and extracts the phase shift due to the light propagating in tissues for each frequency band. Phase sensitive measurements are performed through in-phase quadrature demodulation or frequency-lowering techniques. time domain uses short-duration pulsed lasers and detects signal changes over time using time resolved photon counting systems.

The results obtained by the different groups working in this domain are presented differently. They vary from intensity images to maps of absorption and scattering, tissue composition or physiological parameters, such as blood volume or oxygenation. These methods are currently under development and are tested for bimodal ultrasound and

**Figure 5. Bimodal detection of an exogenous fluorescent inclusion located deep in the prostate ( $\pm 2.5$  cm).**



This image can be obtained using the Prostafluor ultrasound/diffuse optical tomography imaging prototype developed by CEA-Leti (Grenoble, France; Boutet J and Dinten JM) with the help of Grenier N (The National Center for Scientific Research, Bordeaux, France).

optics diagnostic of breast and prostate cancers (Figure 5), but they are not yet used for surgery.

### Conclusion

Fluorescence imaging is therefore a powerful tool for improving surgical practice. However, due to the absence of clinical grade fluorescent probes, its development is still in infancy. Indeed, to get an injectable probe, the molecule should pass a series of regulatory tests in order to prove its absence of toxicity, be produced under good manufacturing practice standards and, of course, should demonstrate the benefit of using it in human patients. This is a long lasting and very expensive process, which strongly slows down the developments of new molecules. Instrumentation has been largely improved and its transfer in clinical trials is easier. However, new developments are still showing up daily and, in particular, for the fabrication of multimodal instrumentation that combine optics with ultrasounds. We are therefore living through a very exciting period for the development of optical tools applied to human health.

### Financial & competing interests disclosure

JL Coll is Co-Founder of Fluoptics, Grenoble, France. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.



### Summary.

- Endogenous fluorescence can help the diagnosis and detection of cancer and provide information on the levels of oxy- or deoxy-hemoglobin, lipids and water that absorb light, or on the thickening of superficial tissues.
- Exogenous fluorescence lies on the generation of fluorescent probes that are intrinsically providing rich functional information.
- Optical-guided surgery is the main current application of optics in clinical oncology.

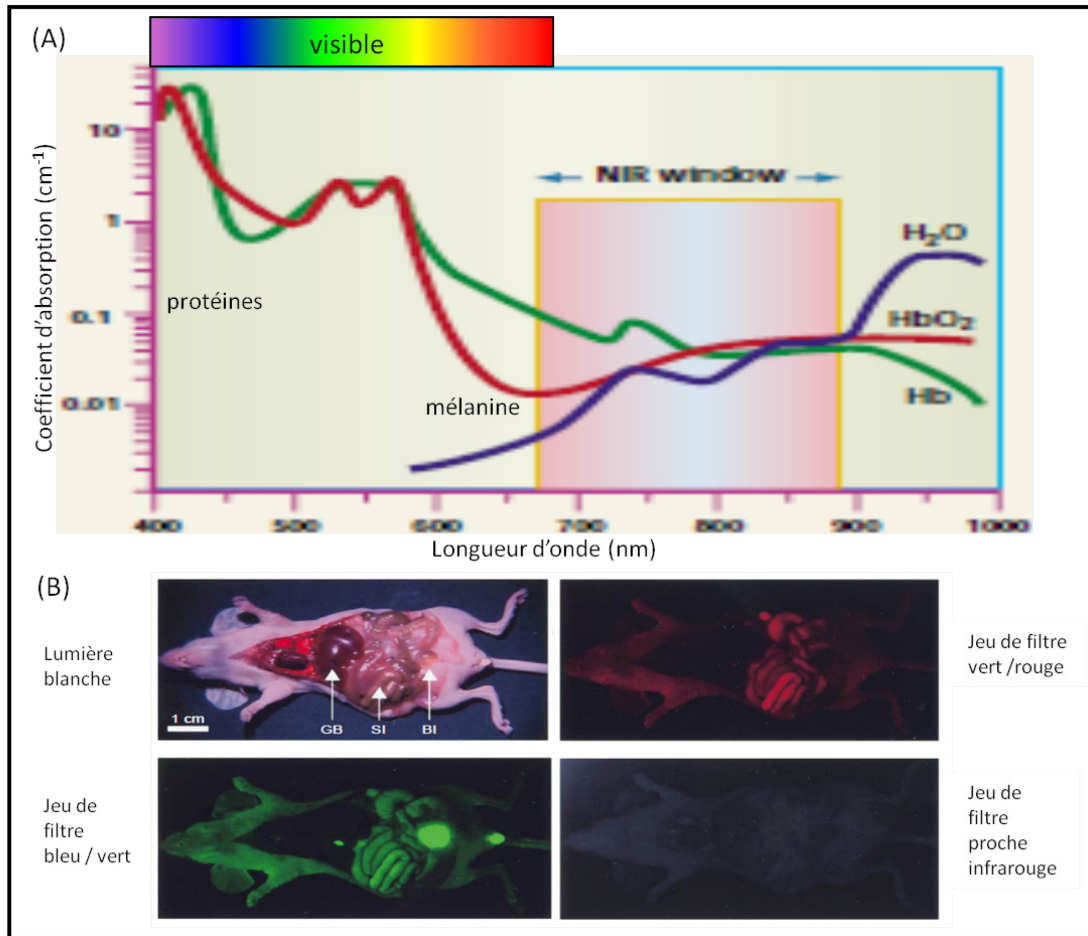
### References

- 1 Chen W, Gao X, Tian Q, Chen L. A comparison of autofluorescence bronchoscopy and white light bronchoscopy in detection of lung cancer and preneoplastic lesions: a meta-analysis. *Lung Cancer* 73(2), 183–188 (2011).
- 2 Jacobson MC, deVere White R, Demos SG. *In vivo* testing of a prototype system providing simultaneous white light and near infrared autofluorescence image acquisition for detection of bladder cancer. *J. Biomed. Opt.* 17(3), 036011 (2012).
- 3 Okuda T, Yoshioka H, Kato A. Fluorescence-guided surgery for glioblastoma multiforme using high-dose fluorescein sodium with excitation and barrier filters. *J. Clin. Neurosci.* 19(12), 1719–1722 (2012).
- 4 van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ *et al.* Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-alpha targeting: first in-human results. *Nat. Med.* 17(10), 1315–1319 (2011).
- 5 Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre Phase III trial. *Lancet Oncol.* 7(5), 392–401 (2006).
- 6 Muroi C, Fandino J, Coluccia D, Berkman S *et al.* 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided surgery for spinal meningioma. *World Neurosurg.* pii, S1878–S8750(12)01450-7 (2012).
- 7 D’Hallewin MA, Bezdetrnaya L, Guillemain F. Fluorescence detection of bladder cancer: a review. *Eur. Urol.* 42(5), 417–425 (2002).
- 8 Schaafsma BE, Mieog JS, Hutteman M, van der Vorst JR *et al.* The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J. Surg. Oncol.* 104(3), 323–332 (2011).
- 9 van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FP, Hutteman M *et al.* Randomized comparison of near-infrared fluorescence imaging using indocyanine green and 99(m) technetium with or without patent blue for the sentinel lymph node procedure in breast cancer patients. *Ann. Surg. Oncol.* 19(13), 4104–4111 (2012).
- 10 Yamashita S, Tokuishi K, Anami K, Miyawaki M *et al.* Video-assisted thoracoscopic indocyanine green fluorescence imaging system shows sentinel lymph nodes in non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 141(1), 141–144 (2011)
- 11 Yamashita S, Tokuishi K, Miyawaki M, Anami K *et al.* Sentinel node navigation surgery by thoracoscopic fluorescence imaging system and molecular examination in non-small cell lung cancer.

- Ann. Surg. Oncol.* 19(3), 728–733 (2012).
- 12 Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K *et al.* Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 115(11), 2491–2504 (2009).
  - 13 Gotoh K, Yamada T, Ishikawa O, Takahashi H *et al.* A novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation. *J. Surg. Oncol.* 100(1), 75–79 (2009).
  - 14 Satou S, Ishizawa T, Masuda K, Kaneko J *et al.* Indocyanine green fluorescent imaging for detecting extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* doi:10.1007/s00535-012-0709-0706 (2012) (Epub ahead of print).
  - 15 Boturyn D, Coll JL, Garanger E, Favrot MC *et al.* Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* 126(18), 5730–5739 (2004).
  - 16 Kéramidas M, Josserand V, Righini CA, Wenk C *et al.* Intraoperative near-infrared image-guided surgery of peritoneal carcinomatosis in a preclinical mouse model. *Br. J. Surg.* 97(5), 737–743 (2010).
  - 17 Wenk CH, Ponce F, Guillermet S, Tenaud C *et al.* Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- $\alpha(v)ss(3)$  integrin molecular probe. *Cancer Lett.* 334(2), 188–195 (2012).
  - 18 Gioux S, Coutard JG, Berger M, Grateau H *et al.* FluoSTIC: a miniaturized fluorescence image-guided surgery system. *J. Biomed. Opt.* 17(10), 106014 (2012).
  - 19 Koenig A, Herve L, Josserand V, Berger M *et al.* *In vivo* mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography. *J. Biomed. Opt.* 13(1), 011008 (2008).

2.1.5 *Fluorochromes du proche-infrarouge*

L'absorption et la diffusion des photons sont dépendantes de la longueur d'onde mais également de la profondeur de pénétration. L'absorption est très importante dans les longueurs d'onde allant de l'ultraviolet au visible à cause de l'absorption par l'hémoglobine et par la déoxyhémoglobine mais également par les lipides. Cette absorption est faible dans le proche-infrarouge et dans l'infrarouge ce qui permet à la lumière de pénétrer de plusieurs centimètres dans les tissus (Frangioni 2003; Ntziachristos, Ripoll et al. 2005) (Figure 19).



**Figure 19 : Autofluorescence des tissus selon la longueur d'onde**

(A) le graphique indique l'absorption de l'hémoglobine oxygénée ou non ainsi que de l'eau en fonction de la longueur d'onde. (B) images d'organes de souris à différentes longueurs d'onde (GB : vésicule biliaire, SI : intestin grêle, BI : vessie). Ceci met en évidence l'intérêt d'utiliser des fluorochromes en proche-infrarouge (NIR), zone à laquelle un minimum d'autofluorescence des tissus est observé. Adaptée de (Weissleder 2001; Frangioni 2003)

Les agents de contraste du proche-infrarouge peuvent être divisés en deux catégories :

- (i) les fluorophores organiques
- (ii) les nanocristaux semi conducteurs inorganiques ou Quantum Dots.

Les fluorophores organiques du proche-infrarouge sont utilisés depuis plusieurs années. Ils ont une taille inférieure à 1200 Daltons et ont des propriétés de biodistribution et de toxicité variables. Ils sont éliminés naturellement par filtration rénale en quelques minutes. Leur inconvénient est d'être sujets au photoblanchiment, ce qui limite leur sensibilité de détection (Cassidy and Radda 2005).

### 2.1.6 *Avantages et limites de la fluorescence*

Comme toutes les techniques d'imagerie, la fluorescence présente des limites. En effet elle nécessite un marquage préalable et a une limite de détection pour les organes profonds, notamment en raison des fluides biologiques interférents absorbant dans les longueurs d'ondes des fluorophores. De plus, ce type d'imagerie est dépendant de l'autofluorescence de l'organisme observé. Or, le corps et en particulier les poils, riches en kératine, sont naturellement auto-fluorescents dans les longueurs d'onde visibles ; ainsi, seuls des fluorophores du proche-infrarouge et des conditions d'expérimentation adaptées permettront un suivi *in vivo*. Par ailleurs, la résolution spatiale de ces techniques est faible et n'apporte pas de données anatomiques précises (Tseng, Shih et al. 2010).

Néanmoins, la fluorescence présente de nombreux avantages pour l'imagerie du petit animal ce qui en fait un outil de prédilection en recherche préclinique. En effet, l'acquisition est très rapide (de l'ordre de la milliseconde) et permet un suivi de la biodistribution d'une molécule fluorescente dans des temps rapprochés et sur le corps entier de l'animal. L'appareillage est peu coûteux et la mise en œuvre est simple. Enfin, les molécules fluorescentes sont principalement éliminées par filtration rénale mais également par le système hépatobiliaire, ce qui évite une accumulation toxique dans l'organisme et permet un suivi longitudinal sur un même animal sans entraîner de toxicité (Frangioni 2003).

## 2.2 **L'imagerie de bioluminescence**

L'imagerie de bioluminescence est une technique utile en recherche préclinique pour l'imagerie du petit animal.

L'imagerie de bioluminescence des cellules tumorales permet une mesure rapide et non invasive de la masse tumorale (Soling and Rainov 2003; Sasportas, Kasmieh et al. 2009; Ozawa and James 2010).

Cette technique se base sur la détection *in vivo* des cellules exprimant le gène rapporteur de la luciférase, exprimé uniquement dans des cellules vivantes et métaboliquement actives (Sato, Klaunberg et al. 2004; Kidd, Spaeth et al. 2009; Kidd, Caldwell et al. 2010). Au contact de son substrat, la luciférine associée à l'ATP ou la coéluentérazine (selon la luciférase présente), la luciférase entraîne la production d'oxyluciférine et de photons. Les photons sont captés et quantifiés par une caméra adaptée (Figure 20).

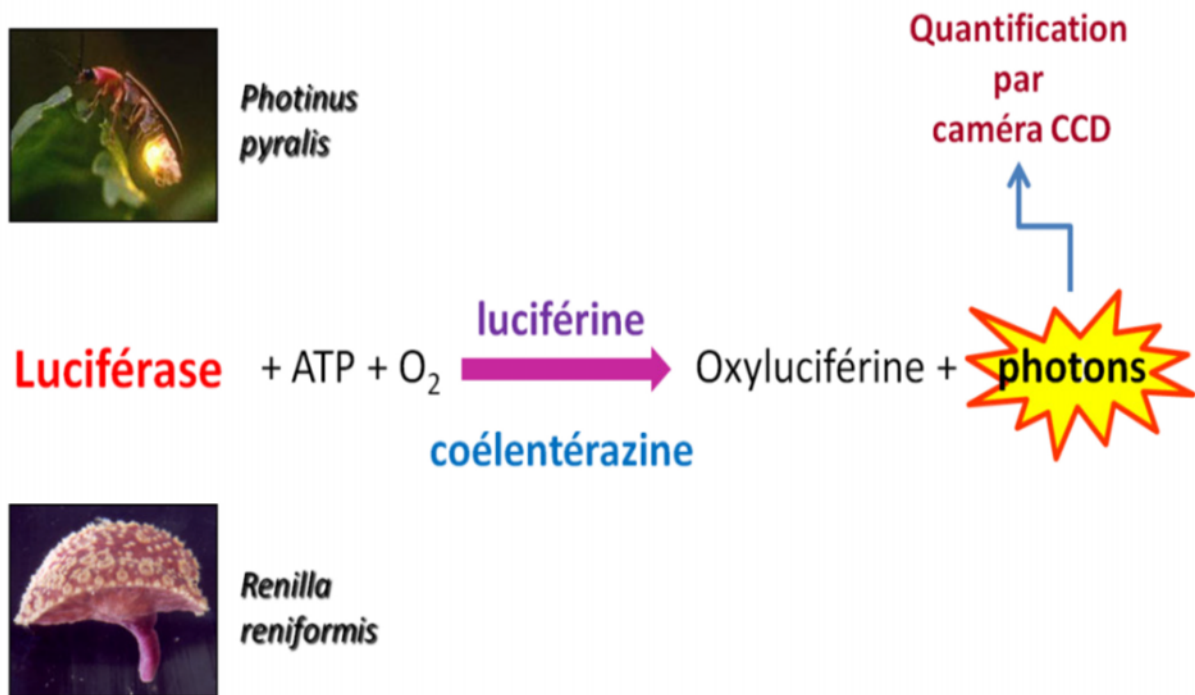


Figure 20 : Principe de la bioluminescence

La bioluminescence est basée sur la réaction enzymatique entre la luciférase et la luciférine ou entre la luciférase et la coéluentérazine, ceci dépendant de l'organisme dont est issue la luciférase. A la suite de cette réaction, des photons sont émis et sont quantifiés par une caméra CCD.

La luciférase Firefly est la plus utilisée en imagerie préclinique. En effet, elle a des longueurs d'ondes plus adaptées pour l'imagerie *in vivo* que la luciférase Renilla (environ 590nm contre 480nm). Bien que la détection de la lumière visible soit limitée en profondeur au niveau de la pénétration des tissus, la technique est idéale pour imager des petits animaux tels que la souris. Actuellement, l'imagerie de bioluminescence a fait ses preuves comme technique pour évaluer la croissance tumorale et la réponse aux traitements (Kidd, Spaeth et al. 2009). En effet, le renouvellement des enzymes luciférases est rapide (T<sub>1/2</sub> de 3 heures) ce qui permet des mesures en temps réel (avec une durée d'acquisition allant de la milliseconde à quelques minutes selon la quantité d'enzymes) et un suivi longitudinal de l'expression de la luciférase (Wu, Sundaresan et al. 2001; Cassidy and Radda 2005).



L'intérêt majeur de la bioluminescence est que les cellules des mammifères n'expriment pas naturellement la luciférase, il n'y a donc pas de bruit de fond et le rapport signal/bruit est excellent (Cassidy and Radda 2005; Ntziachristos, Ripoll et al. 2005; Weissleder and Pittet 2008). Cependant, l'imagerie de bioluminescence permet seulement de corrélérer une augmentation ou une diminution du flux de photons à une augmentation ou une diminution relative du nombre de cellules présentes au niveau de la région d'intérêt dans un modèle expérimental (Kidd, Spaeth et al. 2009).

Le développement des caméras CCD permet de réaliser un suivi longitudinal de la bioluminescence *in vivo*. Leurs principaux inconvénients sont de ne pas permettre une reconstruction en trois dimensions du signal et de ne pas être adaptables à la clinique humaine (Wu, Sundaresan et al. 2001).

### 3 Comparaison des méthodes d'imagerie

Technique	Résolution <i>in vivo</i>	profondeur	temps	quantitatif	Agent de contraste	Type d'imagerie	Coût	Utilisation clinique
IRM	10-100µm	Pas de limite	Minutes-heures	oui	Gadolinium Oxyde de Fer	Anatomique Fonctionnelle moléculaire	\$\$\$	oui
CT	50µm	Pas de limite	minutes	oui	iode	Anatomique fonctionnelle	\$\$	oui
PET	1-2mm	Pas de limite	Minutes-heures	oui	11C, 18F, 64Cu	Fonctionnelle moléculaire	\$\$\$	oui
FRI	2-3mm	<1cm	Secondes minutes	non	fluorochromes	Fonctionnelle moléculaire	\$	oui
Biolumi- nescence	Quelques mm	cm	minutes	non	luciférine	Moléculaire	\$\$	non

**Figure 21 : Tableau comparatif des différents systèmes d'imagerie cliniques ou expérimentaux**

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique, CT Computed Tomography, PET : Positron Emission Tomography, FRI : Imagerie optique de Fluorescence par Réflectance. Les valeurs de résolution correspondent à celles des dispositifs utilisés en préclinique. Les coûts sont basés sur le prix des dispositifs aux USA avec \$ < 100 000, \$\$ 100 000-300 000, \$\$\$ >300 000. D'après (Weissleder and Pittet 2008; Dufort, Sancey et al. 2010)



*Résultats*

*et*

*Discussion*

Chapitre 1 :  
Utilisation d'un vecteur cellulaire  
comme outil théranostique :  
Les cellules souches mésenchymateuses

## 1 Objectifs du projet

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules issues principalement de la moelle osseuse de l'adulte. Ces cellules faiblement immunogènes sont potentiellement capables de survivre assez longtemps après injection chez un receveur. De plus, elles sont attirées par les zones hypoxiques, par exemple lors de la survenue d'un Accident Vasculaire Cérébral (AVC) (Detante, Moisan et al. 2009), et par les sites inflammatoires. Elles sont donc susceptibles de cibler les tumeurs après administration systémique et d'y exercer une fonction biologique.

Nos objectifs sont de :

- tester la capacité des CSM de s'accumuler dans les tumeurs après injection systémique. Ceci pourrait aussi avoir un intérêt pour le diagnostic si nous pouvons imaginer cette accumulation tumeur-spécifique
- déterminer si la présence de ces CSM augmente ou ralentit la croissance tumorale
- évaluer l'impact des CSM sur l'angiogénèse tumorale

La première partie de mon projet de thèse a consisté à étudier l'impact des CSM sur le développement tumoral dans des modèles de tumeurs sous-cutanées et de métastases pulmonaires suite à une injection intratumorale ou systémique. Cette partie a fait l'objet d'une publication (Keramidas, de Fraipont et al. 2013).

La poursuite du projet a consisté à étudier l'impact des CSM dans un modèle de glioblastome humain orthotopique implanté chez la souris. En effet les glioblastomes forment des tumeurs très infiltrantes dans le cerveau et les traitements actuels sont très peu efficaces. Il est donc intéressant d'utiliser la propriété démontrée des CSM à atteindre les zones hypoxiques du cerveau et de voir si ces cellules pourraient servir comme outil théranostique.

Que ce soit pour le diagnostic ou la thérapie, il est nécessaire de vérifier que ces cellules ne favorisent pas la croissance tumorale une fois administrées *in vivo*, qu'elles soient modifiées ou non. J'ai ainsi évalué l'impact des CSM sur la croissance tumorale.

Enfin, j'ai évalué le tropisme des CSM dans ce modèle après les avoir marquées par des nanoparticules et/ou par le gène rapporteur de la GFP.

## **2 Résultats**

L'évaluation de l'impact des CSM sur les tumeurs a été réalisée dans différents modèles tumoraux avec, dans un premier temps, un modèle de tumeur sous-cutanée ou de métastases pulmonaires de tumeur mammaire murine et, dans un deuxième temps, un modèle de glioblastome humain orthotopique.

### **2.1 Evaluation de l'utilisation des CSM comme outil théranostique dans un modèle de tumeur sous-cutanée ou de métastases pulmonaires.**

Afin d'envisager l'utilisation des CSM comme outil théranostique dans un modèle de tumeur sous-cutanée ou de métastases pulmonaires, nous avons évalué l'impact des CSM sur la croissance et sur l'angiogénèse tumorales mais également leur biodistribution suite à une administration systémique ou intra-tumorale.

Pour cela, nous avons développé des modèles de tumeurs sous-cutanées ou de métastases pulmonaires chez la souris. Une fois les tumeurs établies, les CSMh sont injectées par voie systémique ou intra-tumorale. L'impact sur la croissance tumorale est évalué par bioluminescence ou par mesure physique de la taille tumorale alors que l'angiogénèse est évaluée par fluorescence et par marquage immunohistologique. Enfin, la biodistribution des CSM est évaluée par biologie moléculaire.

Cette étude a fait l'objet d'une publication en 2013 dans le journal Stem Cell Research and Therapy.

# The dual effect of Mesenchymal Stem Cells on tumour growth and tumour angiogenesis

Michelle Keramidas, Florence de Fraipont, **Anastassia Karageorgis**, Anaïck Moisan, Virginie Persoons, Marie-Jeanne Richard, Jean-Luc Coll, Claire Rome

Stem Cell Research & Therapy

RESEARCH

Open Access

# The dual effect of mesenchymal stem cells on tumour growth and tumour angiogenesis

Michelle Kéramidas<sup>1</sup>, Florence de Fraipont<sup>1,2</sup>, Anastassia Karageorgis<sup>1</sup>, Anaïck Moisan<sup>3</sup>, Virginie Persoons<sup>2</sup>, Marie-Jeanne Richard<sup>1,2</sup>, Jean-Luc Coll<sup>1†</sup> and Claire Rome<sup>1\*†</sup>

## Abstract

**Introduction:** Understanding the multiple biological functions played by human mesenchymal stem cells (hMSCs) as well as their development as therapeutics in regenerative medicine or in cancer treatment are major fields of research. Indeed, it has been established that hMSCs play a central role in the pathogenesis and progression of tumours, but their impact on tumour growth remains controversial.

**Methods:** In this study, we investigated the influence of hMSCs on the growth of pre-established tumours. We engrafted nude mice with luciferase-positive mouse adenocarcinoma cells (TSA-Luc<sup>+</sup>) to obtain subcutaneous or lung tumours. When tumour presence was confirmed by non-invasive bioluminescence imaging, hMSCs were injected into the periphery of the SC tumours or delivered by systemic intravenous injection in mice bearing either SC tumours or lung metastasis.

**Results:** Regardless of the tumour model and mode of hMSC injection, hMSC administration was always associated with decreased tumour growth due to an inhibition of tumour cell proliferation, likely resulting from deep modifications of the tumour angiogenesis. Indeed, we established that although hMSCs can induce the formation of new blood vessels in a non-tumoural cellulose sponge model in mice, they do not modify the overall amount of haemoglobin delivered into the SC tumours or lung metastasis. We observed that these tumour vessels were reduced in number but were longer.

**Conclusions:** Our results suggest that hMSCs injection decreased solid tumour growth in mice and modified tumour vasculature, which confirms hMSCs could be interesting to use for the treatment of pre-established tumours.

## Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs), also referred to as stromal progenitor cells, reside in the adult bone marrow, are capable of self-renewal and can be quickly expanded *in vitro*. Under appropriate experimental conditions, MSCs can differentiate into a number of mesodermal cell lineages, including bone, cartilage, stroma, adipose tissue, connective tissue, muscle and tendon [1-3]. MSCs also have immunosuppressive properties that can be exploited for the treatment of autoimmune or graft-versus-host diseases [4].

Moreover, MSCs possess an innate tropism for sites of injury irrespective of tissue or organ type. MSCs have

been shown to specifically home to tumour and metastasis sites in multiple types of cancers [5]. The tropism of MSCs for tumours is thought to be due to a similarity in the factors secreted by wounds and tumours, which has led to the hypothesis that tumours resemble chronic wounds or 'wounds that never heal' [6]. Thus, MSCs have been studied as potential anti-tumour cells and as vehicles for gene therapy [7].

However, the role of native MSCs inside the tumour microenvironment is unclear, and the relationship between MSCs and tumour cells is complicated; MSCs have been linked to contradictory effects on tumour growth [8-11]. This dual influence of MSCs is also present in the angiogenic process. MSCs are capable of inducing neoangiogenesis *in vitro* [12,13] and *in vivo* [14-16]. In addition, they can differentiate into endothelial cells [17,18] and/or pericytes [19]. In some tumour models, grafted MSCs were shown to settle into the tumour

\* Correspondence: Claire.rome@ujf-grenoble.fr

†Equal contributors

<sup>1</sup>Inserm U823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Rond-Point de la Chantourne, Grenoble 38706, France

Full list of author information is available at the end of the article

vessel walls, inducing a pro-angiogenic effect [20] and an increase in tumour growth [21]. In contrast, in other tumour models, MSCs have been reported to abrogate tumour growth by pushing endothelial cells to enter programmed cell death [22].

To clarify this issue, we studied the impact of human mesenchymal stem cells (hMSC) injection on pre-established tumours. We demonstrated that hMSC administration decreases tumour growth when injected systemically or directly in contact with the tumours, suggesting a systemic effect. This effect is clearly correlated with an inhibition of tumour cell proliferation. Furthermore, we established that although hMSCs induced physiological angiogenesis *in vivo*, these cells do not alter the overall pathological angiogenesis of the tumours. However, administration of hMSCs induced significant remodelling of the tumour vasculature. These observations suggest that tumour vasculature normalisation is induced by the presence of hMSCs.

## Materials and methods

### Cell culture

TSA-pGL3 is a cell line derived from the murine mammary adenocarcinoma TS/A-pc cell line comes from spontaneous mammary tumour cells [23] that has been stably transfected with the pGL3-luciferase reporter gene (Promega, Charbonnières, France). Cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator in RPMI 1640 media supplemented with 1% glutamine, 10% foetal bovine serum, 50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 25 µM β-mercaptoethanol and 700 µg/ml Geneticin™ (G418 sulphate; Gibco, Paisley, UK).

hMSCs were isolated from bone marrow aspirates from three healthy donors, each of whom gave informed consent. All the isolation and culture procedures were conducted in the authorized cell therapy unit (Biotherapy Team of the General Clinical Research Center, French Health Minister agreement TCG/04/0/008/AA) at the Grenoble University Hospital. The cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> according to a previously described method [24]. Briefly, hMSCs were selected by plastic adhesion and cultured in Minimum Essential Eagle Medium alpha (MEMα) supplemented with 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10% foetal calf serum (FCS) (all reagents from Invitrogen, Cergy Pontoise, France). All the hMSCs used were phenotyped by FACS analysis and their functionality was tested (colony-forming units and *in vitro* differentiation in adipocyte and osteoblast [24]) (data not shown).

### Cell implantation in mice

All animal experiments were conducted in adherence to the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication no. 86-23, revised 1985)

and approved by the regional ethics committee (Reference number of animal experiments: 96\_IAB-U823 MK-09 and 97\_IAB-U823 MK-08; Comité d'éthique en expérimentation animale de Grenoble: Com-Eth, amended by the Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale (No.12)). Female athymic NMRI nude mice, purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France) at 6 to 8 weeks of age, were maintained under specific pathogen-free conditions. We choose to inject the TSA-pGL3 cell line (1) subcutaneously because it is an easy model to follow and visualize and (2) intravenously to mimic a more physiological lung metastasis model [25] (Figure 1). The subcutaneous (SC) injection of 10<sup>6</sup> TSA-pGL3 cells suspended in 200 µL of PBS into the right flank of mice resulted in the formation of 6 to 8 mm-diameter tumours after one week. Intravenous (IV) injection of 10<sup>5</sup> TSA-pGL3 cells suspended in 200 µL of PBS into the tail vein resulted in tumour lung nodule formation at day 4. At these times, animals were randomised into groups (*n* = 5 per group), and 5 × 10<sup>5</sup> hMSCs were injected subcutaneously at the tumour site or intravenously.

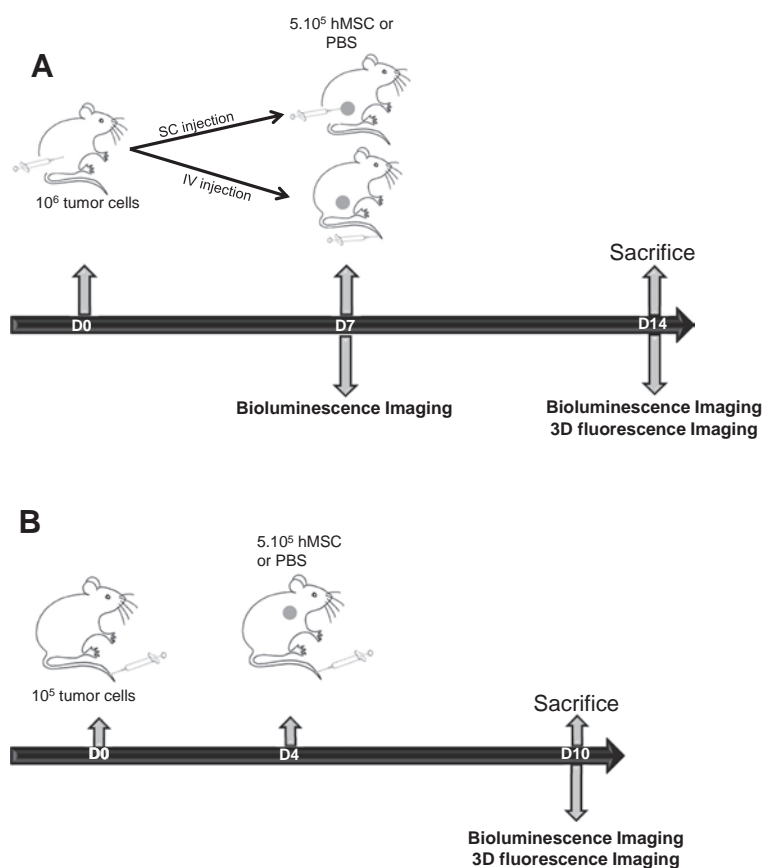
### Mouse subcutaneous sponge angiogenesis assay

Cellspon cellulose sponges (thickness 2 mm, diameter 10 mm, Cellomeda; Turku, Finland) were implanted under the skin of NMRI nude mice [26]. Operations were performed under general anaesthesia induced by intraperitoneal injections of Domitor™ (Pfizer, Orsay, France) and Imalgene™ (Merial, Lyon, France). The sponges were hydrated with 50 µL of PBS or FGF-2 (200 ng/50 µL; FGF-2: recombinant human FGF-basic, Eurobio Abcys S.A., Les Ullis, France), or 10<sup>4</sup> hMSCs were deposited on the sponge surface. Each group contained five mice. For the FGF-2 group, FGF-2 (50 µL) was again injected into the sponges through the skin on day 2 and 3. At 7 days after implantation, the mice were anaesthetised, and the sponges were rapidly excised and photographed. Each sponge was then homogenised in 1 mL RIPA lysis buffer with protease inhibitors, and the supernatants were subjected to haemoglobin quantification using Drabkin's reagent (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), expressed as mg/ml.

### Bioluminescence and three-dimensional fluorescence

#### *in vivo* imaging

All imaging was performed under inhalational anaesthesia (3% isoflurane) and administered to a free breathing mouse using a nose cone. For bioluminescence imaging, mice received an intraperitoneal injection of D-luciferin potassium salt dissolved in sterile phosphate-buffered serum (150 mg/kg) 5 min before imaging (ORCAII-BT-512G, Hamamatsu Photonics, Massy, France), as described previously by Jin *et al.* [27,28]. Semi-quantitative data were obtained from the bioluminescence images by



**Figure 1 Lung metastasis and subcutaneous tumour models. (A)** Subcutaneous tumour model. At day 0, 10<sup>6</sup> TSA-pGL3 cells/200 μL were SC injected (n = 15). At day 7, bioluminescence imaging was performed for the three homogeneous groups. The control group was IV injected with 200 μL of PBS, the hMSCs SC group was peritumourally injected with 5 × 10<sup>5</sup> cells/200 μL PBS and the hMSCs IV group was IV injected with 5 × 10<sup>5</sup> cells/200 μL PBS. At day 14, bioluminescence and three-dimensional fluorescence imaging were performed. The mice were euthanized, their Hb contents were measured, and the tumours were frozen for immunohistological studies. **(B)** Lung metastasis model. At day 0, 10<sup>5</sup> TSA-pGL3/200 μL PBS cells were IV injected (n = 8). At day 4, 200 μL of PBS (control) or hMSCs (5 × 10<sup>5</sup> cells/200 μL PBS) were IV injected. At day 10, bioluminescence and three-dimensional fluorescence imaging were performed. The mice were euthanized, and their Hb contents were measured. Hb, haemoglobin; hMSC, human mesenchymal stem cell; IV, intravenous; PBS, phosphate-buffered saline; SC, subcutaneous; SD, standard deviation; TSA-pGL3, TS/A-pc mouse adenocarcinoma cell line stably transfected with the luciferase reporter gene.

drawing regions of interest on the area to be quantified. Images were acquired as 16-bit TIFF files, which can provide a dynamic of up to 65,535 grey levels. Measurement of the bioluminescence intensities (expressed as the number of relative light units (RLU) per pixel per second for each region of interest (ROI)), were performed using the Wasabi software (Hamamatsu). The colour scale values displayed by the software are adjusted to the indicated maximum values. For the lung metastasis model, because the signal is too low before day 5, bioluminescence signals were measured 10 days after tumour cell injection and quantified at the end of the experiment to determine the effects of hMSCs on tumour growth. For subcutaneous tumours, bioluminescence signals were followed from day 7 (before hMSC injection) to day 14 after tumour cell

implantation, and tumour growth rate was calculated as the ratio of bioluminescence signal between D14 and D7 (D14/D7).

For three-dimensional fluorescence imaging, 200 μL Alexa700-RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub> (50 μM; Angiostamp<sup>TM</sup>; Fluoptics, Grenoble, France), which targets the integrin α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>, was injected intravenously through the tail vein of each mouse. Three-dimensional fluorescence acquisition and quantification were performed 16 h post-injection for the tumour models and 3 h for the sponge model with the continuous-wave fluorescence-enhanced diffuse optical tomography system previously described by Koenig *et al.* [29,30]. fDOT consists of a 690-nm laser source, a CCD camera and a set of filters. The light source is a 35-mW compact laser diode (Power Technology, Little Rock,



AR, USA) equipped with a bandpass interference filter (685AF30OD6; Melles Griot, Albuquerque, NM, USA). The emitted fluorescence is filtered by two 700-nm high-pass colored glass filters (RG9 OD5; Schott, Mainz, Germany) placed in front of a NIR sensitive CCD camera (Hamamatsu Photonics K.K., Japan) mounted with a f/15-mm objective (Schneider Kreuznach, Bad Kreuznach, Germany). The excitation sources described a regular 11 × 11, 2-mm spaced grid (2 × 2 cm<sup>2</sup> field of view) over the region of the mouse where the tumour is implanted. Two scans were successively performed for diffusion and fluorescence. The exposure time was automatically computed at each laser position to use the entire dynamic range of the camera. The two stacks of diffusion and fluorescence images were analysed by the reconstruction algorithm to generate a three-dimensional image [31]. The fDOT principle lies in the ability to both reconstruct fluorescence even in highly heterogeneous-attenuating media and handle complex geometries. The results are presented as a three-dimensional view of the reconstructed area. The reconstructed area is a volume meshed with a 2-mm sample rate in the x and y directions and 1 mm in the z direction (depth) that yields a size of approximately 8 × 10 × 15 voxels and may vary slightly depending on animal thickness. The cross-sections are presented from bottom to top for z = 0 (ventral side) to z = 15 (dorsal side). The superimposition of the reconstructed volumes viewed as a smooth interpolation perspective and positioned on top of the white-light image of the animal allowed for the generation of the final image. The procedure time on a 3-GHz Intel Xeon was 10 min to reconstruct the fluorescence distribution. Each fluorescence reconstruction is presented with the same color scale to allow for visual comparison. The scale is provided in arbitrary units because the tomography produces relative values unless a standard calibration has been performed Keramidas *et al.* [32].

#### **CD31, αSMA and Ki67 immunohistochemistry**

Frozen sections (8 μm) from subcutaneous tumours were fixed in acetone for 10 min. Sections were then washed three times for 5 min each in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and endogenous peroxidases were blocked with 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 20 min. Sections were then sequentially incubated for 1 h with a rat monoclonal anti-CD31 antibody (MEC13.3; 1:500; BD Pharmingen, Pont de Claix, France), rabbit anti-Ki67 (1:100; Abcam, Paris, France) or rabbit anti-alpha smooth actin antibody (αSMA; 1:200; Abcam, Paris, France) and for 1 h with goat anti-rat (1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) or goat anti-rabbit (1:200; Dako, San Antonio, TX, USA) secondary antibodies, as appropriate. Peroxidase activity was revealed using diaminobenzidine tetrachloride as a chromogen (Dako; San Antonio, TX,

USA). Sections were counterstained with haematoxylin and mounted.

Immunohistochemical staining against the endothelial marker CD31 was followed by observation under a low magnification scope (100×) for five fields of view of each tumour (five tumours by condition). Then, vessel length and quantity were measured in each of these areas using ImageJ software [33]. All counts were performed in a blinded manner.

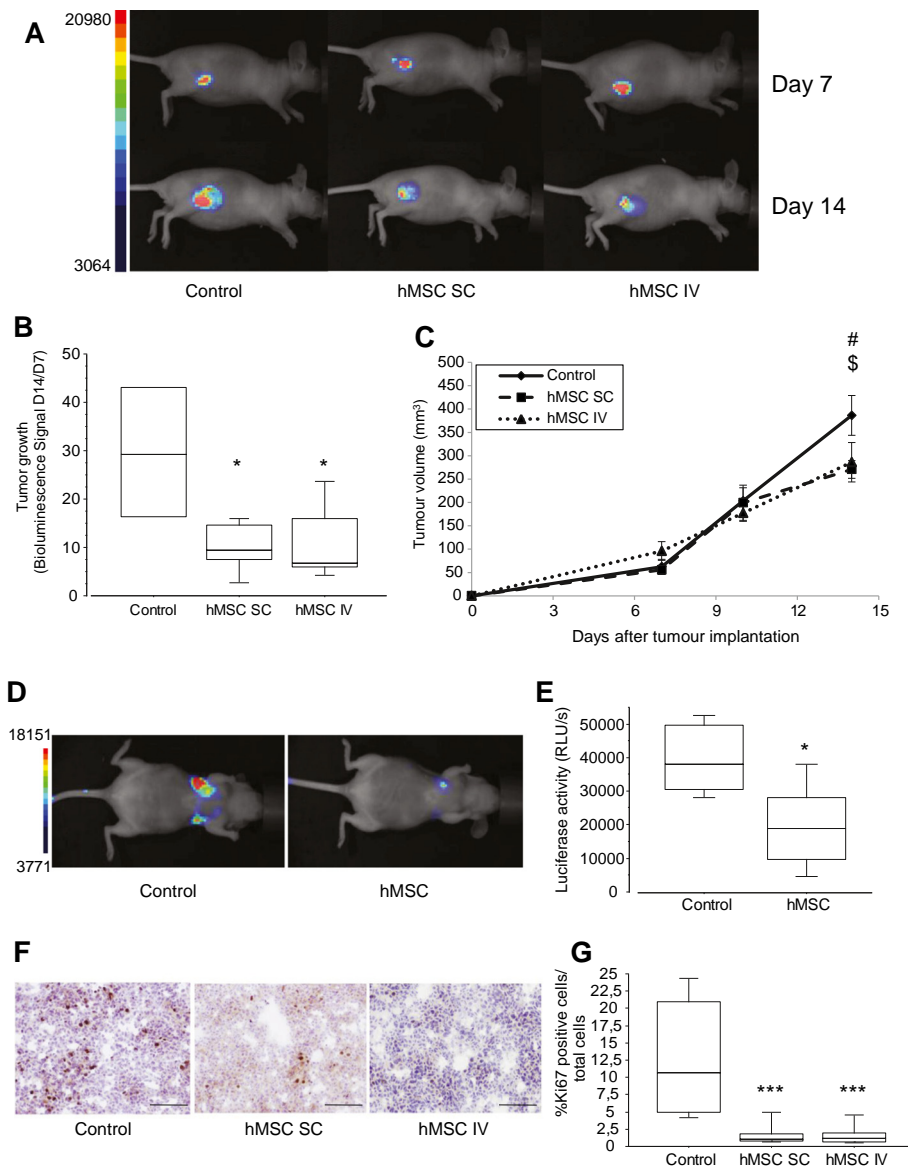
After immunohistochemical staining against Ki67 and αSMA, slides were observed under a high magnification microscope (200×). For Ki67, six to nine areas were photographed for each tumour. For αSMA, two to nine areas were photographed for each tumour. These photographs were analysed using the ImmunoRatio plug-in from ImageJ software [33]. The Ki67 index and the percentage of αSMA positive cells were evaluated in a blinded manner and calculated as the number of positive cells divided by all tumour cells in one field.

#### **RNA isolation and RT-PCR**

Total RNA was extracted from tumours and organs with TRIzol™ (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The total RNA was quantified using a Nanodrop ND-2000 instrument (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) and reverse transcription was performed on 1 μg total RNA with SuperScript III™ RNaseH reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) under the conditions recommended by the manufacturers. Before PCR, quantities of cDNA samples were adjusted to yield equal amplifications of the mRNA encoding the housekeeping gene GAPDH (Forward: ACTCCAATC ACGGCAAATTC, Reverse: TCTCCATGGTGGTGAAG ACA). PCR for GAPDH and human CD90 (Forward: CCAACTTCACCAGCAAATACAA, Reverse: ACTGTGA CGTTCTGGGAGGA) were performed in a final volume of 25 μl containing 1 × PCR buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 400 nM each primer, 0.5 U Taq polymerase (GoTaq™ Hot Start polymerase; Promega, Charbonnières, France). The PCR conditions were: step 1, 95°C for 30 sec, step 2, 62°C for 30 sec, step 3, 72°C for 30 sec. To ensure semi-quantitative results in the RT-PCR assays, the number of PCR cycles was selected to be in the linear range of amplification for each set of primers (n = 30 for GAPDH and n = 35 for hCD90). PCR products were separated and visualised after electrophoresis on 2% agarose gels containing 1 μg/ml ethidium bromide.

#### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using StatView™ (SA, Cary, NC, USA). All results are expressed as the mean ± standard deviation. Comparisons between groups were performed using a two-tailed Student's *t* test. Statistical significance was assumed when *P* < 0.05.



**Figure 2 Effects of hMSCs on tumour growth.** (A) Representative whole-body bioluminescence images of nude mice bearing SC tumours after injection with  $10^5$  TSA-pGL3 cells before hMSC treatment (day 7) and treated with hMSCs ( $5 \times 10^5$  cells; SC or IV injection; day 14) or PBS (control) ( $n = 4$  to 5 mice/group; representative data from one of three different experiments are shown). (B) Box plots of tumour growth in each group. Tumour growth rate was calculated as the ratio of the bioluminescence imaging values obtained at days 14 and 7 (D14/D7) after tumour cell inoculation. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ . (C) The xenograft tumour volumes of the mice were determined at the indicated time points. hMSC were injected at day 7. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. # indicates  $P = 0.01$  by Student's *t* test (control vs. hMSC SC);  $^5$  indicates  $P = 0.07$  by Student's *t* test (control vs. hMSC IV). (D) Representative whole-body bioluminescence images of nude mice bearing lung tumours after IV injection with  $10^5$  TSA-pGL3 cells and hMSC treatment ( $5 \times 10^5$  cells; IV injection; hMSCs) or PBS (control) ( $n = 4$  mice/group). (E) Box plots of bioluminescence imaging results obtained at day 10 after tumour cell inoculation. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ . (F) Photographs of representative SC tumours stained with haematoxylin and a Ki67 antibody at day 14 and visualised at 200 $\times$  magnification. (G) Box plots of Ki67 $^+$  proliferating tumour cells. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  to 9 photographs/tumour; five mice/group; \*\*\* $P < 0.0001$ ). hMSC, human mesenchymal stem cell; IV, intravenous; PBS, phosphate-buffered saline; SC, subcutaneous; SD, standard deviation; TSA-pGL3, TS/A-pc mouse adenocarcinoma cell line stably transfected with the luciferase reporter gene.

## Results

### hMSCs derived from bone marrow inhibit tumour growth *in vivo*

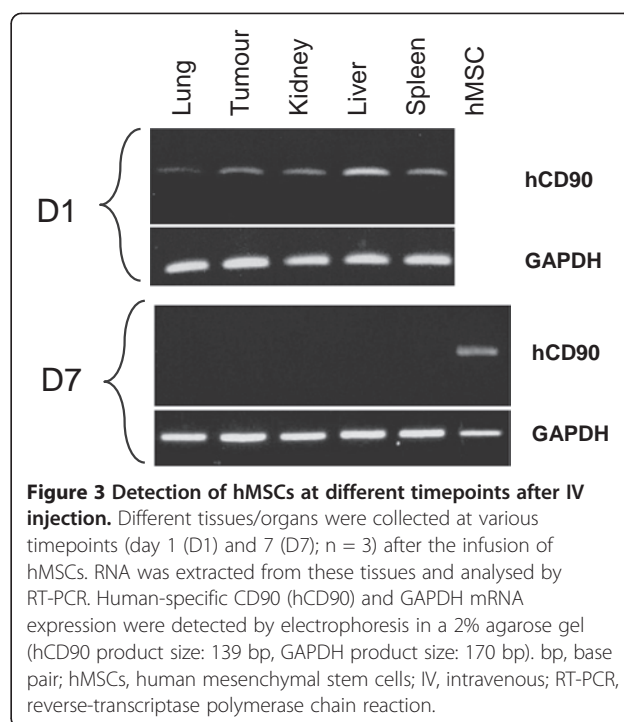
Several reports have indicated that MSCs may influence tumour progression in different tumour types (reviewed by Klopp *et al.* [34]). In the present study, we investigated the effect of systematically or subcutaneously delivered hMSCs on TSA-pGL3 tumours (Figures 1 and 2). First, tumour cells were implanted SC and 7 days later, when tumours were macroscopically detectable, hMSCs were injected IV or SC in the periphery of the tumour (Figure 1A). In the second model, in the lung metastatic model, tumour cells were injected IV, followed by an IV injection of hMSCs 4 days later (Figure 1B). The injection of hMSCs alone did not result in tumour formation (data not shown). Tumour initiation and growth was followed and quantified by non-invasive bioluminescence imaging and calliper when possible (Figure 2A-E). In each tumour model, hMSC administration decreased the tumour growth rate and led to a delay in disease progression. Indeed, as shown in Figure 2B at day 14, bioluminescence rate (D14/D7) within subcutaneous tumours was lower when hMSCs were inoculated near the tumour site (control vs. hMSC SC: 2.88-fold;  $P = 0.03$ ) or by the IV route (control vs. hMSC IV: 2.73-fold;  $P = 0.05$ ). This also corresponded to a slight decrease in tumour volumes (Figure 2C). These results were confirmed by repeating the experiments using hMSCs from two other donors (data not shown).

In the lung metastasis model, at day 10 after IV inoculation with TSA-pGL3 cells, mice also injected with hMSCs exhibited a 2.03-fold ( $P = 0.0264$ ) smaller bioluminescence signal than the control mice (Figure 2D-E).

At day 14, animals were euthanized and the tumours were cryopreserved. Analyses of cell proliferation were performed by Ki67 labelling in sections from subcutaneous TSA-pGL3 (control) and TSA-pGL3 + hMSCs tumours (see Figure 2F-G). In the control tumours,  $12.7 \pm 7.6\%$  of cells were Ki67 positive. The presence of hMSCs dramatically reduced the percentages of Ki67-positive cells, to  $1.9 \pm 1.9\%$  and  $1.7 \pm 1.5\%$ , when hMSCs were injected at the tumour periphery or IV, respectively ( $P < 0.0001$ ). The anti-proliferation effect was not significantly different when the hMSCs were injected systematically or near the tumour site, suggesting that the inhibitory effect of hMSCs on tumour cell growth could be indirect. Indeed, one day after hMSCs IV injection, human CD90 mRNA expression was detected by RT-PCR in different tissues and organs, including subcutaneous tumours (Figure 3), whereas the presence of the human CD90 mRNA was no longer detectable 7 days later.

### hMSCs stimulate *in vivo* angiogenesis

We then hypothesised that the influence of hMSCs on tumour growth was mediated by an indirect effect on

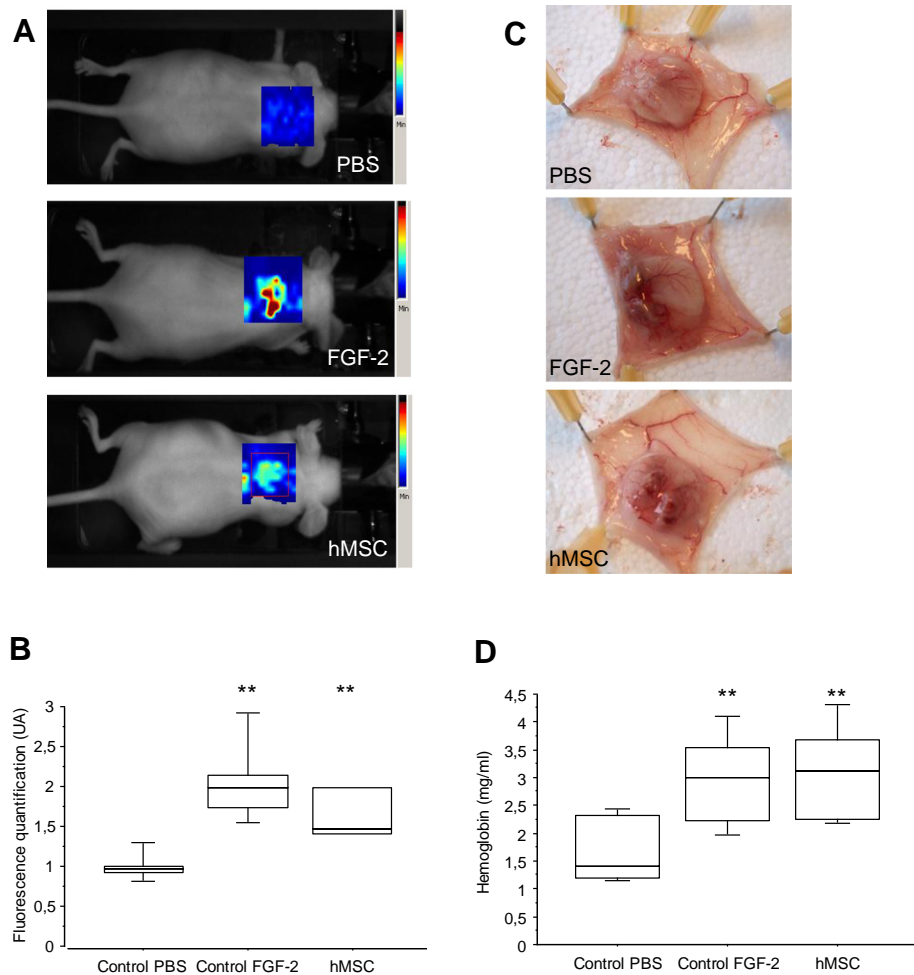


**Figure 3** Detection of hMSCs at different timepoints after IV injection.

Different tissues/organs were collected at various timepoints (day 1 (D1) and 7 (D7);  $n = 3$ ) after the infusion of hMSCs. RNA was extracted from these tissues and analysed by RT-PCR. Human-specific CD90 (hCD90) and GAPDH mRNA expression were detected by electrophoresis in a 2% agarose gel (hCD90 product size: 139 bp, GAPDH product size: 170 bp). bp, base pair; hMSCs, human mesenchymal stem cells; IV, intravenous; RT-PCR, reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

tumour microenvironment and especially on the formation of blood vessels. We thus evaluated the capacity of hMSCs to induce angiogenesis using a mouse subcutaneous sponge assay [35] (Figure 4). When poorly angiogenic cellulose sponges are engrafted under the skin, very few blood vessels were observed seven days after their engraftment (PBS condition), and thus their haemoglobin (Hb) content after dissection was low (1.695 mg Hb/mL). In contrast, in hMSC- or FGF-2-treated sponge implants, a strong angiogenic response was observed, with a large invasion of the sponge by neo-formed blood vessels (Figure 4C).

This effect was quantified (1) by three-dimensional Alexa700-RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub> fluorescence imaging (Figure 4A and 4B) and (2) by measuring the Hb content of the sponges (Figure 4D). The RGD-mediated fluorescence was 1.7-fold higher in sponges containing hMSCs compared to control sponges, suggesting an augmentation of the number of proliferative neo-endothelia known to overexpress the  $\alpha_v\beta_3$  integrin. This pro-angiogenic activity of hMSCs was similar to that obtained after injection of FGF-2 (Figure 4B,  $P > 0.05$ ). Similar results were obtained when we quantified the Hb content in the sponges instead of using the RGD-based assay. Again, hMSC treatment was as pro-angiogenic as FGF-2 treatment ( $3.094 \text{ mg Hb/mL} \pm 0.816$  for hMSCs and  $2.939 \text{ mg Hb/mL} \pm 0.824$  for FGF-2) (Figure 4D). These results confirm the *in vivo* pro-angiogenic potential of hMSCs.



**Figure 4 hMSCs promote angiogenesis in an *in vivo* sponge model.** NMRI nude mice bearing a subcutaneous cellulose sponge treated with PBS (negative control) or FGF-2 (200 ng; positive control) or hMSCs ( $10^4$  cells) under the dorsal skin. **(A)** Representative three-dimensional fluorescence images of mice after IV injection of  $50 \mu\text{M}$  Alexa700-labeled RAFT-c(-RGDfK-) $_4$ . **(B)** Box plot of fluorescence intensity, recorded as photons per pixel for a specified region of interest (ROI). The data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  to  $6$ ). **(C)** Animals were euthanised on day 7, and the sponges were photographed. **(D)** The amount of haemoglobin (Hb) was higher in the FGF-2- and hMSC-treated groups than in the PBS-treated group. The data are expressed as the mean  $\pm$  SD of two experiments (12 mice in each group;  $**P < 0.0007$ ). hMSC, human mesenchymal stem cell; IV, intravenous; PBS, phosphate-buffered saline; SC, subcutaneous; SD, standard deviation.

### hMSC treatment induces profound tumour blood vessel reorganisation

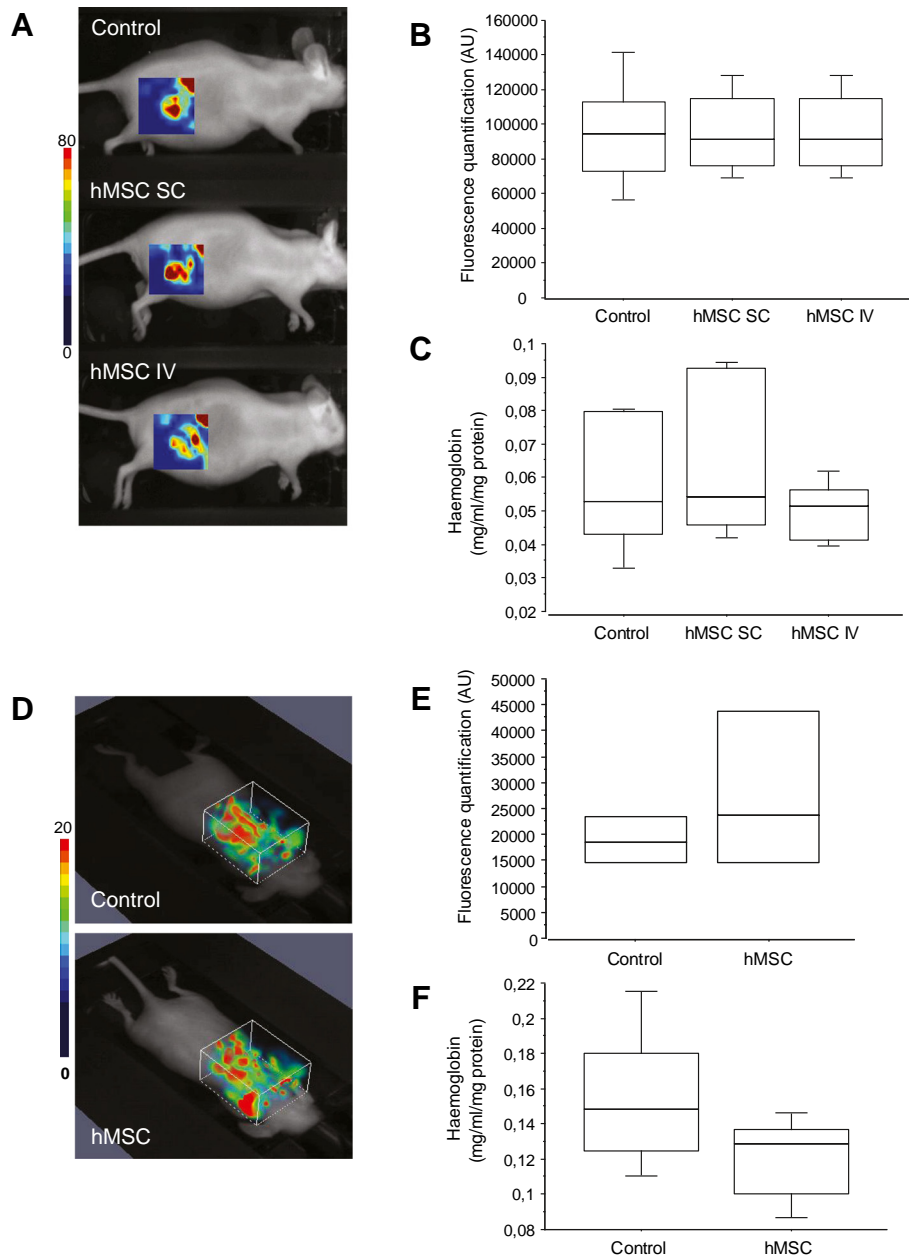
To determine whether the influence of hMSCs on tumour growth could be related to the pro-angiogenic properties of the cells, we evaluated the vascularisation of the tumours after hMSC inoculation.

*In vivo* imaging of subcutaneous or lung tumours using Alexa700-RAFT-c(-RGDfK-) $_4$  was performed (Figure 5A, B, D, E), and we also quantified the Hb content of the tumours after euthanasia (Figure 5C and 5F). No significant difference between mice injected with cancer cells alone or cancer cells and hMSCs was observed in either assay. We also found that the level of mouse CD31 mRNA

expression was not affected by the presence of hMSCs (data not shown). We thus concluded that the treatment of the mice with hMSCs did not modify the overall amount of endothelial cells or the blood content of the tumours.

We then determined whether the vessel structure was different in the presence of hMSCs. Sections of subcutaneous tumours were stained with an antibody directed against CD31 to visualise the blood vessels (Figure 6A, B and C). Blood vessel density and blood vessel length were then quantified. The results of this analysis revealed that vessel area decreased in mice injected with TSA-pGL3 cells and hMSCs (SC ( $P = 0.0016$ ) or IV

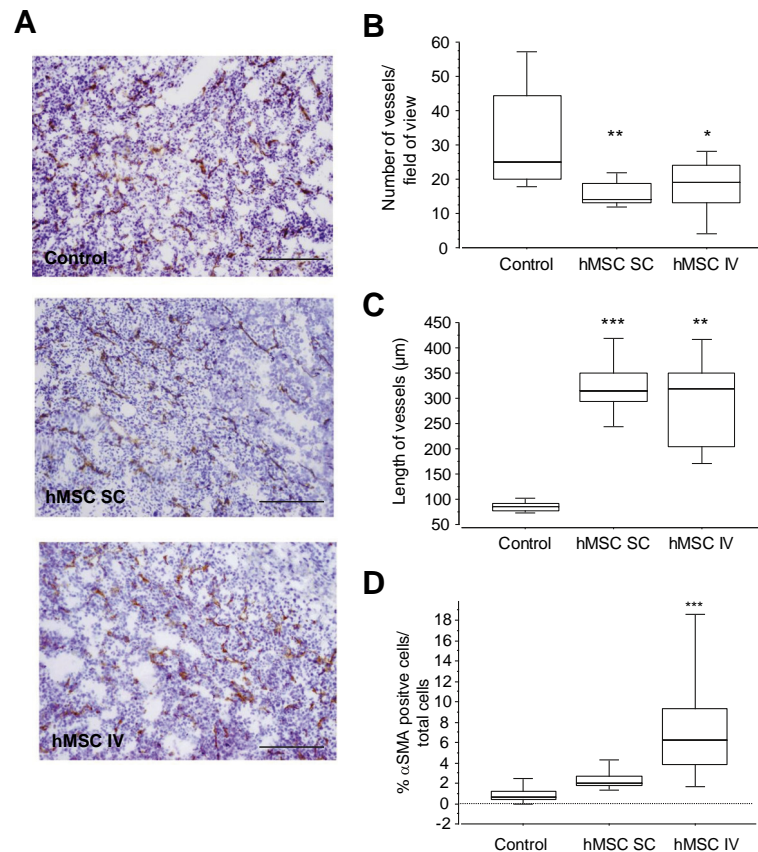




**Figure 5** *In vivo* evaluation of tumour angiogenesis. (A and D) Representative three-dimensional fluorescence images of mice bearing SC tumours (A) or lung tumours (D) treated or not with hMSCs, after IV injection of 50  $\mu$ M Alexa700-labeled RAFT-c(-RGDFK)<sub>4</sub>. (B and E) Box plot of fluorescence intensity, recorded as photons per pixel for a specified region of interest (ROI). The data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n = 4 to 5). (C and F) Amount of haemoglobin (Hb) quantified in subcutaneous (C) or lung (F) tumours. The data are expressed as the mean  $\pm$  SD. hMSC, human mesenchymal stem cell; SC, subcutaneous; SD, standard deviation.

( $P = 0.0125$ )) compared with mice injected with tumour cells alone. We observed not only a decrease in the number of tumour vessels but also an increase in vessel length. Indeed, the median vessel length was 85  $\mu$ m for tumour cells alone and 323  $\mu$ m ( $P < 0.0001$ ) and 290  $\mu$ m ( $P = 0.0016$ ) when hMSCs were injected SC or IV. In addition, analyses of vessel maturation were performed by  $\alpha$ SMA labelling

(pericyte staining) in sections from subcutaneous TSA-pGL3 (control) and TSA-pGL3 + hMSCs tumours (see Figure 6D). In the control tumours,  $1.06 \pm 0.89\%$  of cells were  $\alpha$ SMA positive. The presence of hMSCs increased the percentages of  $\alpha$ SMA-positive cells, to  $2.32 \pm 0.79\%$  ( $P = 0.076$ ) and  $7.55 \pm 4.51\%$  ( $P < 0.0001$ ), when hMSCs were injected at the tumour periphery or IV, respectively.



**Figure 6 hMSCs modify the SC tumour vessel structure. (A)** Images of vessels in TSA-pGL3 tumours in xenograft tumour models with and without injection (SC or IV) of hMSCs after staining with haematoxylin and a CD31 antibody (100× magnification). Scale bar = 200 µm. **(B and C)** Quantitative analyses of vessel density (B) and vessel length (C). The results are expressed as the mean ± SD. (n = 5 mice; six images/mouse; \*P < 0.05, \*\*P = 0.0016, \*\*\*P < 0.0001). **(D)** Box plots of αSMA<sup>+</sup> cells in tumour. The results are expressed as the mean ± SD (n = 2 to 9 photographs/tumour; two to five mice/group; \*\*\*P < 0.0001). hMSC, human mesenchymal stem cell; IV, intravenous; SC, subcutaneous; SD, standard deviation.

Thus, the treatment of tumour-bearing animals with hMSCs does not modify the global number of CD31 and α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>-integrin positive tumour cells, nor does it change the blood content of the tumours, but it does affect the structure and shape of the blood vessels.

## Discussion

Numerous studies have clearly demonstrated that hMSCs can play an important role in cell therapy treatment against cancer. However, the reported results are highly controversial, and hMSC-based treatments are described as both promoting [10,11,21,36,37] and preventing tumour growth [8,38,39]. This dual effect can be observed in the same B16 melanoma model [22,40] and thus does not depend on tumour type. Some discrepancies could also be attributable to differences in the timing of hMSC administration (co-injection versus sequential injection), as suggested by Klopp *et al.* [34]. Indeed, when we subcutaneously co-injected hMSCs and tumour cells, we observed an increase of tumour growth compared to tumour cells alone (data not shown).

In this study, we demonstrated that the systemic or peritumoural injection of hMSCs resulted in a decrease in the pre-established tumour growth in mice using two different tumour models (TSA-pGL3 lung tumours and TSA-pGL3 subcutaneous tumours).

The effect of inhibition on tumour growth is clearly correlated with a decrease in the Ki67 labelling index. Our hypothesis is that this effect could be indirect because we observed the same result when hMSCs are injected by means of the IV route or directly beside the tumour site. Moreover, these results are obtained even when hMSCs are not or only poorly and transiently detected at the tumour site. In our model using nude mice, hMSCs were detected by RT-PCR one day after IV injection in the tumour as well as in the lung, liver and spleen, as previously described [41-44], but were undetectable when the mice were euthanized 7 days later. The tropism of hMSCs for tumours has been described in the literature [45-47] but remains marginal, with only 2% to 5% of injected cells found in the tumour masses [48]. It has been proposed that this tumour-growth

inhibitory effect could be induced by hMSC-secreted soluble factors [9], which could act on tumour cells or on the tumour microenvironment. Prockop and colleagues proposed a model of myocardial infarction in which the action of hMSCs is indirect and related to inflammation. Moreover, the appearance of the hMSCs in the heart was transient and they disappeared by 48 hours [49,50].

Because different studies have demonstrated that MSCs play a role in angiogenesis, we decided to evaluate the influence of hMSCs on tumour angiogenesis. In a first assay, we used an *in vivo* physiological model of angiogenesis based on the introduction of a cellulose sponge template under the skin of the mouse and demonstrated the pro-angiogenic activities of hMSCs. Indeed, the *in vivo* angiogenic effect of hMSCs is as strong as the effect of basic FGF-2. This result was consistent with published data from another angiogenic, but less physiological, model of *in vivo* Matrigel implantation [14-16]. However, the pro-angiogenic activity of hMSCs was not confirmed in a pathological situation such as that in a tumour. Interestingly, the treatment of tumours with hMSCs was not associated with a modification of three-dimensional RGD-based fluorescence imaging or an increasing amount of haemoglobin. Nevertheless, we observed an effect on the tumour vasculature, characterised by a decrease in the number of blood vessels and an increase in the vessel size, leading to a more structured vascular architecture. The key role of hMSCs in regulating vessel maturation and functionality has already been described [51,52]. It is well known that tumours have an abnormal vascular network characterised by dilated, tortuous, and hyperpermeable vessels, and ultimately poor tumour oxygenation [53]. We also observed an increasing of the  $\alpha$ SMA-positive cells in tumours after hMSC injection. It has been shown that pericyte maturation within tumours contributes to vascular normalisation [54]. In parallel, clinical evidence suggests that vascular normalisation occurs in human patients receiving anti-angiogenic agents [55] and that there is synergism between anti-VEGF therapy and systemic chemotherapy [56,57]. It will be interesting to test the injection of hMSCs associated with a conventional chemotherapy in our model. This approach has been evaluated by Pessina *et al.* [58] using MSCs as a vehicle for paclitaxel delivery. These authors observed an inhibition of endothelial cell proliferation *in vitro* and a diminution of B16 tumour growth but did not analyse the structure of the tumour blood vessels.

## Conclusions

In this study, we demonstrated that hMSCs administration decrease pre-established tumour growth, when hMSCs were injected systemically or directly into contact with the tumour. This effect is clearly correlated with an inhibition of tumour cell proliferation. More, whereas we have shown

that the hMSCs induced angiogenesis *in vivo*, these cells do not alter the overall tumour angiogenesis. However, administration of hMSCs induces significant remodelling in tumour vasculature.

In summary, our results confirm that MSCs could be interesting to use for the treatment of pre-established tumours, particularly in combination with other therapies. However, the complex mechanisms of hMSC action remain to be characterised further.

## Abbreviations

FCS: Foetal calf serum; Hb: Haemoglobin; hMSC: Human mesenchymal stem cell; IV: Intravenous; PBS: Phosphate-buffered saline; RT-PCR: Reverse-transcriptase polymerase chain reaction; SC: Subcutaneous; SD: Standard deviation; TSA-pGL3: TS/A-pc mouse adenocarcinoma cell line stably transfected with the luciferase reporter gene.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

MK, FDF, AK and CR were involved in the practical achievement of these experiments. Human stem cells for clinical use were obtained and characterized by AM, VP, FDF and MJR. Collection, analysis and interpretation of the data as well as the redaction were performed by CR, MK, FDF and JLC. Financial and administrative support was carried out by JLC and CR. All authors have read and approved the manuscript for publication.

## Acknowledgements

The authors thank Corinne Lucas and Maxime Billon Grand for technical support. This study was funded by the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (Inserm) and a University Joseph Fourier Grant. Marie-Jeanne Richard was supported by a Grenoble hospital grant for hMSC culture and characterisation.

## Author details

<sup>1</sup>Inserm U823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Rond-Point de la Chantourne, Grenoble 38706, France. <sup>2</sup>UM Biochimie des Cancers et Biothérapies, CHU de Grenoble, Institut de Biologie et Pathologie, Parvis Bellefontaine, Grenoble 38043, France. <sup>3</sup>Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Université Joseph Fourier, Chemin Fortuné Ferrini, Grenoble 38706, France.

Received: 3 October 2012 Revised: 3 February 2013

Accepted: 11 February 2013 Published: 29 April 2013

## References

1. Prockop DJ: **Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.** *Science* 1997, **276**:71-74.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science* 1999, **284**:143-147.
3. Deans RJ, Moseley AB: **Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses.** *Exp Hematol* 2000, **28**:875-884.
4. Le Blanc K, Frassonni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringden O: **Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study.** *Lancet* 2008, **371**:1579-1586.
5. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F: **Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells.** *Gene Ther* 2008, **15**:730-738.
6. Dvorak HF: **Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.** *N Engl J Med* 1986, **315**:1650-1659.
7. Motaln H, Schichor C, Lah TT: **Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies.** *Cancer* 2010, **116**:2519-2530.

8. Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, Ye L, Zhang X: **Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model.** *Cell Res* 2008, **18**:500–507.
9. Li L, Tian H, Chen Z, Yue W, Li S, Li W: **Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells.** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011, **43**:143–148.
10. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA: **Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis.** *Nature* 2007, **449**:557–563.
11. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F: **Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression.** *PLoS One* 2009, **4**:e4992.
12. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H: **Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation.** *J Cell Biochem* 2005, **95**:827–839.
13. Gruber R, Kandler B, Holzmann P, Vogele-Kadletz M, Losert U, Fischer MB, Watzek G: **Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells.** *Tissue Eng* 2005, **11**:896–903.
14. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE: **Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis.** *Stem Cells* 2007, **25**:2648–2659.
15. Al-Khalidi A, Eliopoulos N, Martineau D, Lejeune L, Lachapelle K, Galipeau J: **Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo.** *Gene Ther* 2003, **10**:621–629.
16. Ghajar CM, Kachgal S, Kniazeva E, Mori H, Costes SV, George SC, Putnam AJ: **Mesenchymal cells stimulate capillary morphogenesis via distinct proteolytic mechanisms.** *Exp Cell Res* 2010, **316**:813–825.
17. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C: **Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.** *Stem Cells* 2004, **22**:377–384.
18. Zhang G, Drinnan CT, Geuss LR, Suggs LJ: **Vascular differentiation of bone marrow stem cells is directed by a tunable three-dimensional matrix.** *Acta Biomater* 2010, **6**:3395–3403.
19. Bexell D, Gunnarsson S, Tormin A, Darabi A, Gisselsson D, Roybon L, Scheding S, Bengzon J: **Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas.** *Mol Ther* 2009, **17**:183–190.
20. Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikow AV, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho AD, Giese N, Buchler MW, Friess H, Buchler P, Herr I: **VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma.** *Br J Cancer* 2008, **99**:622–631.
21. Suzuki K, Sun B, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Umezawa A, Kijima H, Fukuda S, Saijo Y: **Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization.** *Mol Med* 2011, **17**:579–587.
22. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J: **Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells.** *Blood* 2009, **113**:4197–4205.
23. Nanni P, de Giovanni C, Lollini PL, Nicoletti G, Prodi G: **TS/A: a new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma.** *Clin Exp Metastasis* 1983, **1**:373–380.
24. Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D, Favrot M, Benhamou PY: **Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro.** *Stem Cells* 2005, **23**:594–603.
25. Meazza R, Lollini PL, Nanni P, De Giovanni C, Gaggero A, Comes A, Cilli M, Di Carlo E, Ferrini S, Musiani P: **Gene transfer of a secretable form of IL-15 in murine adenocarcinoma cells: effects on tumorigenicity, metastatic potential and immune response.** *Int J Cancer* 2000, **87**:574–581.
26. Andrade SP, Machado RD, Teixeira AS, Belo AV, Tarso AM, Beraldo WT: **Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method.** *Microvasc Res* 1997, **54**:253–261.
27. Jin ZH, Josserand V, Razkin J, Garanger E, Boturyn D, Favrot MC, Dumy P, Coll JL: **Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(RGDfK)-4.** *Mol Imaging* 2006, **5**:188–197.
28. Josserand V, Texier-Nogues I, Huber P, Favrot MC, Coll JL: **Non-invasive in vivo optical imaging of the lacZ and luc gene expression in mice.** *Gene Ther* 2007, **14**:1587–1593.
29. Koenig A, Herve L, Gonon G, Josserand V, Berger M, Dinten JM, Boutet J, Peltie P, Coll JL, Rizo P: **Fluorescence diffuse optical tomography for free-space and multifluorophore studies.** *J Biomed Opt* 2010, **15**:016016.
30. Koenig A, Herve L, Josserand V, Berger M, Boutet J, Da Silva A, Dinten JM, Peltie P, Coll JL, Rizo P: **In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography.** *J Biomed Opt* 2008, **13**:011008.
31. Herve L, Koenig A, Da Silva A, Berger M, Boutet J, Dinten JM, Peltie P, Rizo P: **Noncontact fluorescence diffuse optical tomography of heterogeneous media.** *Appl Opt* 2007, **46**:4896–4906.
32. Keramidas M, Josserand V, Feige JJ, Coll JL: **Noninvasive and quantitative assessment of in vivo angiogenesis using RGD-based fluorescence imaging of subcutaneous sponges.** *Mol Imaging Biol* 2012. Epub ahead of print.
33. *ImageJ*. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
34. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F 3rd: **Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?** *Stem Cells* 2011, **29**:11–19.
35. David L, Mallet C, Keramidas M, Lamande N, Gasc JM, Dupuis-Girod S, Plauchu H, Feige JJ, Bailly S: **Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor.** *Circ Res* 2008, **102**:914–922.
36. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K: **Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer.** *Int J Cancer* 2010, **127**:2323–2333.
37. Tsukamoto S, Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Kido A, Mori T, Tsujiuchi T, Tanaka Y: **Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model.** *Int J Oncol* 2012, **40**:163–169.
38. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers TB, Stetler-Stevenson W, Frank JA, Reitz M, Finkel T: **Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma.** *J Exp Med* 2006, **203**:1235–1247.
39. Wei Z, Chen N, Guo H, Wang X, Xu F, Ren Q, Lu S, Liu B, Zhang L, Zhao H: **Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells.** *J Exp Clin Cancer Res* 2009, **28**:141.
40. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Pence P, Jorgensen C, Noel D: **Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells.** *Transplantation* 2006, **82**:1060–1066.
41. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D, Lopez M: **Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment.** *Blood* 2004, **103**:3313–3319.
42. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AL: **The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion.** *Cells Tissues Organs* 2001, **169**:12–20.
43. Kumar S, Ponnazhagan S: **Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression.** *FASEB J* 2007, **21**:3917–3927.
44. Karp JM, Leng Teo GS: **Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:206–216.
45. Wang H, Cao F, De A, Cao Y, Contag C, Gambhir SS, Wu JC, Chen X: **Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging.** *Stem Cells* 2009, **27**:1548–1558.
46. Hung SC, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC, Lin RJ, Yang DM, Chang CW, Chen WH, Wei HJ, Gelovani JG: **Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:7749–7756.
47. Menon LG, Picinich S, Koneru R, Gao H, Lin SY, Koneru M, Mayer-Kuckuk P, Glod J, Banerjee D: **Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells.** *Stem Cells* 2007, **25**:520–528.
48. Albarenek SM, Zwacka RM, Mohr A: **Both human and mouse mesenchymal stem cells promote breast cancer metastasis.** *Stem Cell Res* 2011, **7**:163–171.
49. Prockop DJ, Oh JY: **Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation.** *Mol Ther* 2012, **20**:14–20.
50. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ: **Intravenous hMSCs improve myocardial**



- infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009, **5**:54–63.
51. Sanz L, Santos-Valle P, Alonso-Camino V, Salas C, Serrano A, Vicario JL, Cuesta AM, Compte M, Sanchez-Martin D, Alvarez-Vallina L: **Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels.** *Microvasc Res* 2008, **75**:308–314.
  52. Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK: **Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature.** *Blood* 2008, **111**:4551–4558.
  53. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK: **Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases.** *Physiol Rev* 2011, **91**:1071–1121.
  54. Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, Rigby P, Manzur M, Marti HH, Rabie T, Kaden S, Grone HJ, Hammerling GJ, Arnold B, Ganss R: **Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction.** *Nature* 2008, **453**:410–414.
  55. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, Kozak KR, Cahill DP, Chen PJ, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK: **AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients.** *Cancer Cell* 2007, **11**:83–95.
  56. Willett CG, Duda DG, di Tomaso E, Boucher Y, Ancukiewicz M, Sahani DV, Lahdenranta J, Chung DC, Fischman AJ, Lauwers GY, Shellito P, Czito BG, Wong TZ, Paulson E, Poleski M, Vujaskovic Z, Bentley R, Chen HX, Clark JW, Jain RK: **Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study.** *J Clin Oncol* 2009, **27**:3020–3026.
  57. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzen F, Cassidy J: **Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:2013–2019.
  58. Pessina A, Bonomi A, Cocce V, Invernici G, Navone S, Cavicchini L, Sisto F, Ferrari M, Viganò L, Locatelli A, Ciusani E, Cappelletti G, Cartelli D, Arnaldo C, Parati E, Marfia G, Pallini R, Falchetti ML, Alessandri G: **Mesenchymal stromal cells primed with paclitaxel provide a new approach for cancer therapy.** *PLoS One* 2011, **6**:e28321.

doi:10.1186/scrt195

**Cite this article as:** Kéramidas *et al.*: The dual effect of mesenchymal stem cells on tumour growth and tumour angiogenesis. *Stem Cell Research & Therapy* 2013 **4**:41.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



Cette étude nous a permis d'évaluer trois caractéristiques clefs de l'impact des CSM sur les modèles tumoraux étudiés à savoir leur tropisme tumoral, leur impact sur la croissance tumorale et enfin leur pouvoir pro-angiogénique.

En effet, nous montrons dans cette étude que dans les modèles de tumeurs pulmonaires ou sous-cutanées pré-établis, les CSM administrées par voie intraveineuse ou péri-tumorale ont un tropisme tumoral puisqu'elles sont retrouvées par PCR dans la tumeur 24 heures après leur injection.

De plus, les CSM natives ont, dans nos modèles, un pouvoir anticancéreux puisqu'elles permettent de ralentir significativement la croissance tumorale en diminuant la prolifération cellulaire.

Enfin, nous mettons également en évidence dans cette étude que les CSM ont un impact sur la vascularisation tumorale puisqu'elles améliorent l'architecture vasculaire de la tumeur. Les souris recevant les CSM ont des tumeurs présentant des vaisseaux plus longs et mieux structurés. Or, le manque de structure des vaisseaux sanguins avec des vaisseaux perméables et tortueux pose problème pour acheminer correctement des molécules thérapeutiques au sein de la tumeur. Une possibilité d'utilisation des CSM comme outil dans la prise en charge du cancer serait donc de les utiliser en adjuvant de la chimiothérapie conventionnelle pour améliorer l'acheminement des molécules thérapeutiques au sein de la tumeur.

Ces résultats font des CSM un outil théranostique de choix grâce à leur tropisme naturel pour les tumeurs et à leurs propriétés anti-tumorales associées à une amélioration de l'architecture vasculaire tumorale.

La poursuite de mon projet de thèse a consisté à évaluer l'impact des CSM dans un modèle tumoral difficile d'accès à savoir le glioblastome orthotopique.

## **2.2 Evaluation de l'impact des CSM comme outil théranostique dans un modèle de glioblastome orthotopique**

Le glioblastome est une tumeur cérébrale difficile d'accès de par sa localisation et sa dissémination malgré l'altération de la barrière hémato-encéphalique engendrée par le développement tumoral.

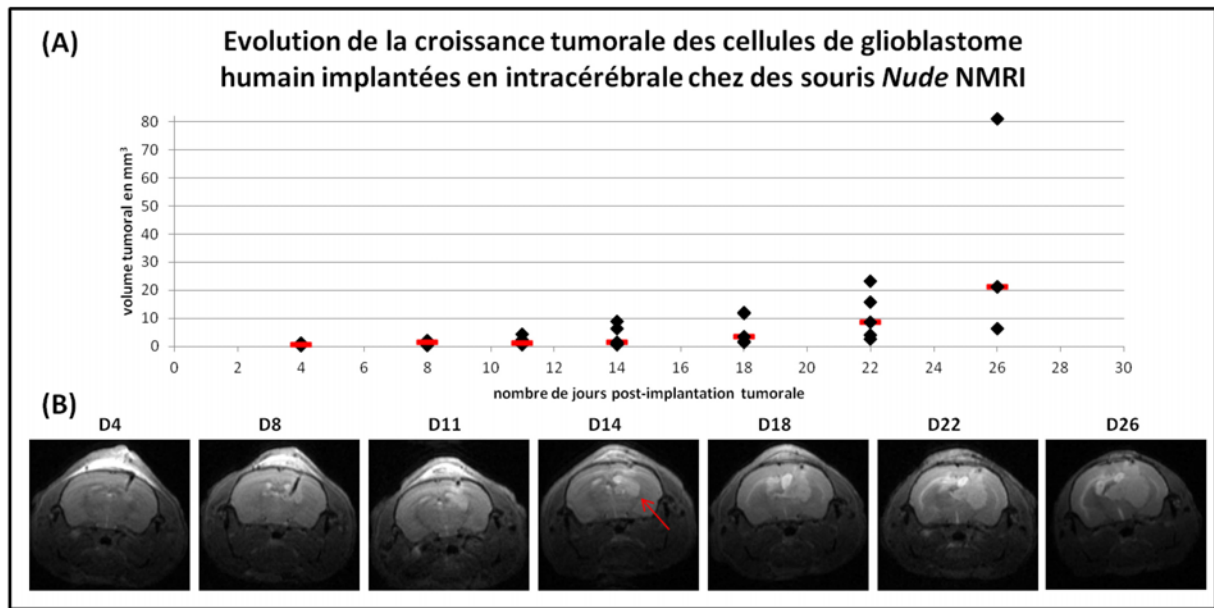
Notre précédente étude ayant mis en évidence un tropisme des CSM envers les tumeurs associé à un ralentissement de la croissance tumorale, nous voulons évaluer la possibilité d'utiliser les CSM comme outil théranostique en étudiant leur impact, selon qu'elles sont modifiées ou non, sur la croissance tumorale ainsi que leur tropisme naturel suite à une administration par voie systémique dans un modèle de glioblastome humain orthotopique implanté chez la souris.

### *2.2.1 Développement du modèle tumoral in vivo de glioblastome orthotopique*

La première partie de l'étude a consisté à développer un modèle de glioblastome humain orthotopique implanté chez la souris et de déterminer à quel moment la tumeur est bien établie afin d'administrer les CSM.

Pour cela, au jour 0,  $10^5$  cellules U87 ou U87-Luciférase+ ont été implantées par stéréotaxie dans le striatum de 6 souris *Nude* NMRI. J'ai suivi la croissance tumorale en réalisant des séquences T2-anat d'IRM 4, 8, 11, 14, 18, 22 et 26 jours après l'implantation des cellules tumorales.

La courbe est pratiquement constante pendant les dix jours suivant l'implantation tumorale puis prend une allure de courbe exponentielle à partir du quatorzième jour. Ainsi, l'administration des CSM se fera au quatorzième jour dans ce modèle tumoral. En effet, à ce moment la tumeur est bien implantée, elle a une taille suffisante pour être facilement observable par IRM ou pour être étudiée sur des coupes histologiques et entre en phase de croissance exponentielle (Figure 22).



**Figure 22 : Développement du modèle de tumeur de glioblastome orthotopique chez la souris *Nude* NMRI**

(A) courbe de croissance des tumeurs de glioblastome orthotopique implantées chez la souris *Nude*. Le volume tumoral est évalué par IRM. Chaque point représente une souris (n=6 souris). La ligne rouge correspond à la médiane. (B) Coupes obtenues sur une séquence anat-T2 d'IRM d'une souris au cours du temps. La flèche rouge indique la tumeur située dans le striatum et apparaissant en signal hypointense (gris clair).

### 2.2.2 *Evaluation de l'impact des CSM modifiées ou non sur la croissance tumorale*

Le suivi des CSM *in vivo* pour une utilisation diagnostique et leur utilisation potentielle comme vecteur thérapeutique nécessite de les modifier soit par un gène thérapeutique soit en les chargeant en nanoparticules. J'ai donc étudié l'impact de la modification des CSM par un gène rapporteur et/ou par des nanoparticules sur la croissance tumorale dans notre modèle.

Enfin, d'après la littérature, la voie d'administration des CSM peut avoir une influence sur les résultats de l'expérimentation. Nous avons donc souhaité évaluer ce paramètre.

#### 2.2.2.1 *Effet des CSM natives sur la croissance tumorale*

Afin d'évaluer l'impact des CSM natives, c'est-à-dire non modifiées, j'ai étudié l'évolution de la croissance des tumeurs U87 implantées en orthotopique chez la souris *Nude* NMRI.

$10^5$  cellules U87 sont implantées en orthotopique en stéréotaxie dans le striatum de 40 souris *Nude* NMRI. La mesure de l'évolution du volume tumoral est réalisée grâce à des séquences anat-T2 d'IRM. La veille du jour de l'injection, une mesure du volume tumoral est réalisée par IRM afin de constituer deux groupes homogènes de souris.

Quatorze jours après l'implantation tumorale, un groupe de souris (n=20) reçoit  $5 \times 10^5$  CSM natives par voie intraveineuse alors que le groupe témoin (n=20) reçoit du PBS. L'évolution du volume tumoral est mesurée sur des séquences T2-anat d'IRM 17, 20, 24, 28 et 31 jours après l'implantation tumorale ce qui correspond à 3, 6, 10, 14 et 17 jours après l'injection des CSM.

Aucune différence significative n'est observable entre les deux groupes de souris. Le grand nombre de souris dans chaque groupe (n=20 souris par groupe) renforce la significativité de ce résultat (Figure 23).

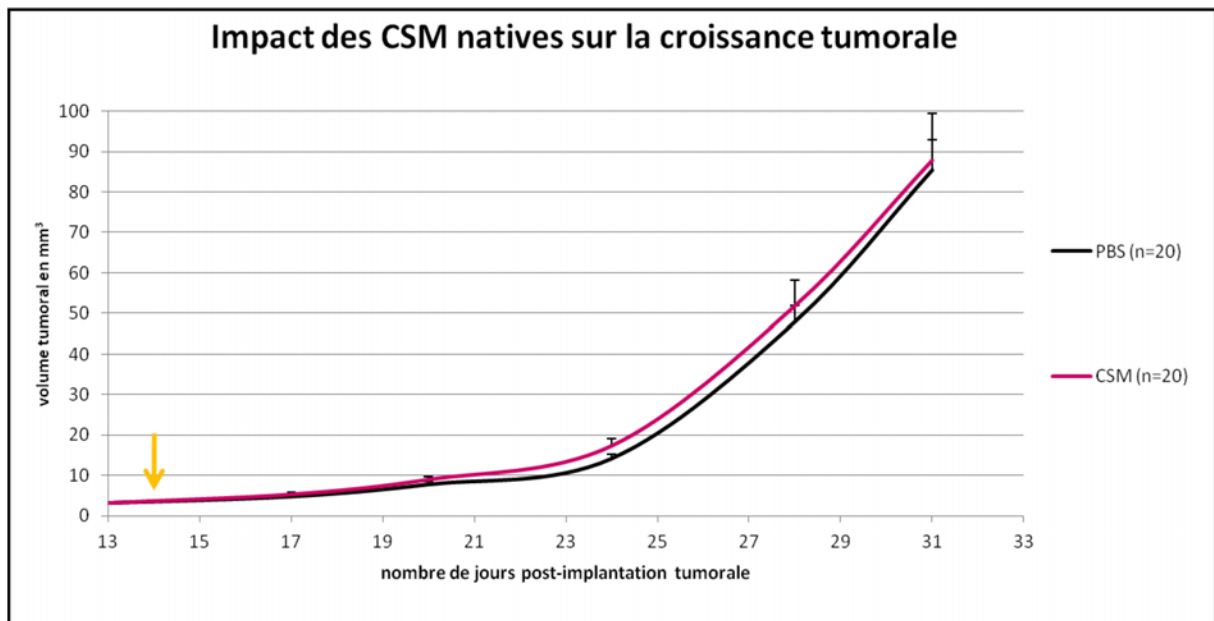


Figure 23 : Effet des CSM natives sur la croissance tumorale

Des CSM natives ont été injectées par voie intraveineuse chez des souris *Nude* porteuses d'un glioblastome orthotopique intracérébral 14 jours après l'implantation tumorale (flèche orange). L'évolution du volume tumoral est évaluée au cours du temps par des séquences T2 d'IRM. 20 souris reçoivent  $5 \times 10^5$  CSM (courbe rose) alors que les 20 souris témoins reçoivent 200 $\mu$ L de PBS (courbe noire).

Cette expérimentation met en évidence que des CSM de passage cellulaire précoce, administrées par voie intraveineuse chez des souris *Nude* porteuses d'un glioblastome orthotopique, n'ont pas d'effet anti-tumoral mais n'entraînent pas non plus une augmentation de la croissance tumorale. Elles peuvent par conséquent être utilisées comme base d'un outil théranostique sans risque de favoriser la croissance tumorale dans ce modèle.

#### 2.2.2.2 Impact de la modification des CSM sur la croissance tumorale

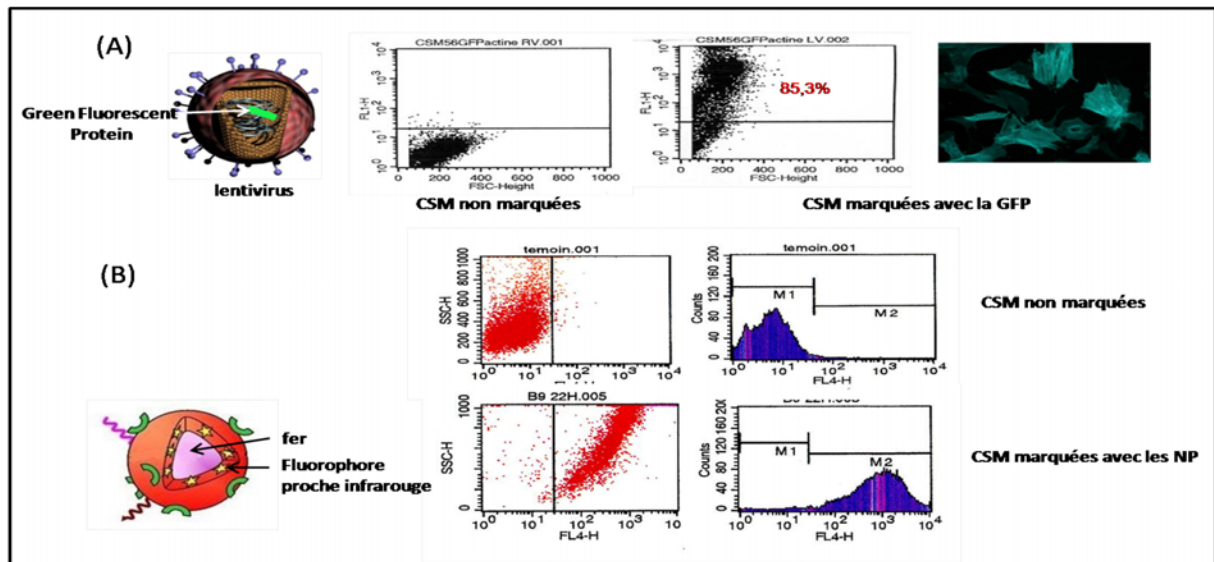
Afin de pouvoir utiliser les CSM comme outil théranostique, nous devons les modifier que ce soit par un gène thérapeutique ou par des nanoparticules. Nous vérifions donc que la modification des CSM n'entraîne pas une augmentation de la croissance tumorale.

#### 2.2.2.2.1 Marquage des CSM

Les CSM sont des cellules difficilement marquables par des techniques classiques telles que la transfection cellulaire avec un agent transfectant cationique. D'après la littérature, la méthode la plus performante est d'avoir recours à des virus tels que les adéno- ou les lentivirus afin de pouvoir les modifier génétiquement de manière stable.

Ainsi, j'ai marqué de manière stable les CSM avec le gène rapporteur GFP visible en microscopie de fluorescence *ex vivo*. Ceci me permet d'évaluer la présence ou non de CSM dans des coupes tumorales *ex vivo*, par imagerie ou par biologie moléculaire même si les CSM sont en cours de différenciation cellulaire. Pour cela, j'ai utilisé des lentivirus de troisième génération qui permettent d'obtenir une bonne sécurité biologique grâce à l'absence des éléments nécessaires à la réplication virale. Ces lentivirus m'ont permis de transduire les CSM avec le gène de fusion Actine-GFP sous le contrôle du promoteur CMV comme le montre la fluorescence cellulaire émise par la GFP en microscopie (excitation 488nm) deux semaines après l'infection. L'évaluation du marquage des CSM a été réalisée par cytométrie en flux. Le marquage avec la GFP grâce aux lentivirus de troisième génération nous a permis d'obtenir 85,3% de marquage ce qui est très bien pour des cellules souches. Cette proportion de marquage est en accord avec celle observée par microscopie de fluorescence sur microscope inversé.

Par ailleurs, afin de pouvoir suivre la distribution des CSM *in vivo* après leur administration systémique en utilisant des outils d'imagerie non invasive tels que l'imagerie optique de fluorescence adaptée à la visualisation du corps entier chez le petit animal ou l'imagerie par résonance magnétique adaptée à la clinique humaine, j'ai marqué les CSM avec des nanoparticules Bangs qui sont constituées d'un cœur d'oxyde de fer visible par IRM et contiennent un fluorophore proche-infrarouge détectable en fluorescence *in vivo*. L'efficacité et la stabilité de ce double marquage ont été vérifiées en cytométrie en flux ainsi que par imagerie de fluorescence *ex vivo* (excitation 660nm) d'une goutte de 10 $\mu$ L contenant 25 000 CSM marquées. Vingt-deux heures après la modification des CSM par des nanoparticules (temps correspondant au moment d'injection des CSM dans nos expérimentations), 82,5% des CSM sont marquées et la fluorescence est bien visible (Figure 24).



**Figure 24 : Marquage des CSM avec la GFP et avec des NP**

(A) Les CSM sont infectées avec un lentivirus porteur de GFP. La proportion de cellules marquées est évaluée par cytométrie en flux. Les CSM marquées sont observées en microscopie de fluorescence. (B) Les CSM sont marquées par incubation avec des nanoparticules de fer marquées avec un fluorophore proche-infrarouge. L'efficacité de marquage est évaluée par cytométrie en flux. Adaptée de Pr Stéphane Roux (Besançon, France)

#### 2.2.2.2.2 Impact des CSM modifiées avec un gène rapporteur sur la croissance tumorale

Afin d'évaluer l'impact des CSM modifiées par un lentivirus, j'ai administré des CSM modifiées avec le gène rapporteur de la GFP dans notre modèle de glioblastome humain orthotopique implanté chez la souris et évalué la croissance tumorale.

Des cellules de glioblastome humain U87 sont implantées en stéréotaxie en intracérébrale chez les souris *Nude* NMRI (n=19). Le suivi de l'évolution tumorale est réalisé par IRM avec des séquences anat-T2.

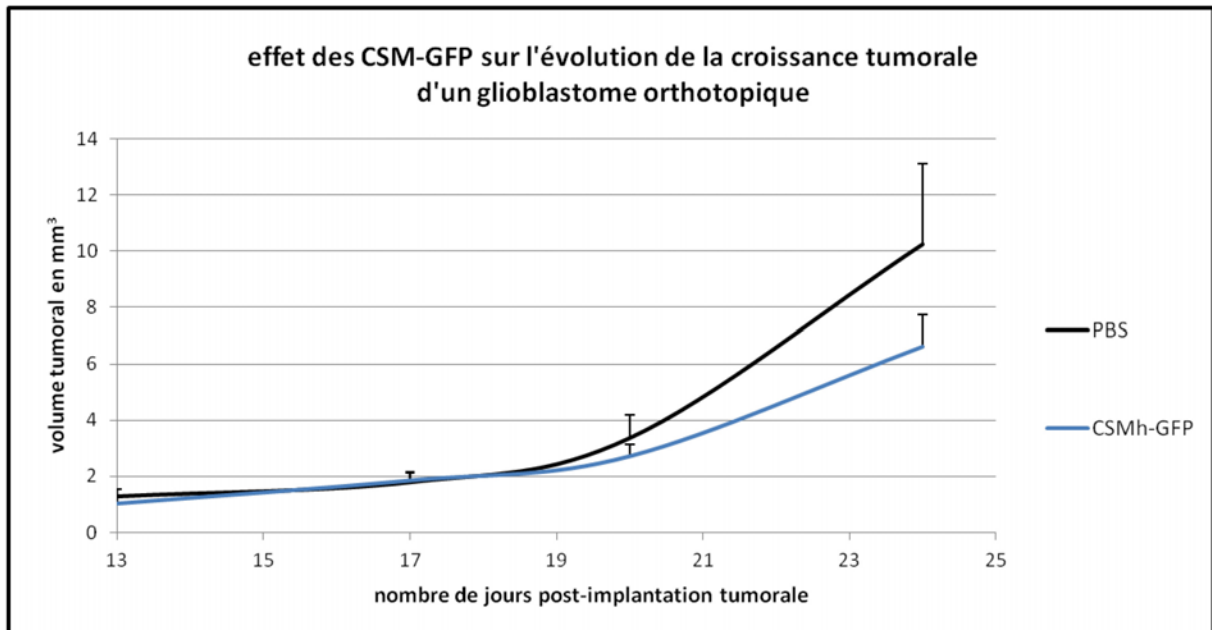
Les CSM sont marquées avec le gène de fusion Actine-GFP sous contrôle d'un promoteur CMV. Treize jours après l'implantation tumorale, les volumes tumoraux sont mesurés par IRM et deux groupes homogènes de souris sont constitués.

Le lendemain, les souris reçoivent des injections intraveineuses de  $5 \times 10^5$  CSM-GFP (n=15 souris) ou de PBS pour le groupe témoin (n=14 souris).

Le volume tumoral est mesuré par IRM 3, 6 et 10 jours après l'administration des CSM.

Chaque jour de mesure du volume tumoral, des souris de chaque groupe sont sacrifiées afin de pouvoir faire des analyses histologiques au cours du temps. Ainsi, le nombre de souris par groupe diminue, avec à la fin de l'expérimentation n=9 souris pour le groupe témoin et n=12 souris pour le groupe traité.

Les résultats obtenus ne mettent pas en évidence de différence significative entre les volumes tumoraux des deux groupes (Figure 25).



**Figure 25 : Effet des CSM marquées avec la GFP sur la croissance tumorale**

Suivi par séquence T2 d'IRM de l'évolution de la croissance tumorale d'un glioblastome humain orthotopique implanté chez des souris *Nude*. 14 jours après l'implantation tumorale, 14 souris reçoivent  $5 \times 10^5$  CSM marquées à la GFP (bleu) injectées par voie intraveineuse alors que le groupe témoin (n=15souris) reçoit 200 $\mu$ L de PBS (noir).

Nous pouvons retenir que les CSM modifiées avec la GFP par des lentivirus ne favorisent pas la croissance tumorale dans ce modèle mais en plus elles auraient une tendance anti-tumorale bien que ce résultat ne soit pas statistiquement significatif.

#### 2.2.2.2.3 Impact des CSM modifiées avec un gène rapporteur et avec des nanoparticules sur la croissance tumorale

L'utilisation des CSM comme outil théranostique peut faire appel à une modification par un gène thérapeutique mais également à l'utilisation de nanoparticules. De plus, le marquage des CSM avec des nanoparticules qui fluorescent dans le proche-infrarouge ( $> 700$  nm) permettrait d'évaluer leur biodistribution *in vivo*, ce qui n'est pas le cas des marqueurs de type « GFP » même très décalés dans le rouge.

Cependant, il est primordial de vérifier que la méthode de marquage des CSM modifiées par un gène rapporteur et par des nanoparticules ne perturbe pas la fonction des CSM et ne favorise pas l'augmentation de la croissance tumorale.



Pour évaluer cela, j'ai implanté  $10^5$  cellules U87-luciférase+ en intracérébrale en stéréotaxie dans le striatum chez des souris *Nude* NMRI (n=16 souris). Les cellules cancéreuses étant modifiées de façon stable avec le gène de la luciférase, le suivi de la croissance tumorale est réalisé par bioluminescence après injection intra-péritonéale de luciférine.

Les CSM sont modifiées avec le gène de fusion Actine-GFP sous le contrôle d'un promoteur CMV et avec des nanoparticules.

13 jours après l'implantation tumorale, la bioluminescence est mesurée et deux groupes homogènes de souris sont constitués. Le lendemain, le premier groupe de souris reçoit 200 $\mu$ L de nanoparticules seules par voie intraveineuse (n=8 souris) ; il s'agit du groupe témoin. Le deuxième groupe reçoit  $5 \times 10^5$  CSM-GFP-NP par voie intraveineuse (n=8 souris).

La croissance tumorale est évaluée par bioluminescence 2, 5 et 9 jours après l'administration des CSM-GFP-NP.

La comparaison des deux groupes de souris indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les volumes tumoraux du groupe de souris traité par CSM-GFP-NP et le groupe témoin. Cependant, même si cette différence n'est pas significative, nous retrouvons la même tendance que celle observée dans les expérimentations précédentes à savoir que les souris recevant les CSM auraient tendance à présenter un ralentissement de la croissance tumorale dans notre modèle de glioblastome orthotopique (Figure 26).

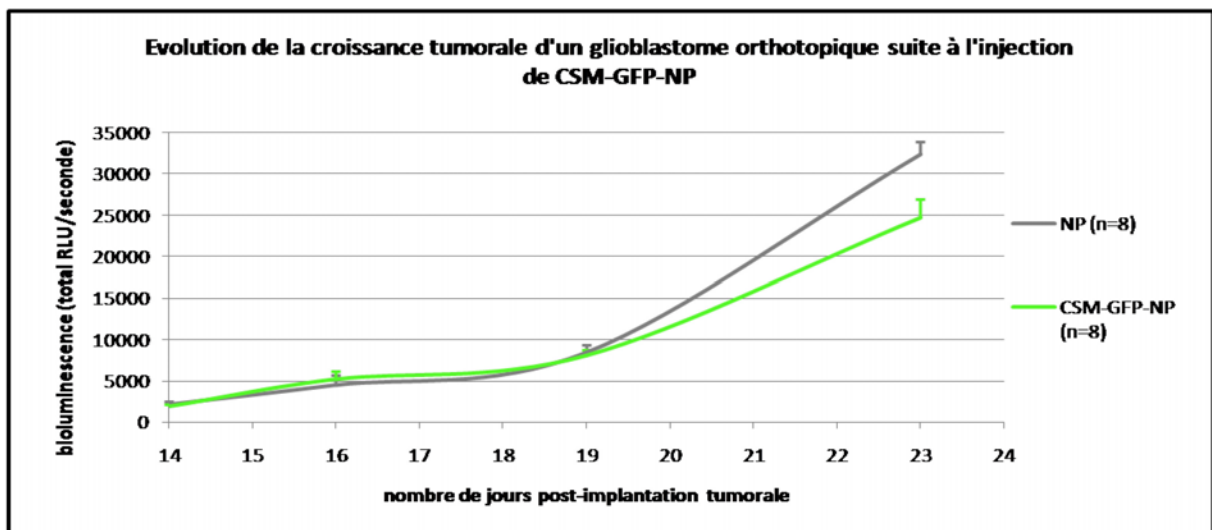


Figure 26 : Impact des CSM marquées avec la GFP et avec des nanoparticules sur la croissance d'un glioblastome orthotopique

$5 \times 10^5$  CSM marquées avec la GFP et par des nanoparticules ont été injectées par voie intraveineuse chez des souris *Nude* xéno greffées avec des cellules de glioblastome humain exprimant la luciférase (U87-Luc) implantées en orthotopique. Evaluation par bioluminescence de la croissance tumorale des tumeurs U87-Luciférase+ chez les souris recevant les CSM-GFP-NP (courbe verte) en comparaison avec le groupe témoin recevant des NP seules (courbe grise).

Ce résultat met en évidence l'intérêt des CSM comme outil théranostique dans la prise en charge du cancer puisqu'elles peuvent être modifiées et administrées par voie systémique sans favoriser la croissance tumorale voire même en la ralentissant.

#### 2.2.2.2.4 Impact de la voie d'administration des CSM sur la croissance tumorale

La voie d'administration des CSM peut théoriquement avoir un rôle important dans l'impact des CSM sur la croissance tumorale. En effet, la circulation vasculaire cérébrale fait que des CSM administrées par voie intra-artérielle pourraient atteindre plus facilement et en plus grande quantité la tumeur cérébrale que par la voie intra-veineuse, en s'affranchissant de la filtration pulmonaire.

Ainsi,  $10^5$  cellules de glioblastome humain U87-Luciférase+ sont implantées en stéréotaxie en intracérébrale dans le striatum des souris (n=19). L'évolution du volume tumoral au cours du temps est évaluée par bioluminescence.

Les CSM sont marquées avec le gène rapporteur de la GFP sous contrôle d'un promoteur CMV puis avec des nanoparticules Bangs. Les CSM-GFP-NP sont donc doublement marquées. La veille du jour de l'injection, la mesure de bioluminescence de toutes les souris permet de constituer quatre groupes homogènes de souris. Cinq souris reçoivent  $5 \times 10^5$  CSM-GFP-NP par voie intraveineuse et cinq souris les reçoivent par voie intra-artérielle par injection dans la carotide interne. Quant aux souris témoins, trois souris reçoivent les NP seules par voie intra-veineuse et trois souris par voie intra-artérielle.

La bioluminescence est mesurée 2, 5, 7, 9 et 12 jours après l'administration des CSM soit 16, 19, 21 et 26 jours après l'implantation tumorale. En ce qui concerne les souris ayant reçu les injections intra-artérielles, l'expérimentation a été arrêtée 21 jours après l'implantation tumorale. En effet, les souris sont sacrifiées lorsque les considérations éthiques le nécessitent (perte de poids supérieure à 10% ou comportement stressé de la souris). Or, les souris ayant reçu les injections intra-artérielles ont nécessité un geste chirurgical lourd au moment de l'injection avec une injection dans la carotide interne nécessitant de sacrifier la vascularisation externe. C'est pourquoi l'altération de l'état général associée à l'importante augmentation du volume tumoral, probablement due à l'hypoxie cérébrale partielle, a entraîné leur sacrifice précoce.

Le graphique (Figure 27) représente l'évolution de la croissance tumorale au cours du temps. L'importance de l'écart-type pour les souris témoins recevant des nanoparticules (NP) en intra-artérielle illustre bien la perturbation métabolique engendrée chez ces souris donnant des résultats très disparates d'une souris à l'autre.

En ce qui concerne les souris recevant les injections par voie intra-veineuse, il n'y a pas de différence significative entre le volume tumoral des souris témoins et celui des souris traitées par des CSM-GFP-NP même si les CSM ont, comme dans nos précédentes expériences dans ce modèle, une tendance à ralentir la croissance tumorale.

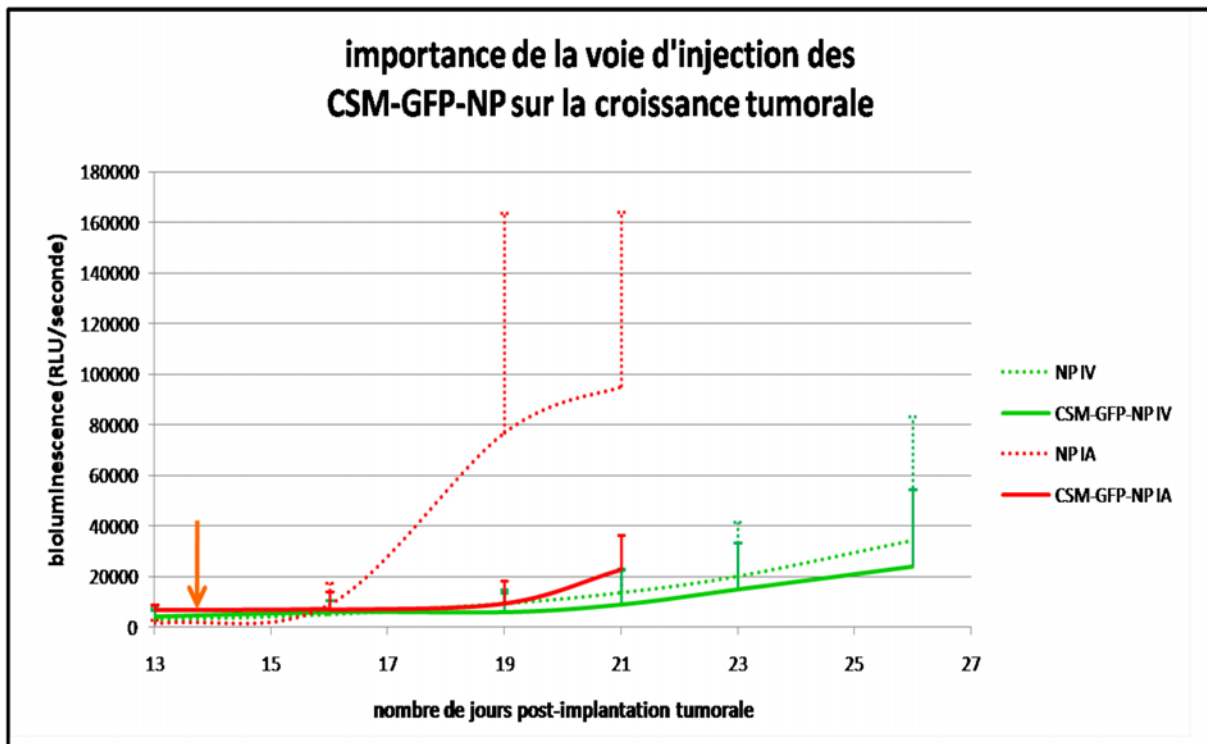


Figure 27 : Evaluation de l'impact de la voie d'administration des CSM sur la croissance tumorale

14 jours après implantation de  $10^5$  cellules de glioblastome humain U87-luciférase en orthotopique intracérébrale (flèche orange),  $5 \times 10^5$  CSM marquées avec la GFP et des NP sont administrées par voie intraveineuse (ligne verte continue) ou par voie intra-artérielle dans la carotide interne (ligne rouge continue). Les souris témoins reçoivent des NP par voie intraveineuse (ligne verte pointillée) ou par voie intra-artérielle (ligne rouge pointillée). La croissance tumorale est suivie par mesure de la bioluminescence *in vivo*.

Bien que l'injection par voie intra-artérielle permette de s'affranchir de la filtration pulmonaire, la voie d'administration intraveineuse est la voie de prédilection dans notre modèle de tumeur de glioblastome orthotopique. En effet, l'hypoxie cérébrale due à l'injection intra-artérielle entraîne la mort prématurée des animaux avec un volume tumoral beaucoup plus important que lors d'un traitement par voie intra-veineuse.

### 2.2.3 *Evaluation du tropisme tumoral naturel des CSM*

Afin de pouvoir utiliser les CSM comme outil théranostique, il est nécessaire d'évaluer leur tropisme tumoral c'est-à-dire d'évaluer la proportion de CSM arrivant à la tumeur après injection par voie systémique.

Pour cela, au jour 0, j'ai implanté  $10^5$  cellules de glioblastome humain (U87) en stéréotaxie dans le striatum des souris *Nude* NMRI (n=40).

Les CSM humaines ont été marquées avec le gène rapporteur de la GFP en utilisant des lentivirus de troisième génération.

Quatorze jours après l'implantation tumorale, j'ai injecté  $5 \times 10^5$  CSM-GFP par voie intraveineuse à un groupe de souris (n=20). Le deuxième groupe (n=20), témoin, n'a reçu que du PBS. Pour évaluer la biodistribution au cours du temps, des groupes de trois souris traitées et trois souris témoins ont été sacrifiés 3, 7, 10, 14, 15 et 19 jours après administration des CSM. Les souris sont sacrifiées par remplacement du sang par du PBS injecté en intracardiaque suivi de l'administration de PFA 4%. Des coupes histologiques flottantes de  $10 \mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées au cryomicrotome puis sont montées sur des lames pour être observées au microscope de fluorescence à 488nm afin d'observer la GFP. L'observation microscopique a été réalisée en aveugle.

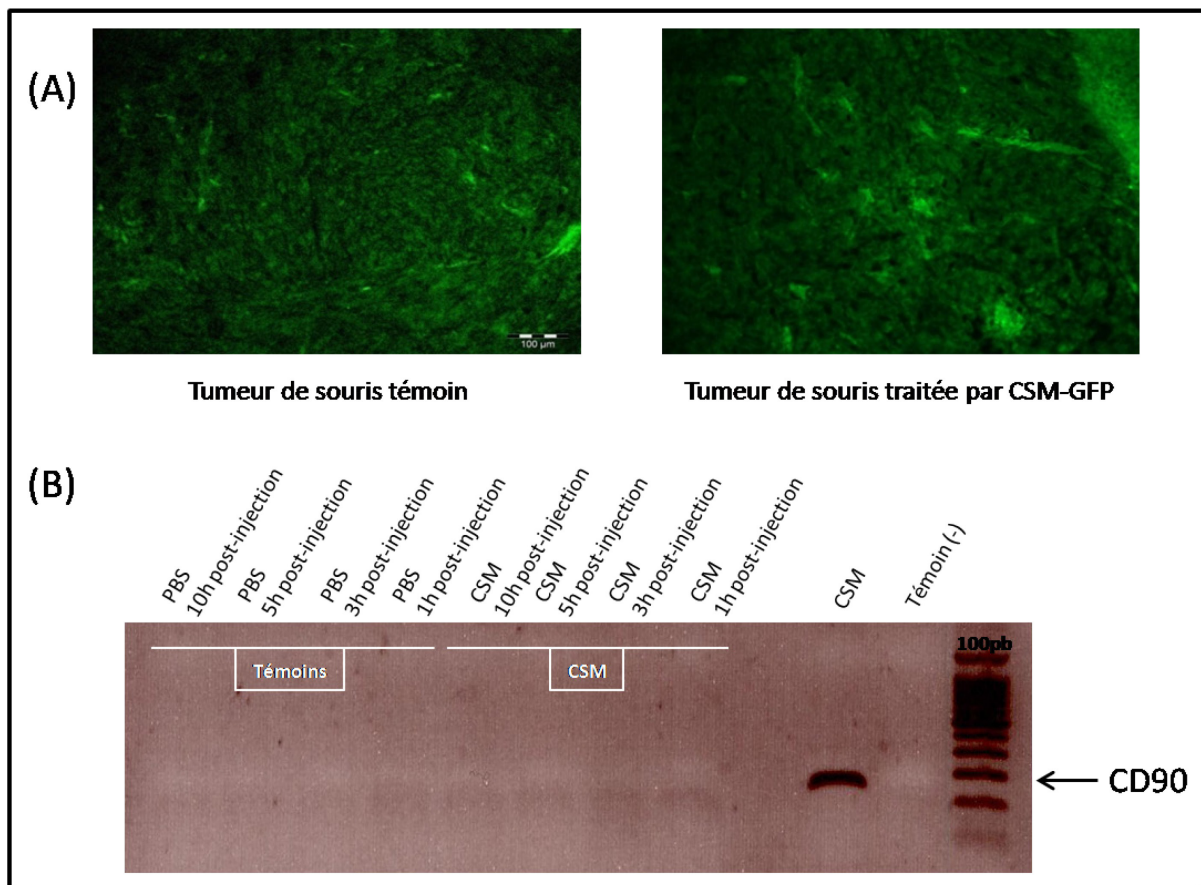
D'après l'observation visuelle, le moment du sacrifice, entre trois et dix-neuf jours suivant l'administration de CSM importe peu, les souris ayant reçu des CSM ont légèrement plus de signal « vert » que les souris témoins. Ce résultat indiquerait que les CSM sont bien présentes dans la tumeur et que le signal des souris témoins correspond à l'autofluorescence du tissu (Figure 28 A).

L'analyse spectrale a été réalisée sur les coupes afin de s'assurer que ce signal « vert » correspond bien à celui de la GFP. Le résultat a révélé que ce n'était pas le cas et que le signal détecté ne correspond pas à l'émission de la GFP mais plutôt à de l'autofluorescence du tissu tumoral. Nous n'avons donc jamais pu détecter la présence de CSM-GFP par cette méthode mais nous n'expliquons pas pourquoi le signal d'autofluorescence est plus important dans tous les animaux traités par les CSM-GFP.

Afin d'augmenter la sensibilité de détection des CSM au sein de la tumeur et d'avoir une vue plus exhaustive de l'ensemble de la tumeur, j'ai réalisé des PCR sur les tumeurs en recherchant la présence du marqueur CD90 qui est un marqueur spécifique des cellules souches humaines.

Pour cette expérimentation, les souris ont été sacrifiées dans des temps précoces suivant l'administration des CSM à savoir 1h, 3h, 5h et 10h après l'injection par voie intraveineuse. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, les tumeurs sont prélevées puis broyées puis l'ADN génomique des cellules est extrait. Enfin la PCR est réalisée avec des amorces CD90.

D'après nos résultats nous ne visualisons pas de CSM dans nos échantillons avec cette méthode (Figure 28 B), en accord avec les précédents résultats obtenus en GFP.



**Figure 28 : Evaluation du tropisme tumoral des CSM**

(A) Des coupes histologiques de tumeurs de glioblastome ont été observées par microscopie de fluorescence pour évaluer la présence de GFP spécifique des CSM. Un signal vert de fluorescence est présent de façon plus importante chez les souris traitées. Cependant, l'analyse spectrale indique que ce signal ne correspond pas à la GFP mais à de l'autofluorescence du tissu. (B) Le tropisme tumoral des CSM administrées en IV chez des souris porteuses d'un glioblastome orthotopique est évalué par PCR en évaluant la présence du marqueur CD90.

En conclusion, bien que chaque expérimentation ait mis en évidence une tendance des CSM à ralentir de manière non-significative la croissance tumorale, nous ne mettons pas en évidence de tropisme tumoral des CSM dans ce modèle de glioblastome humain orthotopique implanté chez la souris.

### 3 Discussion

L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses comme base d'outil théranostique nécessite de démontrer leur capacité éventuelle à cibler les tumeurs, leur activité anti- ou pro-tumorale, et enfin que l'on puisse si nécessaire les « armer » soit avec un gène d'intérêt thérapeutique soit avec des nanoparticules. L'internalisation de nanoparticules permettrait de bénéficier des propriétés biophysiques des nanoparticules théranostiques que ce soit pour améliorer le diagnostic ou la thérapie. Cependant, il est clair que si l'objectif est d'obtenir un marquage stable, il sera préférable d'utiliser une méthode d'introduction stable d'un transgène dans les CSM.

Concernant les cellules souches, toute modification peut s'avérer complexe car d'une part elles sont difficiles à transfecter par des méthodes chimiques telles que la transfection par un agent cationique et, d'autre part, toute modification pourra modifier leurs propriétés.

Ainsi, j'ai évalué dans ce projet deux méthodes de marquage des CSM avec d'une part des nanoparticules et d'autre part un gène rapporteur, la GFP.

Je montre dans cette étude que les CSM peuvent être efficacement marquées par des nanoparticules. L'internalisation des nanoparticules se fait par endocytose suite à leur incubation dans le milieu de culture des CSM. Cette méthode est très efficace puisque vingt-deux heures après le marquage, plus de 80% des CSM sont marquées. De plus, les nanoparticules utilisées ont une taille suffisamment petite pour être facilement endocytées et suffisamment grande pour être retenues à l'intérieur de la cellule ce qui permet l'obtention d'un marquage stable.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par le groupe de Roger et al. qui a montré que l'efficacité de marquage des CSM dépend principalement du temps d'incubation. Ils obtiennent ainsi plus de 95% de CSM marquées. La stabilité de marquage dépend, quant à elle, du type de nanoparticules. Ainsi, ils mettent en évidence que le marquage des CSM avec des LNC (NanoCapsules Lipidiques) diminue de 50% au bout de trois jours alors qu'il reste stable pendant sept jours dans le cas d'un marquage avec des NP-acide poly-lactique (Roger, Clavreul et al. 2010).

Par ailleurs, afin de pouvoir modifier les CSM de manière stable avec un gène d'intérêt, j'ai marqué les cellules avec le gène rapporteur de la GFP en utilisant des lentivirus de troisième génération. L'utilisation de cette méthode m'a permis d'obtenir une très bonne efficacité de

marquage puisque plus de 85% des CSM expriment la GFP au bout de vingt-quatre heures. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Sasportas et al. qui ont modifié les CSM avec à la fois des gènes d'intérêt diagnostique GFP et Luciférase (CSM-fLuc-GFP) mais également avec un gène thérapeutique codant pour S-TRAIL. Les CSM étaient stablement et efficacement marquées puisque 80% des cellules étaient positives trois semaines après la transduction (Sasportas, Kasmieh et al. 2009).

Contrairement à notre étude mettant en œuvre des lentivirus, la transduction des CSM a souvent été réalisée en utilisant des adénovirus comme dans le cas de l'étude du groupe de Nakamura et al. ou de Yong et al. En effet, alors que Nakamura et al. ont généré des CSM-eGFP et des CSM-hIL-2 (Nakamura, Ito et al. 2004), Yong et al. ont produit des CSMh-GFP en utilisant des adénovirus exprimant des motifs RGD (Yong, Shinojima et al. 2009). 24 heures après l'infection par les adénovirus, 80% des CSMh étaient marquées à la GFP. Le principal intérêt d'utiliser les adénovirus était d'améliorer l'efficacité de transduction cellulaire. Or, Van Damme et al. ont mis en évidence que la transduction avec les adénovirus est souvent moins efficace et requiert de plus fortes doses de vecteur que lorsque des lentivirus sont utilisés et les CSM doivent présenter les récepteurs adénoviraux sur leur membrane. Les lentivirus permettent aussi d'obtenir une meilleure efficacité de transduction que les rétrovirus pour une dose égale de vecteur utilisée (13 fois plus efficace). En effet, les lentivirus permettent de transduire les cellules qu'elles soient répliquatives ou non, le vecteur s'intègre de manière stable dans le génome et le niveau et la durée d'expression du transgène est plus élevée (Van Damme, Thorrez et al. 2006).

Je confirme dans cette étude l'intérêt d'utiliser les lentivirus de troisième génération pour le marquage des CSM puisqu'ils permettent une transduction efficace et stable.

Le tropisme des CSM pour les tumeurs après leur administration systémique est une caractéristique primordiale pour que l'on puisse les utiliser comme outil théranostique.

L'observation du tropisme tumoral des CSM dépend non seulement de la méthode de détection utilisée mais également de la voie d'administration empruntée et de la quantité de CSM injectée.

Dans la première partie de mon projet de thèse, nous avons étudié le tropisme des CSM humaines après administration dans des modèles de tumeurs sous-cutanées et de métastases pulmonaires implantés chez la souris *Nude*. Suite à l'injection péri-tumorale ou intraveineuse

des CSM, ces dernières sont identifiées dans la tumeur par biologie moléculaire vingt-quatre heures après leur administration. Cependant le passage des CSM dans la tumeur est transitoire puisque 7 jours après l'injection nous ne les détectons plus.

En ce qui concerne le modèle de glioblastome humain orthotopique implanté chez la souris, je ne retrouve pas les CSM dans la tumeur durant les vingt-quatre premières heures suivant l'injection intraveineuse et ce, en utilisant une technique ultrasensible de PCR pour identifier la présence de CD90.

Enfin, comme l'a réalisé le groupe de Yong et al., nous avons marqué les CSM avec la GFP afin de les détecter *ex vivo* sur des coupes histologiques en microscopie optique de fluorescence. Nous retrouvons bien un marquage fluorescent « dans le vert » dans les tumeurs ; ce marquage est présent chez les souris témoins mais plus important chez les souris traitées. Une analyse spectrale du signal « vert » de fluorescence a révélé que cela ne correspond pas à de la GFP mais à de l'autofluorescence du tissu tumoral, même si nous ne pouvons expliquer la différence d'intensité entre les deux groupes de souris.

Il faut noter toutefois que, contrairement à l'étude de Yong et al. ou d'autres équipes, nous avons administré les CSM par voie intraveineuse et non pas par voie intra-artérielle dans la carotide. Dans ces conditions, les CSM subissent un effet de premier passage dans l'organisme (notamment dans les poumons) et n'arrivent donc apparemment pas aussi efficacement au cerveau comme lors de l'injection dans la carotide.

L'injection intraveineuse est beaucoup plus réaliste que l'injection intra-carotidienne en vue d'une éventuelle translation clinique. De plus, le mode d'injection intraveineux semble envisageable dans certains cas pour amener les CSM dans la tumeur, comme nous l'avons établi dans le modèle de tumeurs sous-cutanées mais pas dans le glioblastome orthotopique.

L'absence de tropisme tumoral des CSM dans le modèle de glioblastome orthotopique est plus probablement due à la voie d'injection utilisée et au volume tumoral au moment de l'injection plutôt qu'au modèle tumoral lui-même. En effet, Yong et al ont injecté des CSM-GFP chez des souris porteuses de tumeurs U87 orthotopiques. Ils identifient un signal de fluorescence « vert » 4 jours après leur administration dans la carotide (Yong, Shinojima et al. 2009).

De même, Nakamura et al. identifient un signal « vert » de fluorescence, sous forme de « capsule » autour de la tumeur, suite à une administration des CSM en intra-tumorale ou



dans l'hémisphère controlatéral sur des tumeurs orthotopiques 9L établies ou en co-injection chez le rat (Nakamura, Ito et al. 2004).

Par ailleurs, Nakamizo et al. ont injecté des CSM marquées avec du DiD, marqueur fluorescent du proche-infrarouge, puis les ont injectées soit en intra-artérielle soit en intra-cérébrale dans l'hémisphère contro-latéral chez des souris porteuses de tumeurs orthotopiques U87 implantées dans le lobe frontal 7 jours auparavant. Le sacrifice des souris 24 heures ou 7 jours après l'injection des CSM a permis de visualiser les CSM dans la tumeur uniquement et non pas dans le tissu adjacent dans le cas de l'injection intra-artérielle. En ce qui concerne l'administration dans l'hémisphère contro-latéral, 14 jours après leur administration, les CSM sont retrouvées entre le point d'injection et la tumeur. La faible vascularisation associée à la petite taille des vaisseaux sanguins justifie le tropisme plus lent lors de l'injection dans l'hémisphère controlatéral (Nakamizo, Marini et al. 2005).

Enfin, Sasportas et al. ont co-injecté des cellules de gliome Gli36 modifiées avec l'EGFRvIII et des CSM exprimant la GFP et la Luciférase. Ils mettent en évidence que les CSM restent dans la tumeur puisqu'ils les retrouvent uniquement dans la tumeur 14 jours après leur administration (Sasportas, Kasmieh et al. 2009).

Afin de pouvoir utiliser les CSM comme base d'outil théranostique, il est important de montrer que leur injection ne favorise pas la croissance tumorale.

Nous avons montré dans ce projet que l'injection des CSM natives par voie intraveineuse ou intra-tumorale dans des modèles de tumeurs du sein, pré-établies soit en sous-cutanée soit sous forme de métastases pulmonaires, entraîne un ralentissement significatif de la croissance tumorale liée à une diminution significative de la prolifération des cellules tumorales et à une modification de l'angiogénèse, alors que seule une légère tendance inhibitrice sur la progression tumorale est observée dans le glioblastome.

Mon étude dans le modèle de tumeur solide pré-établie de glioblastome orthotopique a montré en effet que l'administration de CSM par voie intraveineuse n'entraîne pas d'augmentation de la croissance tumorale, mais a au contraire une tendance de ralentissement de la croissance tumorale, bien que non significative, et ce, que les CSM soient natives, modifiées avec un gène rapporteur par un lentivirus ou avec des nanoparticules.

Les résultats obtenus avec l'administration des CSM natives dans un modèle de glioblastome humain orthotopique implanté chez la souris sont en accord avec ceux obtenus par le groupe

de Nakamura et al. En effet, que ce soit par co-injection de CSM avec les cellules tumorales ou par injection de CSM sur tumeurs pré-établies, ils mettent en évidence que quatorze jours après l'administration des CSM, les volumes tumoraux sont plus petits dans le cas des souris traitées. Cependant, comme dans notre cas, cette différence n'est pas significative (Nakamura, Ito et al. 2004).

Une hypothèse pouvant expliquer la différence concernant l'impact des CSM sur la croissance tumorale est l'importance du nombre de CSM injectées par rapport au nombre de cellules tumorales présentes.

Ainsi, Nakamizo et al. ont mis en évidence qu'il existe un effet seuil pour observer un impact des CSM sur la croissance tumorale. En effet, l'administration de  $2,5 \times 10^4$  CSMh-IFN $\beta$  n'a pas d'effet alors que l'administration de  $2,5 \times 10^5$  CSMh-IFN $\beta$  par voie intra-artérielle ou intra-tumorale dans un modèle de glioblastome orthotopique dans le lobe frontal permet d'observer une augmentation de la survie (Nakamizo, Marini et al. 2005). De même, dans l'étude du groupe de Sasportas et al., la diminution du volume tumoral est obtenue lors de la co-injection des cellules tumorales Gli36-EGFR $\nu$ III et des CSM modifiées pour exprimer S-TRAIL, avec un ratio cellules tumorales-CSM de 3:1 (Sasportas, Kasmieh et al. 2009). Dans le cas de mon étude, les CSM sont administrées quatorze jours après l'implantation tumorale, sur des tumeurs bien développées. Le manque d'effet anti-tumoral peut être dû à la trop faible quantité de CSM administrées.

La quantité de CSM injectée en une seule fois *in vivo* est limitée par le volume injectable et par la quantité de CSM pouvant être reprises dans ce volume. C'est pourquoi, comme dans le cas des molécules de chimiothérapie, il est possible de réaliser des injections répétées de CSM pour augmenter la dose finale administrée. Ainsi, Yong et al ont injecté deux doses de CSMh-GFP-24-RGD 4 et 18 jours après implantation tumorale d'un glioblastome orthotopique. Ils mettent en évidence un effet anti-tumoral associé à une augmentation significative de la survie (Yong, Shinojima et al. 2009).

Les propriétés des CSM favorisant le développement tumoral peuvent venir de leur capacité à dériver phénotypiquement *in vitro* après un certain nombre de passages ce qui peut avoir un impact majeur sur le résultat décrit. Ainsi, j'ai utilisé des CSM ayant un faible nombre de passages c'est-à-dire entre 2 et 4 passages. Ceci peut expliquer que dans ces conditions, les CSM ont un effet anti-tumoral, significatif ou non selon le modèle et ne favorisent pas la croissance tumorale.

La controverse dans la littérature concernant le fait que les CSM peuvent favoriser le développement tumoral est principalement basée sur le fait que les CSM ont naturellement une influence sur la néo-angiogénèse tumorale en l'augmentant. L'angiogénèse est induite par une tumeur qui atteint une taille critique, afin d'améliorer son approvisionnement en oxygène et en nutriments et de favoriser son développement. Cependant, cette néo-vascularisation est anarchique, mal organisée et n'est finalement pas très fonctionnelle. Ceci peut d'ailleurs poser un problème en thérapie par manque d'accessibilité des molécules thérapeutiques aux tumeurs, ce qui a amené récemment des chercheurs à envisager de « normaliser » la vascularisation tumorale afin d'en augmenter la perfusion et donc la concentration intratumorale en molécules thérapeutiques. Néanmoins cette « normalisation » pourrait aussi donner un coup d'accélérateur à la prolifération des cellules tumorales. Il se peut donc que les CSM aient une propriété ambivalente sur l'angiogénèse, ce qui expliquerait les résultats parfois contradictoires décrits dans la littérature.

Nous avons donc évalué l'impact que pourraient avoir des injections de CSM par voie systémique ou intra-tumorale dans un contexte de tumeur sous-cutanée ou métastatique pulmonaire. En effet, ces deux localisations tissulaires génèrent des besoins en angiogénèse totalement différents. Le poumon étant très irrigué, la tumeur sera richement approvisionnée dès son implantation jusqu'à ce qu'elle atteigne une taille conséquente. Inversement, une tumeur sous cutanée dépendra beaucoup plus de l'établissement d'une néo-angiogénèse pour se développer.

Nous montrons dans nos expérimentations dans le modèle de tumeurs sous-cutanées que les CSM affectent l'angiogénèse tumorale puisqu'elles permettent d'augmenter la taille des vaisseaux et d'améliorer leur structure sans modifier la quantité de cellules endothéliales présentes. Ce résultat est en accord avec l'étude de Sanz et al. qui met en évidence que les CSM ont un rôle essentiel *in vivo* pour la maturation et la fonctionnalité des vaisseaux sanguins en recrutant des cellules de paroi vasculaire conférant une structure et une rigidité aux vaisseaux (Sanz, Santos-Valle et al. 2008).

Cependant, non seulement ce pouvoir de normalisation des vaisseaux sanguins tumoraux n'est pas un inconvénient, puisque nous montrons que malgré cela nous observons une diminution de la croissance tumorale, mais en plus nous trouvons un potentiel thérapeutique qui permettrait d'améliorer l'accessibilité au centre de la tumeur et ainsi pouvoir apporter les molécules d'intérêt thérapeutique au cœur de la tumeur.

Chapitre 2 :  
Utilisation d'un vecteur synthétique  
comme outil théranostique :  
les nanoparticules

## 1 Objectifs du projet

Les nanoparticules sont les outils théranostiques les plus étudiés actuellement. Elles permettent un ciblage passif des tumeurs grâce à l'effet *Enhanced Permeability and Retention* (EPR). En effet, elles ont une taille suffisamment petite pour bien diffuser dans la circulation sanguine et suffisamment grande pour être retenues naturellement au niveau des tumeurs permettant leur accumulation dans ces tissus. Par ailleurs, les nanoparticules sont également étudiées pour leurs propriétés de ciblage actif. Leur surface suffisamment importante permet le greffage d'agents de ciblage spécifiques des cellules tumorales. De plus, leur petite taille et leur solidité leur permettent de diffuser de manière homogène dans un liquide et donc d'être potentiellement administrables par différentes voies.

Mon objectif pour ce projet est double :

Mon premier objectif est d'étudier la possibilité de prédire la rétention passive des nanoparticules par effet EPR en utilisant un outil d'imagerie utilisé couramment en clinique humaine : l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). En effet, le ciblage tumoral passif est facilement observable par fluorescence du corps entier chez le petit animal. Or cette méthode n'est pas adaptée à la clinique humaine. Mon but est de corréler le signal de fluorescence observé au niveau tumoral avec les paramètres d'IRM afin de déterminer des paramètres IRM prédictifs de l'accumulation naturelle des nanoparticules. Ce projet fait actuellement l'objet d'une publication en préparation. Le manuscrit actuel sera présenté plus loin.

Mon deuxième objectif consiste à utiliser les nanoparticules comme outil de ciblage actif des cellules tumorales. Ainsi, j'ai développé un outil théranostique peu invasif sous forme de spray intra-trachéal de nanoémulsions greffées avec un anticorps spécifique des cellules tumorales afin de cibler les tumeurs et de suivre leur accumulation tumeur-spécifique par des méthodes d'imagerie *in vivo*.

Nous avons choisi de tester cet outil théranostique dans un modèle orthotopique de CBNPC. En effet, ce cancer est diffus dans les poumons, ce qui rend son diagnostic et sa thérapie difficile. De plus, l'état général du patient étant rapidement altéré, il est très intéressant de développer un outil théranostique peu invasif qui permette de cibler un grand nombre de cellules tumorales. Par ailleurs, les cellules de CBNPC surexpriment l'EGFR qui est reconnu

par un anticorps monoclonal, le Cetuximab, déjà utilisé en clinique. L'utilisation de cet anticorps comme agent de ciblage nous permet d'envisager un transfert plus rapide en clinique.

Ainsi, nous avons dans un premier temps développé un modèle de tumeur orthotopique pulmonaire chez la souris. J'ai ensuite évalué la distribution de notre agent de ciblage, le Cetuximab, après nébulisation dans les poumons de souris porteuses de tumeurs pulmonaires. Enfin, après avoir vérifié que nous retrouvons les propriétés du Cetuximab même une fois greffé sur les nanoparticules, j'ai évalué la distribution *in vivo* de nanoémulsions greffées avec le Cetuximab, administrées sous forme de spray intra-trachéal.

## 2 Résultats

### 2.1 Ciblage passif de tumeurs sous-cutanées par des nanoparticules

L'effet *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) permet un ciblage tumoral passif par des nanoparticules suite à leur administration par voie systémique.

Cette accumulation est due aux caractéristiques spécifiques des tumeurs qui présentent des vaisseaux sanguins larges, tortueux, désorganisés et fenestrés alors que le système lymphatique est quasi absent.

L'effet EPR est très intéressant pour l'utilisation de nanoparticules théranostiques en clinique puisqu'il ne nécessite pas le greffage des nanoparticules avec un agent spécifique.

Afin d'éviter d'administrer des nanoparticules chez un patient dont la tumeur présente peu d'effet EPR, il est intéressant de mettre au point un outil prédictif de cet effet.

L'imagerie optique de fluorescence permet d'évaluer la biodistribution d'une molécule fluorescente dans le corps entier chez le petit animal et donc d'observer son accumulation tumorale. Cette technique n'est cependant pas adaptée à une utilisation clinique. Ainsi, nous avons voulu déterminer une corrélation entre le signal de fluorescence et les séquences obtenues par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), technique couramment utilisée en clinique humaine, afin d'obtenir un outil prédictif du statut EPR d'une tumeur.

Cette étude fait actuellement l'objet d'une publication soumise au journal ACS Nano.

# Preclinical evaluation of the Enhanced Permeability and Retention effect using fluorescence imaging can be correlated to a combination of 3 parameters measured by DCE-MRI.

**Karageorgis A**<sup>1,§</sup>, Sancey L<sup>2,§</sup>, Dufort S<sup>1</sup>, Henry M<sup>1</sup>, Hirsjävi S<sup>3</sup>, Benoit JP<sup>3</sup>, Passirani C<sup>3</sup>,  
Montigon O<sup>4</sup>, Benmerad M<sup>1</sup>, Siroux V<sup>1</sup>, Barbier E<sup>4</sup>, Coll JL<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>: INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France, Université Joseph Fourier UJF, Grenoble, France

<sup>2</sup>: CNRS UMR 5306, Equipe FENNEC, Univ. Lyon 1, Villeurbanne, France

<sup>3</sup>: INSERM U1066, Micro et Nanomédecines biomimétiques, IBS-CHU, Angers, France

<sup>4</sup>: INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, UJF, Grenoble, France,

§: co-first authors, AK and LS contributed equally

\* : JLC Corresponding author: Dr Jean-Luc Coll

INSERM U823, Equipe 5

Institut Albert Bonniot BP170

38 042 Grenoble cedex 9, France

Phone: 33[0]4 76 54 95 53/fax: 33[4]476 54 94 13

Email: Jean-luc.coll@ujf-grenoble.fr

Key words: cancer, Enhanced and Permeability Retention, 2D-FRI, MRI



## **ABSTRACT**

Imaging methods, such as computed X-ray tomography, Magnetic Resonance Imaging (MRI), Positron Emission Tomography (PET) and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), can provide a large panel of anatomical and functional medical information. However, it is currently impossible to anticipate how efficiently a given tumor will accumulate a nanoparticle (NP) administered intravenously. Indeed, NPs are useful tools in oncology because they have the capacity to passively accumulate in tumors via the so-called enhanced permeability and retention (EPR) effect, but the importance and reliability of this EPR effect in patients remains controversial.

In this preclinical study, we used optical imaging to measure the accumulation of a fluorescent NP in subcutaneous mouse tumor models, and we used dynamic contrast-enhanced MRI to measure the functional parameters of these tumors. Our results demonstrate that the permeability, water diffusion coefficient and microvessel diameter can be combined to predict the capacity of a given tumor to accumulate a NP *via* the EPR effect. Translated to a clinical situation, this strategy could help detect “EPR-negative” tumors, which will not respond to nanomedicine-based treatments.

## INTRODUCTION

Improvements in imaging technologies over the past few decades and the development of molecular probes are major accomplishments in the field of nanomedicine. In particular, these advances allow the detection of cancer at its earliest stages, provide predictive information on the probability of a given tumor responding to a nanomedicine-based treatment, and provide a method that non-invasively monitors the efficiency of tumor penetration by the injected nanovector in real time. Imaging is also expected to play major roles in the early drug development process during the translational phases from *in vitro* to *in vivo* preclinical models in the evaluation of the ADME properties of nanovectors (pharmacokinetics and pharmacology for absorption, distribution, metabolism, and excretion). Finally, functional imaging will also provide important information and details on the local and real time biological activities of these drugs.

Fluorescence imaging can be used for the characterization of new drugs and/or their formulations at the preclinical stage. Fluorescence labeling is preferred to radioactive labeling because fluorescence can be applied very early during nanomedicine development both *in vitro* in cells and *in vivo* in small animals; however, fluorescence is not an accepted whole body clinical imaging method because of its intrinsic limitations, such as the depth of investigation and quantification. More traditional imaging methods, such as computed X-ray tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI), represent the foundation of clinical imaging. These methods are currently complementary to others techniques, which are more dedicated to the acquisition of molecular and physiological information, including positron emission tomography (PET) or single photon emission computed tomography (SPECT).

Low-molecular-weight anticancer drugs are usually homogeneously distributed in normal organs and tissues and in tumors, where they will eventually perform their (specific) function, and within a therapeutic window. Consequently, these anticancer drugs often provide insufficient therapeutic benefits and cause severe systemic toxicity. It is expected that the entrapment of these types of drugs in a nanoparticle (NP) will enhance their delivery to, or uptake by, target tumor cells and could reduce the accumulation of these cytotoxic drugs in normal organs. This effect would increase their therapeutic index. Indeed, NPs have the capacity to accumulate passively in tumors *via* the enhanced permeability and retention (EPR)

effect, initially described by Maeda <sup>1,2</sup>. The EPR effect is due to a combination of the fenestrated endothelium (permeability) and inefficient tumor lymphatic drainage, which generates the retention effect. All compounds leak out of the vascular bed and accumulate in the tumor's interstitial space. Small drugs (less than 40 kDa) will be rapidly cleared by diffusion, and large molecules and NPs (up to 500 nm size) will be retained in the interstitial space because of the absence of drainage.

Accordingly, EPR-based targeted therapies were proposed to be efficient for treating a wide spectrum of tumors <sup>3</sup>; unfortunately, this approach has not been as successful as expected. The apparent reason for this failure seems to be the poor accessibility of these tumors <sup>4,5</sup> because of dysfunctional tumor blood vessels and lymphatics <sup>6</sup>, which produce elevated interstitial pressures that prevent diffusion <sup>7</sup>. This effect is partially compensated by the leakiness of tumor vessels; however, the EPR effect remains too unpredictable <sup>8</sup>. Furthermore, the biophysical properties of NPs, such as size, chemical composition, and zeta potential influence their distribution and will also contribute to inter- and intra-tumor variability <sup>9</sup>.

Therefore, a preliminary measurement of the EPR effect in a patient is important before expensive and potentially toxic treatments are initiated.

We previously demonstrated that the combination of an iron-based, steady-state vessel size index magnetic resonance imaging (VSI-MRI) approach and a gadolinium (Gd)-based dynamic contrast-enhanced MRI approach (DCE-MRI) could be used to characterize the tumor microvasculature <sup>10</sup>.

In the current preclinical study, we used optical imaging to evaluate how 50 nm fluorescent NPs accumulate in subcutaneous tumors, and we assessed these results in conjunction with various VSI- or DCE-MRI parameters. We demonstrate that it is possible to predict the efficiency of the EPR effect in a given tumor based on three MRI parameters: permeability, water diffusion coefficient and microvessel diameter.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cell lines and culture conditions**

HUH-7 are hepatocyte derived cellular carcinoma cells, cultured in DMEM plus 10% FBS. The IGROV1 cells are human ovarian adenocarcinoma cells, cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 1% of glutamine. The U87-MG cells are human glioblastoma-astrocytoma cells cultured in DMEM plus 10% FBS supplemented with non essential amino acids. HT29 cells are human colorectal adenocarcinoma cells cultured in McCoy's medium supplemented with 10% FBS. .

Finally, TS/a-pc cells are mouse mammary carcinoma cells, cultured in RPMI 1640 supplemented with 1% glutamine and 10% FBS. All cell lines were cultured at 37°C in a humidified 95% air / 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

All cell lines come from the ATCC except the IGROV1 cell line which was kindly provided by L. Poulain (Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse, Caen, France).

### **Lipid NanoCapsule (LNC) preparation, post-insertion and characterization**

LNCs (50 nm of diameter) were prepared by the phase-inversion temperature method described by Heurtault et al. (Heurtault, Saulnier et al. 2003). Briefly, a mixture of Solutol® HS15 (282 mg, PEG 660 12-hydroxystearate,  $M_w$  870 Da, BASF, Ludwigshafen, Germany), Lipoid® S75-3 (25 mg, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany), Labrafac® (343 mg), NaCl (30 mg, Prolabo VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) and milliQ185 water (987 mg, Saint-Quentin-en-Yveline, France) was subjected to three 65 °C ↔ 85 °C temperature cycles. During the final decrease of temperature, at 78 °C (within the phase-inversion zone), the system was diluted with 4.2 ml cold (4 °C) water, leading to formation of stable LNCs. Fluorescent dye 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiD) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), dissolved in acetone, was added to the formulation vial, followed by evaporation of the acetone before adding the LNC components. The final local dye concentration in the nanocarriers was approximately 4.4 mM. The LNC dispersions were filtered through 0.22 µm filters (Minisart High-Flow, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany).

## ***In vivo* experiment**

This experiment was approved by the local ethic committee under agreements 380922 for one author. Experiment was performed on tumor-bearing mice. Anaesthesia was induced with 4% of isoflurane in air and maintained with about 2% of this gas to keep respiratory rate between 50 and 70 breaths/min.

A catheter filled with saline was inserted into the mice's tail vein to enable the injection of contrast agent comprised of the following: 100  $\mu$ l of LNC one hour before the beginning of the MRI studies, USPIO (200  $\mu$ mol/kg, Sinerem®, Guerbet, France/Combidex®, AMAG Pharmaceuticals Inc., USA; apparent diameter 30 nm; plasmatic half-life  $\approx$  270 min) and Gd-DOTA (200  $\mu$ mol/kg, Dotarem®, Guerbet, France; apparent diameter 1 nm, plasmatic half-life  $\approx$  26 min). Injections were always delivered manually and by the same experimenter.

MRI was performed on a 4.7 T scanner (Biospec 47/40 USR AV III, Bruker, Germany) equipped with a 12 cm inner diameter actively shielded gradient insert (640mT/m in 120  $\mu$ s). Actively decoupled volume and surface coils were used for excitation and reception, respectively (Bruker, Germany). Animals were placed in the prone position. All images were acquired in the coronal orientation.

MRI sequence was composed of: I) Anatomical view (T2-weighted) RARE-T2 MRI (TR/TE 52/49, 1 mm thick slices, matrix = 196  $\times$  192). This sequence was merely used for tumor localization; II) Diffusion-weighted, spin-echo, single shot, EPI-64 (EPI Diff; TR/TE 53/48, 1 mm thick slices, matrix = 128  $\times$  128). This sequence was applied four times; once without diffusion weighting and three times with diffusion weighting ( $b = 800 \text{ s}\cdot\text{mm}^{-1}$ ) in three orthogonal directions; III) Combined multi gradient-echo and single spin-echo conventional MRI (MGSE; TR/TE 51/51; TE(GE)/  $\Delta$ TE(GE) = [xx] ms/x ms; TE(SE) = 60 ms; FA = 90, 1 mm-thick slices; matrix = 64  $\times$  64). Immediately following this sequence, 13  $\mu$ l USPIO were injected in 5 s; IV). A repetition of step III following a delay of 20 s; V) Combined gradient-echo and spin-echo, single shot, EPI (EPI GESE; TR = 500 ms, TE(GE) = 12 ms, TE(SE) = 60 ms, FA = 60°, 2 mm thick slices, matrix = 64  $\times$  64, FOV = 3  $\times$  3 cm<sup>2</sup>). This MRI sequence was applied repeatedly during 20 min (1 image/15 seconds). The bolus of 20  $\mu$ l Gd-DOTA was injected in 2 s, 1 min after the beginning of this sequence (flush of 70  $\mu$ L of saline solution).

## **Data processing**

Data were processed in a Matlab environment (v7.6, The MathWorks Inc., Natick, NA, USA). Region of interest (ROI) were manually delineated, slice-wise (1mm thick) for each mouse. For each slide, two ROI were considered: the tumor and the muscle.

Tumor volume, water diffusion coefficient, blood volume fraction, vessels' diameter, permeability and VSI are obtained for each slice. For each mouse, results are expressed as all the tumor slice's mean.

## **2D-FRI imaging**

Anesthetized mice were restrained in a prone position after induction and were illuminated by 660nm light emitting diodes equipped with interference filters. Fluorescence Reflectance Images (FRI) were acquired during 50 milliseconds with a back-thinned cooled charge-coupled device (CCD) camera (ORCAII-BT-512G, Hamamatsu Photonics, Massy, France) and a colored-glass high-pass filter RG9 (Melles Griot, Voisins le Bretonneux, France) to cut-off all excitation light. Fluorescence images were superimposed on the black and white picture for a better fluorescent signal's localization. Semi-quantitative data were obtained from the fluorescence images by drawing regions of interest on the area to be quantified. The results are expressed as relative light unit (RLU)/pixel/50ms. Quantification and analysis of photons recorded on images were carried out using the WASABI image software (Hamamatsu Photonics).

## **Immunohistochemical labeling**

Tumor slices were placed at room temperature, fixed in acetone for 10 min and washed twice in TBS/Tween (TBS/T). Endogenous peroxydases were blocked with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol and sliced were rinsed in distilled water and TBS/T for 5 min. Tumor sections were blocked with 2% rabbit serum diluted in TBS for 20 min and rinsed 5 min in TBS/T. CD31 was labeled with the rat anti-CD31 for 1 hr (Pharmingen, #550274, at 1/500) and the rabbit anti-rat for 1 hr (Cell signaling, #7077, at 1/750). The labeling was revealed with DAB for 5 min (Dako, #K3467) and rinsed with water for 5 min. Cell nuclei were stained with Gill's haematoxylin for 2-3 s and washed with water 5 min. Samples were dehydrated with 2 baths of 100% ethanol and one other of xylene before the addition of the mounting medium (Merckoglas, Merck, #1.03973.001). Images were taken with the Olympus BX-41 with the 10x objective.

The CD31-quantification with the evaluation of the number of vessels and their diameter was realized with Metamorph software.

### **Statistical analysis**

The correlation between fluorescent and MRI values was determined with a simple regression test, using Statview software.

The predictive equation as well as its different parameters and its cross validation were determined using a stepwise method on SAS<sup>®</sup> software (SAS<sup>®</sup> institute, North Carolina, USA).

## **RESULTS**

### **1/ EPR-mediated accumulation of fluorescent Lipid NanoCapsules (LNC) in various type of subcutaneous tumors**

A total of 17 nude mice were engrafted subcutaneously in the right thigh with 5 different tumor cell lines. When the tumor volume was more than 100mm<sup>3</sup>, a dose of 50 nm large, fluorescent DID-containing LNC was intravenously injected. 24 hours after the injection, LNC accumulation was evaluated by measuring the tumor's fluorescence intensity on anaesthetized mice using 2D-FRI.

LNC fluorescent signal in the tumor varies depending on the tumor model with HUH-7 presenting a dark, negative, signal compared to a bright fluorescent signal for TS/a-pc (Figure 1).

As can be seen on isolated organs collected 24h after LNC IV injection (Figure 2 A), fluorescence signal was mainly in the liver (although at a very weak level of intensity), while the signal in the intestine may be taken with precaution related to the naturally elevated NIR background usually present in this tissue following food uptake. In EPR positive tumors such as TS/a-pc, U87MG, IGROV1, the fluorescence intensities are important. In contrast, tumors like HUH7 accumulated weakly the fluorescent nanoparticles, and can be considered as "EPR negative" (Figure 2 B). Finally, the HT29 tumors can be categorized as "EPR-weak", when the intensity of fluorescence is corrected by the tumor volume (Figure 2 C).

### **2/ Determination of the functional properties of the subcutaneous tumors using MRI.**

The same 17 mice were then imaged using MRI.

The tumor anatomical view is observed using an MRI T2-weighted sequence. Our results reveal that tumor homogeneity depends on the tumor cell line. Thus, HUH7 tumors are heterogeneous with large dark signals inside the tumor coming from the blood. In contrast, the four other models with IGROV1, U87MG, HT29 and TS/a-pc are quite homogeneous on the entire tumor's surface (Figure 3).



Tumor permeability was evaluated using a gadolinium contrast agent (Dotarem®) injected intravenously. The intratumoral gadolinium signal was followed during 15 minutes with a MRI T1-weighted sequence.

Our results reveal four types of tumor permeability depending on the tumor cell line (Figure 4).

First, HUH7 tumors presents a low permeability. A very low gadolinium signal is seen on the tumors after 2min30 and this signal decreases after 10 minutes.

Second, TS/a-pc tumors present a clear heterogeneity of permeability. The high gadolinium signal surrounding the tumor reveals a high and prolonged permeability in the periphery of the tumor mass after 2min30, still present after 15 minutes. The inside of the tumor is not permeable to gadolinium.

Third, there are tumors like U87MG or HT29 with partial permeability. In this case, high gadolinium permeability is seen on tumor's periphery 2min30 after the injection but then gadolinium diffuses inside the tumor.

Finally, there are tumor like IGROV1 which have a high permeability, and a strong signal is observed in large domains of the tumor and gadolinium still diffuses in the tumor 15 minutes after the injection (Figure 4).

Tumor blood vessels can be seen on MRI sequences after an USPIO intravenous injection (data not shown). With this sequence, vessels' diameter can be evaluated (VSI) as well as the blood volume fraction.

In order to confirm the precision of these measurements, and in particular to determine the vessel diameters of the tumors, we also performed an anti-CD31 immuno-peroxydase staining of the tumor sections of the different tumor types (Figure 5 A), and determined the mean vessels radius on the photos using the Metamorph software. As presented in Figure 5 B, we found a very good correlation on each tested sample, thus confirming the MRI values.

More, the number of vessels depends on the tumor cell line. Our results reveal tumors like HUH7 or IGROV1 with few blood vessels whereas tumors like U87MG, HT29 or TS/a-pc have twice.

### 3/ Prediction of the EPR effect

In order to find a correlation between fluorescence signal obtained by EPR uptake of the LNC and MRI parameters, we first compared each parameter, i.e. the tumor Permeability, Water Diffusion Coefficient, vessel diameter (VSI) and Blood volume fraction to fluorescent signal (table 1). The correlation factor  $R^2$  and the statistic significance  $p$  were calculated as indicated.

		<b>Fluorescence</b> (RLU/pixel/50ms)	<b>Permeability</b> (AU)	<b>water diff coef</b> ( $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ )	<b>vessel diameter</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>blood volume fraction</b> (%)
HUH7	mouse 1	689	117092	998	12,41	2,17
	mouse 3	1211	157347	1156	12,77	2,04
	mouse 4	1580	139081	1219	14,55	3,16
IGROV1	mouse 2	9682	208548	1537	14,12	2,44
	mouse 3	12505	186784	1494	13,05	2,86
U87MG	mouse 1	12935	262691	1149	11,47	1,79
	mouse 2	14224	325709	1209	13,55	3,21
	mouse 3	8943	209972	1142	13,51	2,14
HT29	mouse 2	13953	242544	1622	13,27	2,19
	mouse 3	11062	177274	1761	14,47	2,22
	mouse 4	17997	181058	1412	14,11	2,09
	mouse 5	6252	186061	1215	12,69	1,66
	mouse 6	10573	222734	1344	16,70	2,73
TS/a-pc	mouse 1	23076	411461	1072	14,06	3,14
	mouse 2	13094	362667	948	12,16	2,42
	mouse 3	9761	196435	965	11,94	2,41
	mouse 4	14615	134105	1128	8,41	1,85
	$R^2$	x	0,447	0,021	0,001	0,037
	p	x	0,0033	0,5756	0,91	0,4581

Table 1

Even if none of these parameters could be directly correlated to the intensity of fluorescence, it appears that permeability is the MRI parameter having the highest correlation with the fluorescent signal ( $R^2 = 0.447$ ) (Figure 6).

In order to anticipate the EPR effect using MRI, we thus tried to extract and combine additional functional information from the MRI experiments and to test the possibility if, combining different measures in an equation could help predicting the intensity of fluorescence labeling of the tumors obtained after intravenous injection of the fluorescent nanoparticles.

Accordingly, we then determined the best fit we could obtain when combining 1, 2, 3 or the 4 MRI parameters together in a linear regression (Figure 7 A):

$$fluorescence = intercept + A \times \frac{AUC - \overline{AUC}}{\sqrt{var(AUC)}} + B \times \frac{Dti - \overline{Dti}}{\sqrt{var(Dti)}} + C \times \frac{dia - \overline{dia}}{\sqrt{var(dia)}} + D \times \frac{BVf - \overline{BVf}}{\sqrt{var(BVf)}} + \epsilon$$

However, this did not prove to be the best combination, since we could exclude the blood volume parameter without affecting significantly the optimum  $R^2$  coefficient ( $R^2 = 0.630$  with 4 parameters to  $R^2 = 0.628$  with 3 only). Thus the final equation was obtained when only 3 parameters were combined according to the equation in Figure 7.

$$fluorescence = intercept + A \times \frac{AUC - \overline{AUC}}{\sqrt{var(AUC)}} + B \times \frac{Dti - \overline{Dti}}{\sqrt{var(Dti)}} + C \times \frac{dia - \overline{dia}}{\sqrt{var(dia)}} + \epsilon$$

This equation, determined statistically using a stepwise method, takes into account three MRI parameters with permeability, water diffusion coefficient and vessels diameter. SAS statistical software reveals that each parameter has a significant impact on the equation with a  $p < 0.2$ . The equation  $R^2$  is 0.63.

Finally, the cross validation curve of this test (Figure 7 C) confirmed the good correlation between fluorescence and the different MRI parameters. This was established on normalized values in order to introduce each of the 3 MRI parameters on a similar scale in the equation.

However, this normalization can be alleviated providing the final equation (Figure 8)

$$fluorescence = intercept + A \times AUC + B \times Dti + C \times dia + \epsilon$$

in which the different “intercept”, “A”, “B” and “C” values can be estimated as shown in Figure 8, ending up with the final equation:

$$fluorescence = -946 + 0.06 \times AUC + 11.75 \times Dti - 1233 \times dia$$

This equation can thus allow us to predict the intensity of fluorescence to be expected for a given tumor for which we measure *AUC*, *Dti* and *dia* by MRI first.

## DISCUSSION

We investigated the capacity of an intravenously injected 50 nm large lipid nanocapsules to accumulate passively in 5 different subcutaneous tumor models in nude mice via the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect.

The passive accumulation of a given nanoparticle *via* the EPR effect is highly dependent on its biophysical properties [3; 12; 13; 14; 15; 16]. However, while it is possible to evaluate its behavior and ADME quite easily, it is very difficult to anticipate the physio-pathological fluctuations and inter-tumor variability that will govern how a given tumor (or metastasis) in a given patient will be perfused by a given nanoparticle. This was achieved in the present study by following the distribution and passive accumulation of a fluorescent stealth LNC using non-invasive longitudinal near-infrared imaging, and by comparing the quality of the EPR-based tumor targeting to various functional parameters obtained by Dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI). DCE-MRI can provide valid quantitative parametric images of the tumor microenvironment as well as tumor-specific vascular abnormalities in preclinical cancer models. Different tumors will differ in particular in their vascular architecture, vascular density, vessel morphology, interstitial blood pressure and finally diffusion coefficients, leading to variable extravasation efficiencies of the drugs. This will be particularly important for large size compounds since these parameters are playing a major role in the definition of the EPR effect [4]. This inter-tumor variation could be a major problem in human patients and could lead to inefficient access of the drugs to the tumors [17]. It is thus tempting to use DCE-MRI as a clinically useful method for individualization of cancer treatment if we can correlate MRI-based results to the evaluation of EPR-mediated accumulation of a nanoparticle.

Our results using fluorescence imaging clearly document the variations in the passive accumulation of LNC according to the tumor type. As an example, HUH7 tumors, a well differentiated hepatocyte derived human cellular carcinoma cell line [18], are very poorly targeted by the nanoparticles. In sharp contrast, IGROV1 (originating from a human ovarian carcinoma [19], U87MG (human primary glioblastoma ATCC® HTB14™) or TS/a-pc (murine mammary adenocarcinoma [20] tumors are intensively labeled. Thus non invasive fluorescence after intravenous administration of fluorescent molecules is an adapted and rapid

tool to visualize the inter-tumor variations of the EPR effect occurring in nude mice models of subcutaneous tumors.

However, although the number of blood vessels is quite similar between tumors like HUH-7 and IGROV-1, the particle uptake is very different. It is thus not possible to correlate the presence and numbers of blood vessels to the EPR effect. Similar conclusions could be made for all the other tested parameters and we did not find an acceptable correlation with a “simple” evaluation of the number and size of blood vessels, two parameters that can be estimated by MRI and immunohistology, nor with their permeability, or the quantity of blood or the water diffusion coefficient. It was thus necessary to introduce additional functional parameters in order to generate a possible equation linking the intensity of the EPR effect and the different MRI-based parameters. This allowed us to generate a linear curve that provided a satisfying regression coefficient ( $R^2 = 0.63$ ) when the following equation was used:

$$fluorescence = -946 + 0.06 \times AUC + 11.75 \times Dti - 1233 \times dia.$$

A subsequent Cross Validation test confirmed and validated the choice of this equation.

Accordingly, this established that we can combine these 3 parameters obtained non-invasively to anticipate whether or not a stealth nanoparticle will accumulate in a given tumor. This may have major impact in the clinical practice. Indeed, after validation in an appropriated cohort of patient, we could extract a similar equation and determine a cut off that will classify a given tumor as “EPR-negative”, or “EPR-positive “. A positive ranking will predict a favorable access of the nanomedicines to that particular tumor, while a negative one will alert the clinician on the possibility that the treatment may fail due to a poor accessibility. This kind of selection could be of particular interest for drugs with high side effects or very expensive ones.

It is the first time to our knowledge that a solution to anticipate the EPR effect can be proposed. This may provide clinicians with interesting and promising opportunities to follow their patients and may be to adapt their treatment to the use of innovative nanomedicines while optimizing their chances of success.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

The authors acknowledge the OPTIMAL Grenoble small animal optical imaging facility's team and the IRMage Grenoble small animal MRI facility's team for their help and technical assistance.

This work was financially supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by the National Research Agency for the ANR projects CALIF (ANR-08-NANO-006) and MULTIMAGE (ANR-12-RPIB-0010-08).

## REFERENCES

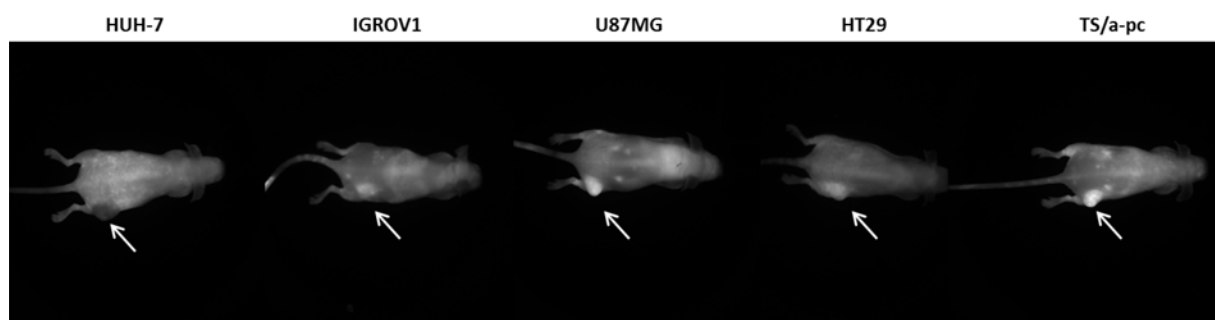
- [1]H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65 (2000) 271-284.
- [2]J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* 63 (2011) 136-151.
- [3]S. Dufort, L. Sancey, J.L. Coll, Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Advanced drug delivery reviews* 64 (2012) 179-189.
- [4]U. Prabhakar, H. Maeda, R.K. Jain, E.M. Sevick-Muraca, W. Zamboni, O.C. Farokhzad, S.T. Barry, A. Gabizon, P. Grodzinski, D.C. Blakey, Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer research* 73 (2013) 2412-2417.
- [5]T.W. Hambley, W.N. Hait, Is anticancer drug development heading in the right direction? *Cancer research* 69 (2009) 1259-1262.
- [6]R.K. Jain, T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol* 7 (2010) 653-664.
- [7]C.H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras, A. Ostman, High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 4 (2004) 806-813.
- [8]K.N. Sugahara, T. Teesalu, P.P. Karmali, V.R. Kotamraju, L. Agemy, O.M. Girard, D. Hanahan, R.F. Mattrey, E. Ruoslahti, Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell* 16 (2009) 510-520.
- [9]T. Stylianopoulos, M.Z. Poh, N. Insin, M.G. Bawendi, D. Fukumura, L.L. Munn, R.K. Jain, Diffusion of particles in the extracellular matrix: the effect of repulsive electrostatic interactions. *Biophysical journal* 99 (2010) 1342-1349.
- [10]K.A. Radermacher, J. Magat, C. Bouzin, S. Laurent, T. Dresselaers, U. Himmelreich, S. Boutry, I. Mahieu, L. Vander Elst, O. Feron, R.N. Muller, B.F. Jordan, B. Gallez, Multimodal assessment of early tumor response to chemotherapy: comparison



- between diffusion-weighted MRI, 1H-MR spectroscopy of choline and USPIO particles targeted at cell death. *NMR Biomed* 25 (2012) 514-522.
- [11]B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.C. Venier-Julienne, J.E. Proust, R. Phan-Tan-Luu, J.P. Benoit, The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *European journal of pharmaceutical sciences* 18 (2003) 55-61.
- [12]J. Morlieras, S. Dufort, L. Sancey, C. Truillet, A. Mignot, F. Rossetti, M. Dentamaro, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, R. Antoine, P. Dugourd, S. Roux, P. Perriat, F. Lux, J.L. Coll, O. Tillement, Functionalization of Small Rigid Platforms with cyclic RGD peptides for targeting tumors over-expressing  $\alpha v \beta 3$  integrins. *Bioconjugate Chemistry* In Press (2013).
- [13]A. Jacquart, M. Keramidas, J. Vollaire, R. Boisgard, G. Pottier, E. Rustique, F. Mittler, F.P. Navarro, J. Boutet, J.L. Coll, I. Texier, LipImage 815: novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive in vivo near-infrared fluorescence imaging. *Journal of biomedical optics* 18 (2013) 101311.
- [14]S. Hirsjarvi, L. Sancey, S. Dufort, C. Belloche, C. Vanpouille-Box, E. Garcion, J.L. Coll, F. Hindre, J.P. Benoit, Effect of particle size on the biodistribution of lipid nanocapsules: Comparison between nuclear and fluorescence imaging and counting. *International journal of pharmaceutics* 453 (2013) 594-600.
- [15]S. Hirsjarvi, S. Dufort, J. Gravier, I. Texier, Q. Yan, J. Bibette, L. Sancey, V. Josserand, C. Passirani, J.P. Benoit, J.L. Coll, Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 9 (2013) 375-387.
- [16]S. Hirsjarvi, S. Dufort, G. Bastiat, P. Saulnier, C. Passirani, J.L. Coll, J.P. Benoit, Surface modification of lipid nanocapsules with polysaccharides: From physicochemical characteristics to in vivo aspects. *Acta Biomater* (2013).
- [17]E. Kluza, S.Y. Yeo, S. Schmid, D.W. van der Schaft, R.W. Boekhoven, R.M. Schiffelers, G. Storm, G.J. Strijkers, K. Nicolay, Anti-tumor activity of liposomal glucocorticoids: The relevance of liposome-mediated drug delivery, intratumoral localization and systemic activity. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 151 (2011) 10-17.

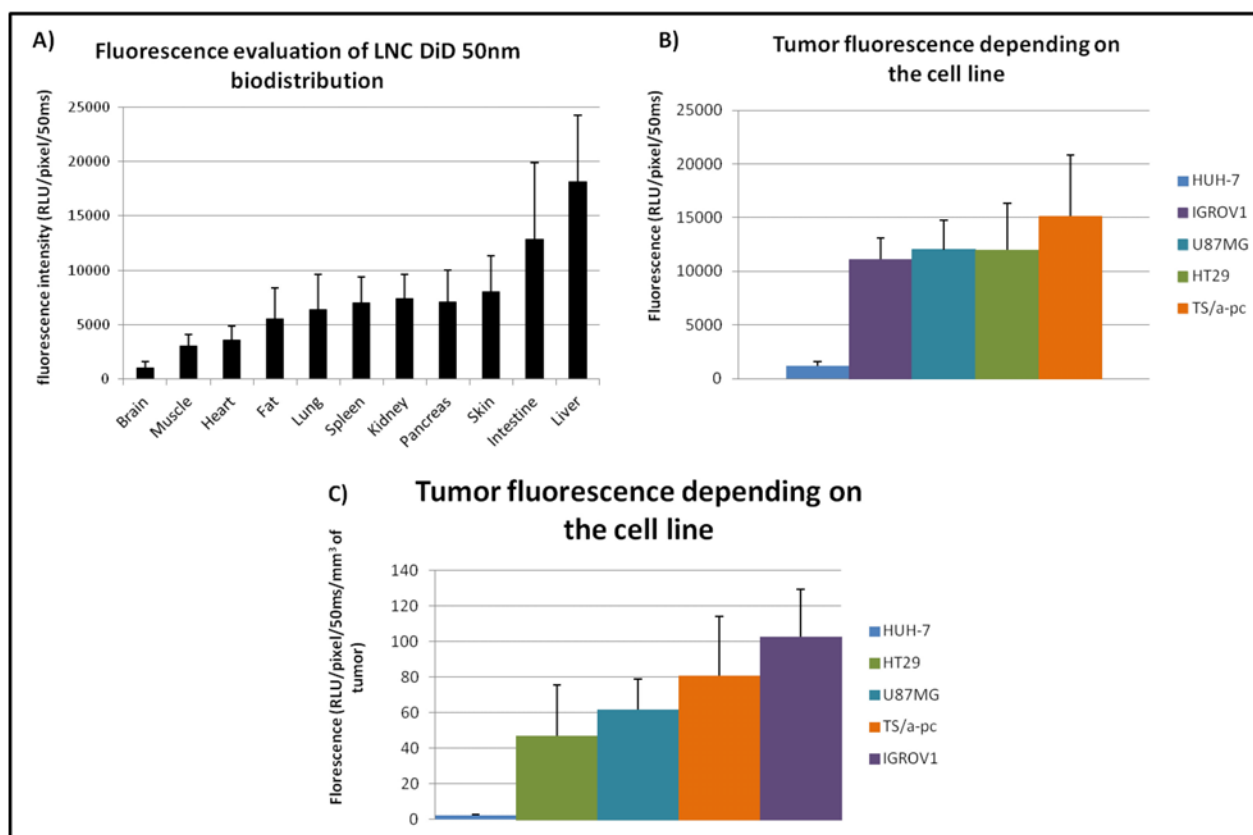
- [18]H. Nakabayashi, K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, J. Sato, Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* 42 (1982) 3858-3863.
- [19]J. Benard, J. Da Silva, M.C. De Blois, P. Boyer, P. Duvillard, E. Chiric, G. Riou, Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer research* 45 (1985) 4970-4979.
- [20]R. Meazza, A. Comes, A.M. Orengo, S. Ferrini, R.S. Accolla, Tumor rejection by gene transfer of the MHC class II transactivator in murine mammary adenocarcinoma cells. *European journal of immunology* 33 (2003) 1183-1192.

Figure 1



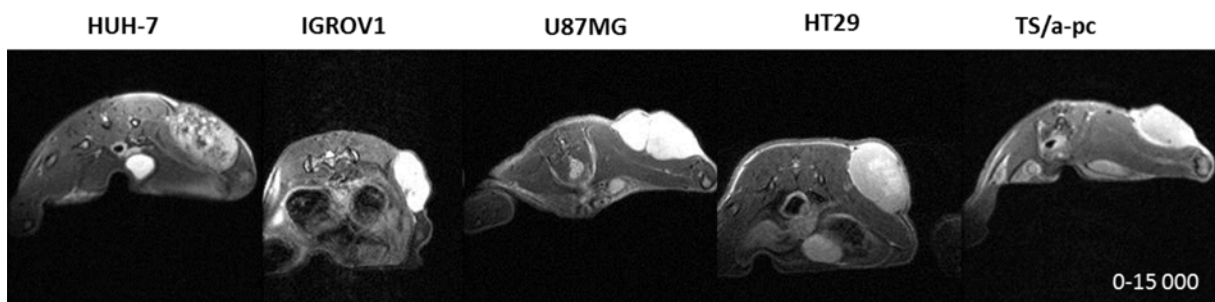
Representative images from the optical imaging of subcutaneous tumor-bearing mice 24 hours after LNC i.v. injection (10 nmol of dye). Images were acquired over a period of 50 ms and are presented with the same color scale (1700-30000). The arrows indicate the tumors.

Figure 2



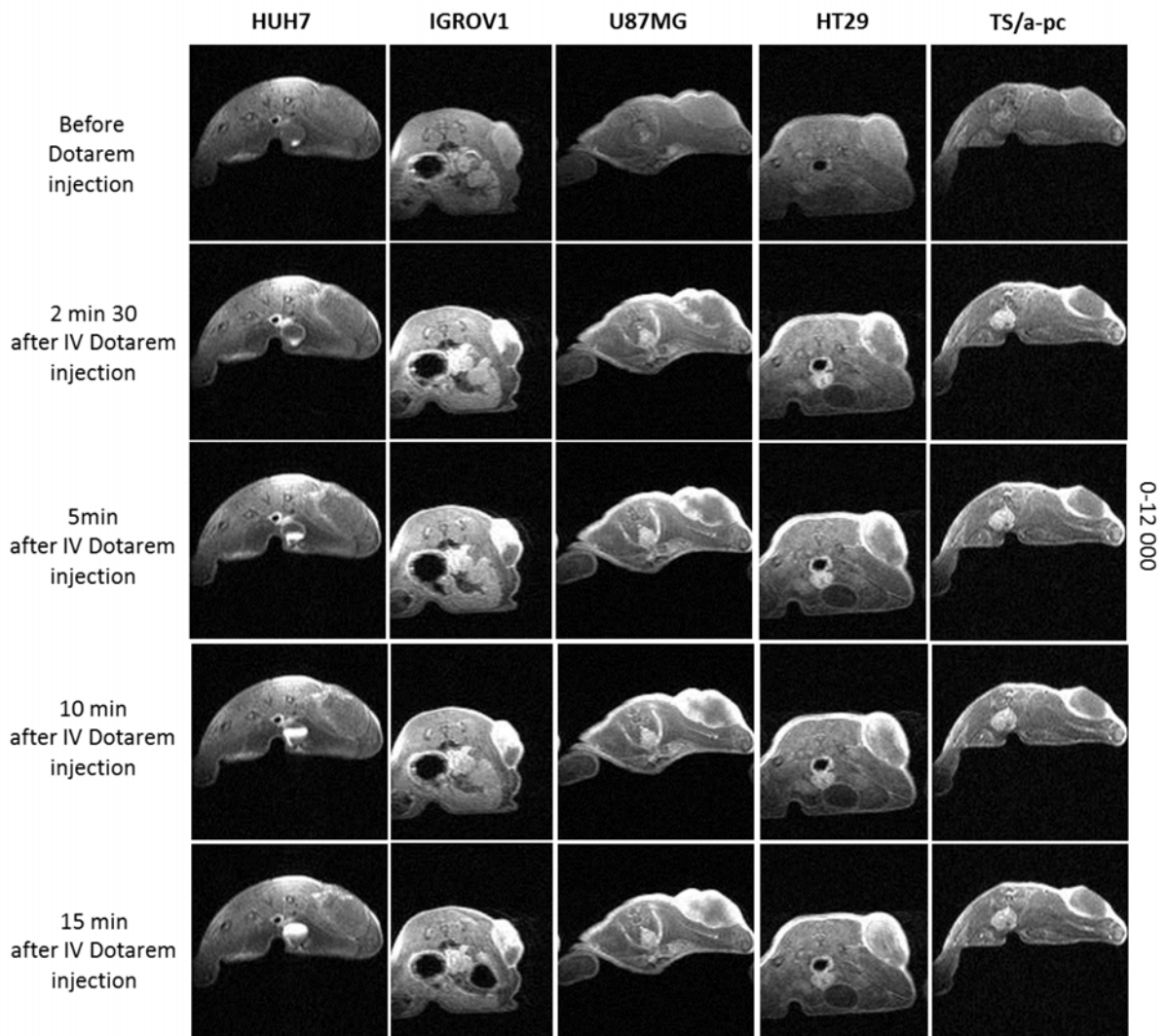
Biodistribution of fluorescent LNC 24 hours after intravenous injection in different subcutaneous tumor models. The fluorescent intensities in organs (A) were similar in the different groups. The fluorescent intensities varied depending on the tumor type (B), which was not modified by tumor volume normalization (C).

Figure 3



Anatomical view of the different subcutaneous tumors using T2-MRI sequence

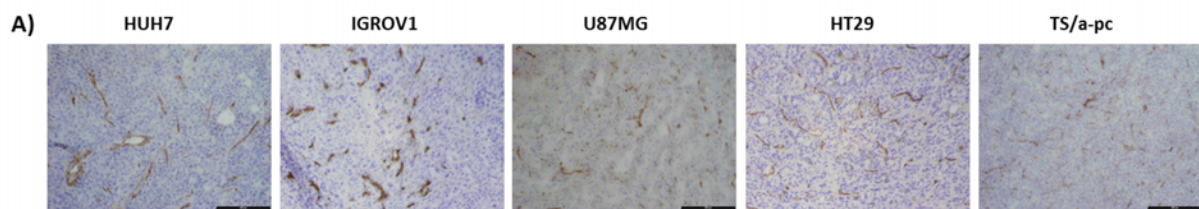
Figure 4



Evaluation of the different subcutaneous tumor permeabilities depending on the injected tumor cell line

Subcutaneous tumor bearing mice with different tumor cell lines were imaged using T1 sequence MRI for 20 min after an intravenous injection of Dotarem®. The hypersignal stands for the Dotarem®.

Figure 5



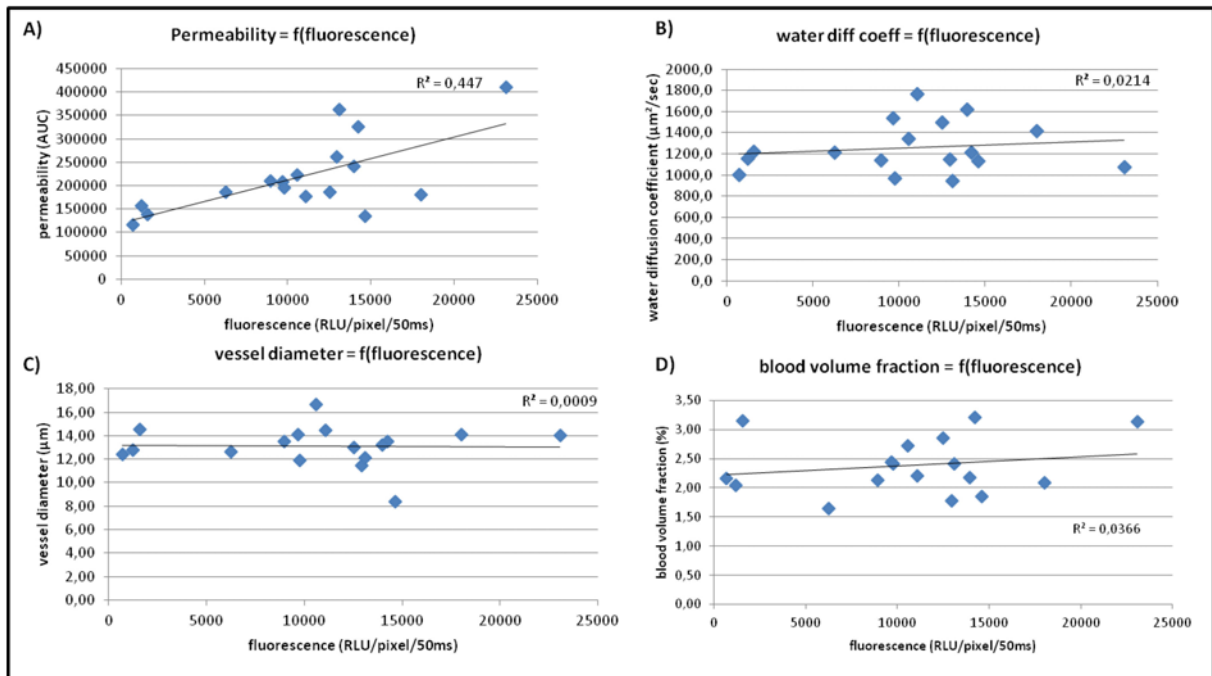
**B)**

	HUH-7		IGROV1		U87MG		HT29		TS/A-pc	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
<b>MRI vessel diameter</b>	13,24	1,14	13,59	0,75	12,84	1,19	14,25	1,54	11,64	2,36
<b>IHC vessel diameter</b>	14,53	0,27	14,75	2,04	10,40	1,18	11,52	0,86	8,87	0,83
<b>number of vessels</b>	17,1	6,6	17	6,9	29,1	5,9	34,5	8,6	38,5	18,2

Evaluation of the vessel diameter by MRI and IHC in tumor sections

Blood vessel immunostaining was performed on tumor sections using an anti-CD31 antibody (Scale bar 200  $\mu$ m) (A). Vessels were counted and their diameters were compared to vessel diameters initially determined by MRI (B).

Figure 6



Correlation between each tumor parameter evaluated by MRI and fluorescence imaging

Fluorescence intensities were compared to the permeability (A), the water diffusion coefficient (B), the vessel diameter (C) and the blood volume fraction (D) obtained by MRI. The correlation factor ( $R^2$ ) was evaluated for each parameter.



Figure 7

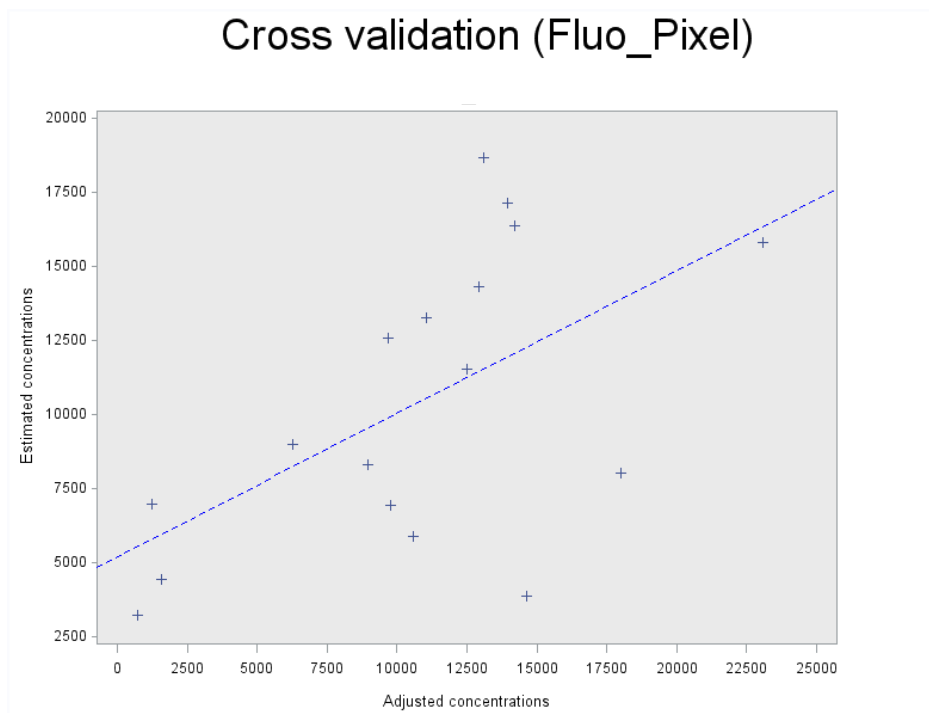
$$A) \text{ fluorescence} = \text{intercept} + A \times \frac{AUC - \overline{AUC}}{\sqrt{\text{var}(AUC)}} + B \times \frac{Dti - \overline{Dti}}{\sqrt{\text{var}(Dti)}} + C \times \frac{dia - \overline{dia}}{\sqrt{\text{var}(dia)}} + \epsilon$$

AUC : permeability ; Dti : water diffusion coefficient ; dia : vessel diameter,  $\epsilon$  = error  
**R<sup>2</sup> = 0.63**

B)

	Estimated parameters values	P
A	4686 ± 1026	0.0005
B	2862 ± 1196	0.0328
C	-3479 ± 1879	0.0869

c)



A predictive normalized equation between MRI and fluorescence and statistical analysis

An equation (A) was determined using the SAS software, and a stepwise analysis was used to link the normalized MRI parameters and fluorescence signal. Each normalized MRI parameter has a significant impact on the equation (B). The predictivity of the equation is permitted by the cross validation test (C).

Figure 8

A)  $fluorescence = intercept + A \times AUC + B \times Dti + C \times dia + \epsilon$

B)

	Estimated parameters values	P
A	$0.0597 \pm 0.013$	0.0005
B	$11.75 \pm 4.92$	0.0328
C	$-1232 \pm 665$	0.0869

C)  $fluorescence = -946 + 0.06 \times AUC + 11.75 \times Dti - 1233 \times dia$

A predictive equation between MRI and fluorescence without normalization

An equation (A) was determined using the SAS software, and a stepwise analysis was used to link the MRI parameters and fluorescence signal. Each MRI parameter has a significant impact on the equation (B) leading to the final equation (C).

Nous montrons dans cette étude que l'effet EPR varie considérablement d'une tumeur à l'autre selon la lignée cellulaire dont la tumeur est issue.

Cet effet est observable par imagerie de fluorescence après administration de nanocapsules lipidiques de 50nm marquées avec un fluorophore proche-infrarouge.

La réalisation de séquences IRM sur les mêmes tumeurs a permis d'obtenir des caractéristiques tumorales telles que la perméabilité, le coefficient de diffusion de l'eau et le diamètre des vaisseaux puis de corrélérer ces données avec la fluorescence due à l'accumulation tumorale des nanoparticules.

Nous obtenons ainsi une équation prédictive de l'effet EPR pour une tumeur donnée. Il faudra ensuite déterminer un seuil afin de discriminer une tumeur « EPR-positif » d'une tumeur « EPR-négatif ».

## **2.2 Ciblage actif de tumeurs pulmonaires par des nanoparticules**

Après avoir testé des nanoparticules comme outil théranostique par ciblage passif des tumeurs, mon objectif suivant a consisté à les utiliser pour un ciblage actif.

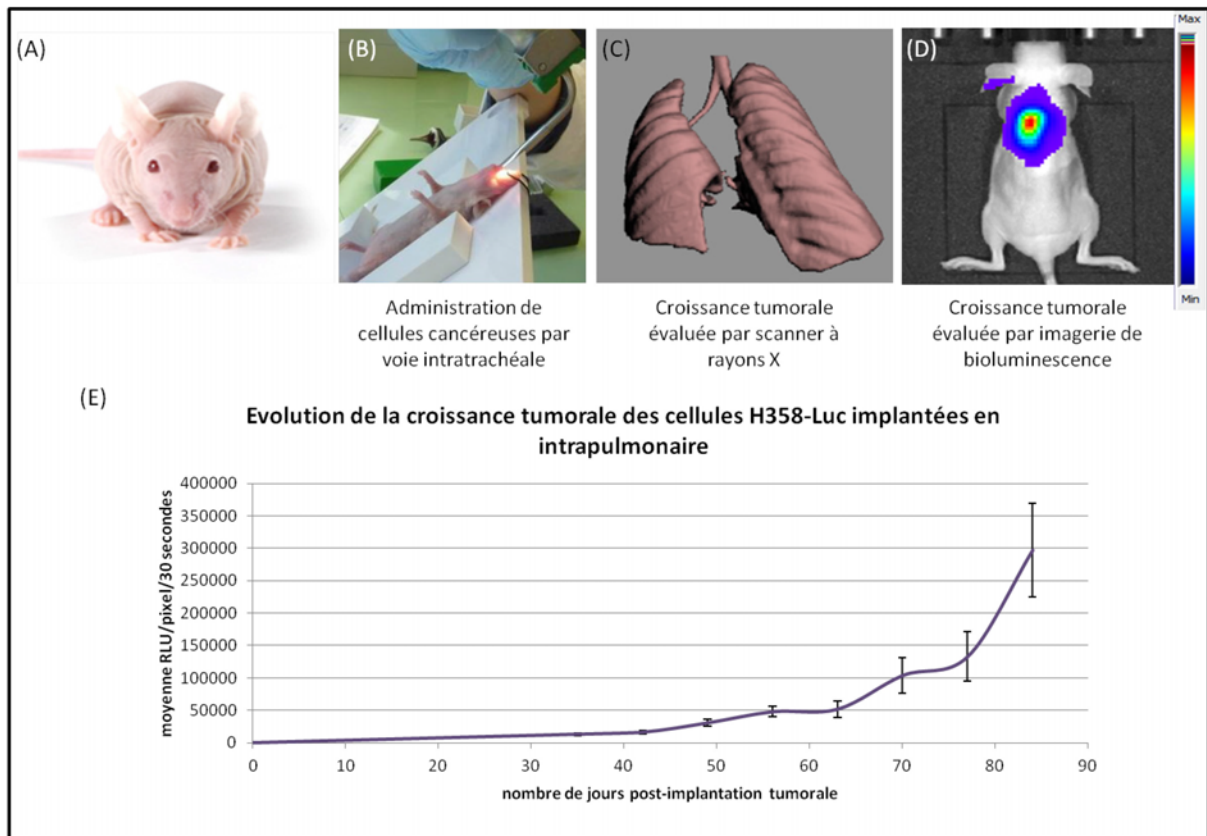
Ainsi, nous avons utilisé des nanoparticules greffées avec un anticorps spécifique afin de les administrer sous forme de spray dans un modèle de CBNPC.

### *2.2.1 Modèle de tumeur pulmonaire in vivo orthotopique*

Afin d'évaluer notre outil théranostique sous forme d'un spray intra-trachéal de nanoémulsions greffées avec un anticorps monoclonal, notre groupe a développé un modèle de CBNPC humain orthotopique implanté chez la souris.

Pour cela, des cellules H358-Luciférase+ ou H358 sont implantées dans les poumons de six souris *Nude* NMRI. Le suivi de la croissance tumorale est réalisé par bioluminescence dans le cas de cellules tumorales H358-Luciférase+ et/ou par scanner à rayons X (Figure 29 A à D).

D'après la courbe de croissance obtenue (Figure 29 E), la croissance des cellules de CBNPC implantées en intrapulmonaire se fait en deux temps. Pendant les 50 à 60 jours suivant l'implantation tumorale, c'est la période de prise tumorale, la croissance est lente mais constante. Une fois la tumeur établie, entre 50 et 60 jours après l'implantation, la courbe devient exponentielle et le volume tumoral augmente rapidement.



**Figure 29 : Etablissement d'une tumeur pulmonaire *in vivo* orthotopique**

Les souris *Nude* NMRI (A) sont endormies par anesthésie chimique puis, à l'aide d'un laryngoscope (B), les cellules tumorales de CBNPC, H358 ou H358-luciférase+, sont implantées en intra-pulmonaire par l'intermédiaire d'un cathéter. Enfin, le suivi de la croissance tumorale est réalisé avec un scanner à rayons X (C) ou par bioluminescence (D) pour les cellules H358-Luc. L'évolution de la croissance tumorale est évaluée par quantification de la bioluminescence au cours du temps chez 6 souris (E).

Ainsi, au bout de 50 à 60 jours environ, nous obtenons des tumeurs orthotopiques pulmonaires bien établies. C'est ce moment-là que nous choisissons pour tester notre outil théranostique. Le choix du jour de nébulisation repose sur le fait que nous voulons que la tumeur soit d'un volume suffisant pour pouvoir l'étudier correctement avec nos outils d'imagerie mais qu'elle ne soit pas trop développée. En effet, la tumeur étant pulmonaire, un volume trop important risquerait d'altérer l'état général de l'animal et nous empêcherait de lui administrer un spray intra-pulmonaire.

### 2.2.2 Evaluation *in vivo* de l'agent de ciblage : le Cetuximab

Le Cetuximab est un anticorps monoclonal spécifique de l'EGFR, récepteur surexprimé par un grand nombre de cellules cancéreuses notamment les cellules de CBNPC humain (H358). Afin d'évaluer l'intérêt d'utiliser le Cetuximab comme agent de greffage sur les

nanoparticules, j'ai évalué la distribution *in vivo* de l'anticorps marqué avec un fluorophore proche-infrarouge, l'Alexa 680, après nébulisation en intra-trachéale chez des souris *Nude* NMRI porteuses de tumeurs pulmonaires orthotopiques (H358-Luc).

Quatre souris *Nude* NMRI sont utilisées, à savoir deux souris témoins saines et deux souris porteuses de tumeur de CBNPC orthotopique. Les quatre souris reçoivent, par nébulisation intra-trachéale, 50 $\mu$ L de Cetuximab-Alexa 680 à une concentration de 460 $\mu$ g de Cetuximab par millilitre avec 55,2 pmoles de fluorophore par microlitre.

La distribution et la rétention pulmonaire du Cetuximab sont évaluées 5 heures et 24 heures après nébulisation. L'imagerie de fluorescence 3D (fDOT) permet de visualiser le Cetuximab-A680 alors que l'utilisation du scanner à rayons X permet de visualiser la tumeur pulmonaire qui apparaît sous forme d'un trou sur l'image du fait de l'absence d'air dans la tumeur. Ainsi, le couplage de la fluorescence 3D avec les rayons X (Figure 30 B) nous permet de vérifier que la rétention du Cetuximab est bien spécifique des zones tumorales. L'imagerie de fluorescence 2D *ex vivo* sur les poumons permet de visualiser de manière plus précise la quantité de Cetuximab toujours présente au niveau des poumons 24 heures après nébulisation (Figure 30 C).

Cinq heures après nébulisation, un fort signal de fluorescence de l'Alexa 680 est présent dans les deux poumons des souris porteuses de tumeurs de CBNPC orthotopiques. Dans le cas des souris saines, le signal de fluorescence est très faible au niveau pulmonaire mais il est fort au niveau hépatique. Ceci met en évidence un passage du Cetuximab-A680 dans la circulation sanguine puis une élimination hépatique au cours des heures suivant la nébulisation pulmonaire. La localisation du signal de fluorescence est confirmée sur l'image de superposition tomographe 3D – scanner à rayons X (Figure 30 B).

Vingt-quatre heures après nébulisation, le signal de fluorescence a fortement diminué chez les différentes souris. Cependant, la fluorescence 2D *ex vivo* des poumons met en évidence que la fluorescence est encore détectable dans les poumons des souris porteuses de tumeurs pulmonaires, ce qui n'est pas le cas pour les souris témoins saines (Figure 30 C).

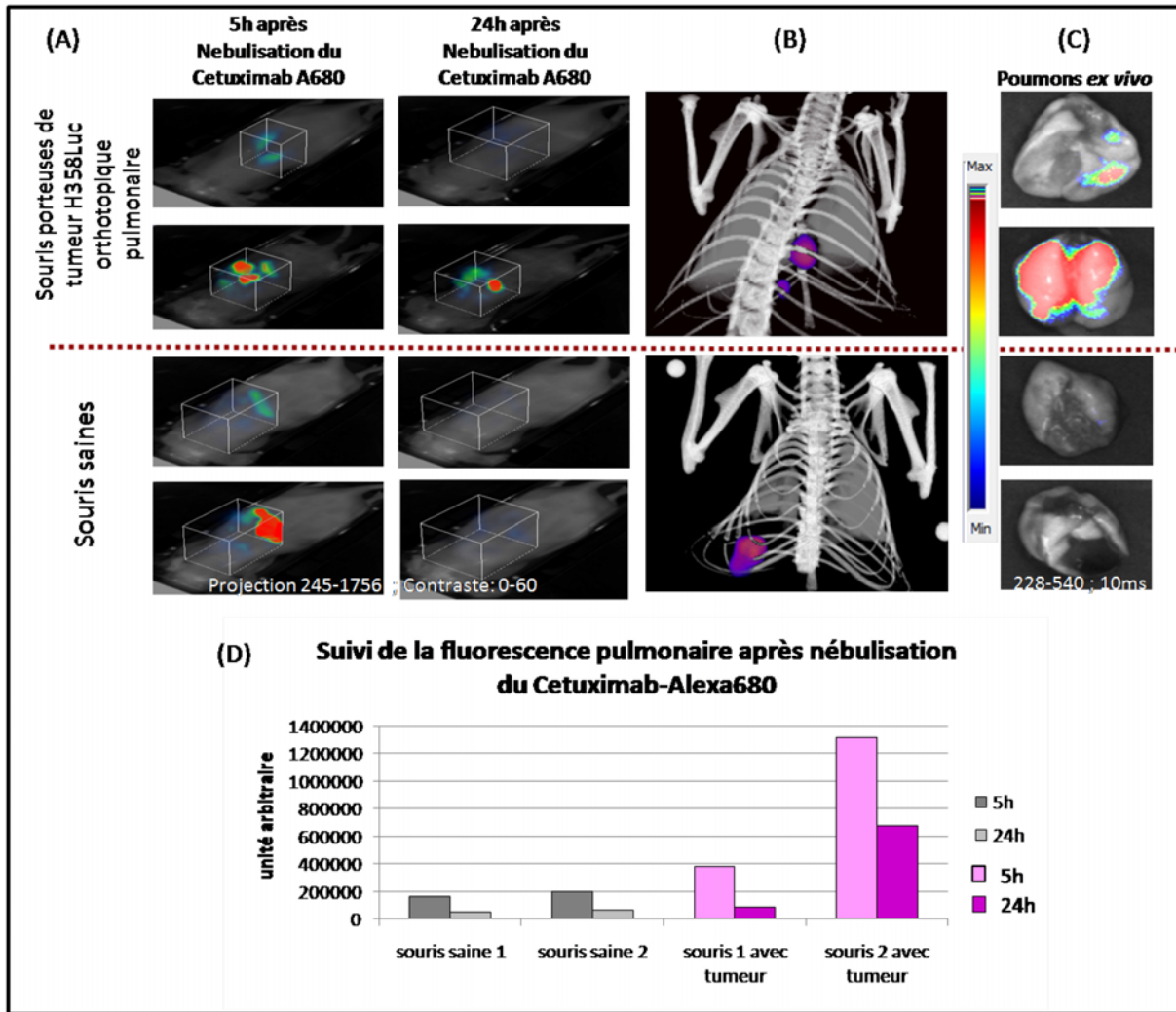


Figure 30 : Evaluation *in vivo* et *ex vivo* de la fixation pulmonaire du Cetuximab-Alexa 680 après nébulisation intrapulmonaire chez des souris porteuses ou non de tumeurs pulmonaires

(A) visualisation de la fluorescence pulmonaire *in vivo* en 3 dimensions avec le Tomographe 3D, (B) superposition des images de fluorescence du Tomographe 3D avec la séquence pulmonaire obtenue par scanner à rayons X Scanco 5 heures après nébulisation, (C) visualisation *ex vivo* de la fluorescence pulmonaire avec un système 2D-FRI Fluobeam™, (D) quantification de la fluorescence pulmonaire *in vivo* 5h et 24h après nébulisation de Cetuximab chez des souris saines (gris) et chez des souris porteuses de tumeurs pulmonaires (rose).

En conclusion, je montre ici que le Cetuximab délivré sous forme de spray intra-trachéal est spécifiquement retenu au niveau des poumons avec tumeurs de CBNPC et qu'il est rapidement éliminé après administration dans des poumons sains. Je confirme ici qu'il est intéressant d'utiliser le Cetuximab comme agent de ciblage sur les nanoémulsions afin qu'elles soient retenues spécifiquement au niveau des tumeurs.

J'ai évalué la biodistribution du Cetuximab dans les différents organes en évaluant la fluorescence des organes 24 heures après nébulisation (Figure 31 A). Au moment du sacrifice des souris, les organes sont prélevés et des images de fluorescence 2D *ex vivo* sont réalisées puis quantifiées. Les résultats mettent en évidence que le Cetuximab s'est uniquement fixé sur les poumons des souris porteuses de tumeurs pulmonaires orthotopiques H358-Luc et ne s'est fixé ni sur les poumons des souris saines ni sur d'autres organes.

L'utilisation des nanoparticules comme outil théranostique est basée sur le fait que les nanoparticules nébulisées se fixent sur les nodules tumoraux présents dans les poumons. Ainsi, je vérifie si la quantité de Cetuximab fixée est proportionnelle au volume tumoral. Vingt-quatre heures après nébulisation, temps à partir duquel nous pouvons considérer que l'excédent d'anticorps non fixé est éliminé, j'ai comparé la bioluminescence des tumeurs pulmonaires avec la fluorescence du Cetuximab-A680 (Figure 31 B). Les résultats mettent en évidence une corrélation entre le volume tumoral et la quantité d'anticorps fixée. En effet, plus le volume tumoral pulmonaire est important plus la quantité de Cetuximab fixée est élevée.

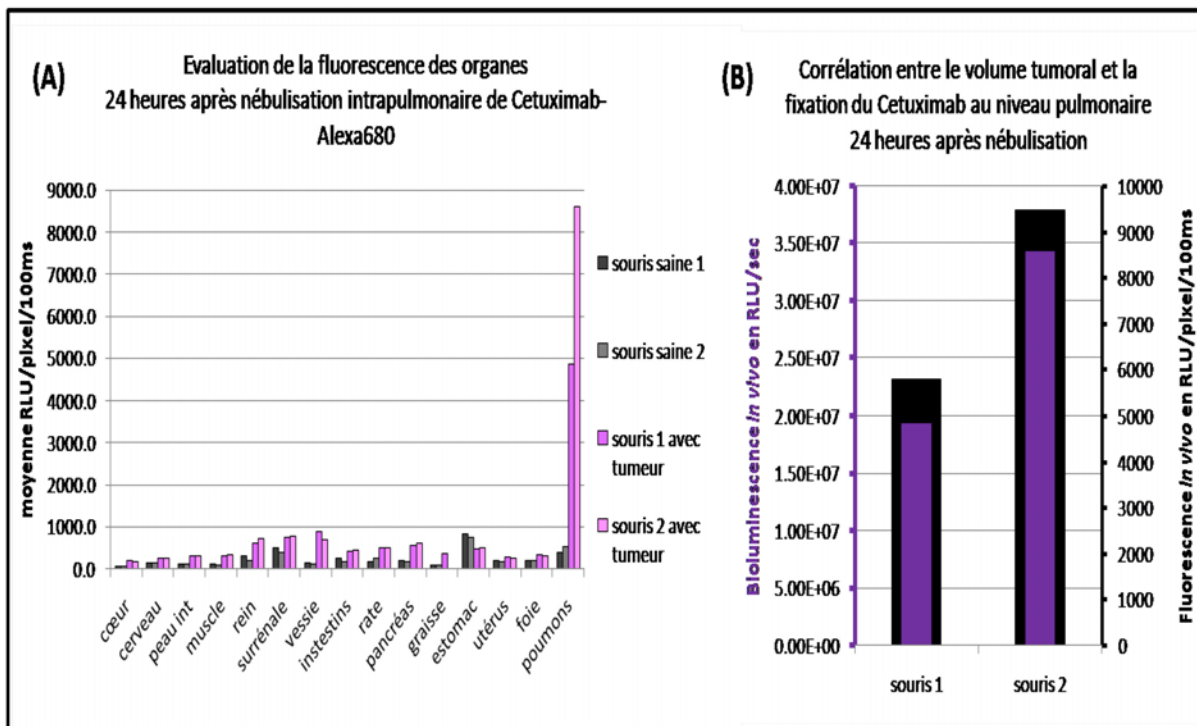


Figure 31 : Quantification de la fluorescence du Cetuximab-Alexa 680 après nébulisation chez des souris saines ou porteuses de tumeurs pulmonaires

(A) quantification de la fluorescence *ex vivo* des différents organes 24 heures après nébulisation du Cetuximab Alexa 680 chez les souris saines (gris) ou chez les souris porteuses de tumeurs pulmonaires H358-Luc (rose). (B) Comparaison de la bioluminescence tumorale (violet) avec la fluorescence pulmonaire suite à la nébulisation du Cetuximab-Alexa 680 (noir).



Le Cetuximab est donc un agent de ciblage de choix pour l'utilisation de nanoparticules comme outil théranostique dans un système de spray administré par voie intra-trachéale dans le cas d'un CBNPC orthotopique.

### 2.2.3 *Evaluation des nanoémulsions greffées avec du Cetuximab*

Après avoir validé l'utilisation du Cetuximab comme agent de ciblage des cellules tumorales par nébulisation dans un modèle de CBNPC orthotopique, la suite de mon projet de thèse a consisté à évaluer l'utilisation de nanoémulsions greffées avec du Cetuximab.

#### 2.2.3.1 *Evaluation in vitro de l'impact des nanoémulsions sur l'EGFR*

L'utilisation du Cetuximab comme agent permettant aux nanoémulsions de cibler les tumeurs présente un double intérêt à savoir la fixation et la rétention des nanoparticules sur les cellules cancéreuses et l'action du Cetuximab lui-même sur la cellule empêchant la fixation et donc l'action de l'EGF sur son récepteur l'EGFR.

Ainsi, j'ai évalué l'impact du Cetuximab, greffé ou non sur des nanoémulsions, sur l'activation de l'EGFR et sur les cascades de signalisation en découlant, à savoir la voie de survie Akt et la voie de prolifération Erk<sub>1/2</sub>.

Pour cela, j'ai traité des cellules de CBNPC (cellules H358-Luc) avec le Cetuximab seul ou greffé sur les nanoparticules (NP Cetux) avec comme témoin des nanoparticules ne présentant pas d'anticorps (NP Capped). Après 20 minutes de traitement, j'ai évalué le blocage de l'EGFR ainsi que sa ré-activation en traitant les cellules avec l'EGF pendant 10 minutes.

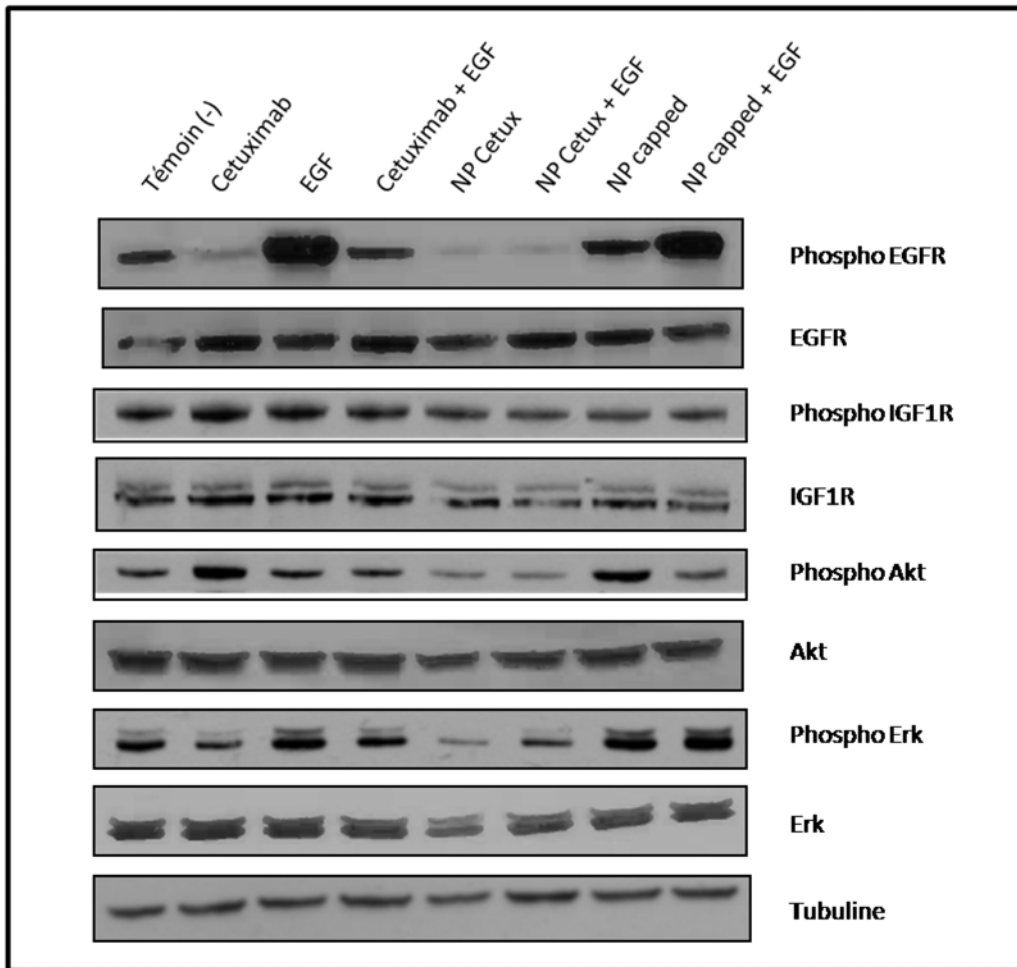
J'ai évalué par Western blot la phosphorylation des protéines-clefs des différentes voies de l'EGFR à savoir l'EGFR lui-même ainsi que Akt (la voie de survie) et Erk<sub>1/2</sub> (la voie de prolifération).

Le traitement des cellules H358-Luc avec le Cetuximab entraîne une diminution de la phosphorylation de l'EGFR, car le Cetuximab bloque l'EGFR en se fixant de manière compétitive sur le récepteur et gêne la fixation du ligand EGF naturel par encombrement stérique et ce phénomène est encore plus fort lorsque les cellules sont traitées par les NP Cetux. Ainsi, la phosphorylation de l'EGFR augmente, comme attendu, lorsque les cellules sont traitées par l'EGF et cet effet est fortement bloqué si les cellules sont traitées par les NP Cetux. Ce blocage est encore plus efficace que lors de l'utilisation du Cetuximab seul puisque

le traitement par EGF ne restaure pas la phosphorylation de l'EGFR (Figure 32). L'absence d'impact des NP témoins (NP Capped) met en évidence que l'effet observé est dû au Cetuximab greffé sur les nanoparticules et non pas à la nanoparticule elle-même.

Par ailleurs, les cellules H358 sont mutées KRAS ce qui implique que la voie de prolifération Erk<sub>1/2</sub> est activée de manière constitutive dans ces cellules. Je montre ici que le traitement des cellules par Cetuximab entraîne une diminution de l'activation d'Erk<sub>1/2</sub> qui est restaurée lors du traitement par EGF. Comme dans le cas de la phosphorylation de l'EGFR, le traitement des cellules par les nanoparticules greffées avec du Cetuximab a un impact plus important que le traitement par Cetuximab seul puisqu'il entraîne une très forte diminution de la phosphorylation d'Erk<sub>1/2</sub> et ce malgré le traitement par EGF.

En ce qui concerne l'impact du traitement par Cetuximab seul sur la voie de survie cellulaire Akt, nous observons une augmentation de l'activation d'Akt et non pas une inhibition comme nous pourrions nous y attendre suite au blocage de l'EGFR. Or, ce résultat est semblable à ceux obtenus par notre groupe dans l'étude de l'impact du Gefitinib sur les voies de signalisation découlant de l'EGFR. En effet, il a été mis en évidence que le traitement des cellules par le Gefitinib entraîne l'activation de la voie Akt par un « by-pass » de l'EGFR en recrutant le récepteur IGF1R au niveau de l'EGFR, ce qui permet l'activation d'Akt (Hurbin, Wislez et al. 2011; Jeannot V 2013). Dans notre cas, l'étude par Western blot de l'impact du Cetuximab seul sur la phosphorylation d'IGF1R met en évidence une augmentation de sa phosphorylation (Figure 32). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus avec le Gefitinib. Cependant, contrairement à l'impact du Cetuximab seul, le traitement des cellules avec les nanoparticules greffées avec du Cetuximab entraîne un blocage de l'activation d'Akt et une diminution de l'activation d'IGF1R. Cet effet peut être dû à l'importante gêne stérique des nanoparticules qui empêcherait le recrutement d'IGF1R.



**Figure 32 : Evaluation par Western blot de l'impact du Cetuximab seul ou greffé sur les NP, sur les différentes voies de signalisation de l'EGFR**

Les cellules de CBNPC-Luciférase+ (H358-Luc) ont été traitées par les nanoémulsions greffées ou non avec du Cetuximab ou par du Cetuximab seul puis de l'EGF a été ajouté. Nous observons par Western blot l'impact de ce traitement sur la phosphorylation de l'EGFR, d'Akt et d'Erk<sub>1/2</sub> dans une lignée de cellules H358-Luc. Les NP-Capped sont les NP témoins ; elles n'ont pas de Cetuximab greffé alors que les NP-Cetux sont greffées avec du Cetuximab. Les cellules ont été traitées par les NP avec ou sans ajout d'EGF avec une concentration en Cetuximab seul ou greffé sur les NP de 30µg/mL.

En conclusion, l'utilisation de nanoémulsions greffées avec du Cetuximab entraîne un blocage des voies de survie et de prolifération des cellules de CBNPC *in vitro* et ce, de manière plus importante que lors de l'utilisation du Cetuximab seul. Ces nanoémulsions représentent donc un outil théranostique prometteur.

### 2.2.3.2 *Evaluation in vivo de la fixation des nanoémulsions*

Face aux résultats encourageants obtenus lors des expérimentations *in vivo* avec le Cetuximab seul ou *in vitro* avec les nanoémulsions greffées avec du Cetuximab, la suite du projet a consisté à tester ces nanoémulsions dans des tests *in vivo*.

#### 2.2.3.2.1 Imagerie *in vivo*

Afin de pouvoir utiliser les nanomémulsions greffées avec du Cetuximab comme outil théranostique, j'ai évalué leur rétention au niveau pulmonaire après leur administration sous forme d'un spray intra-trachéal.

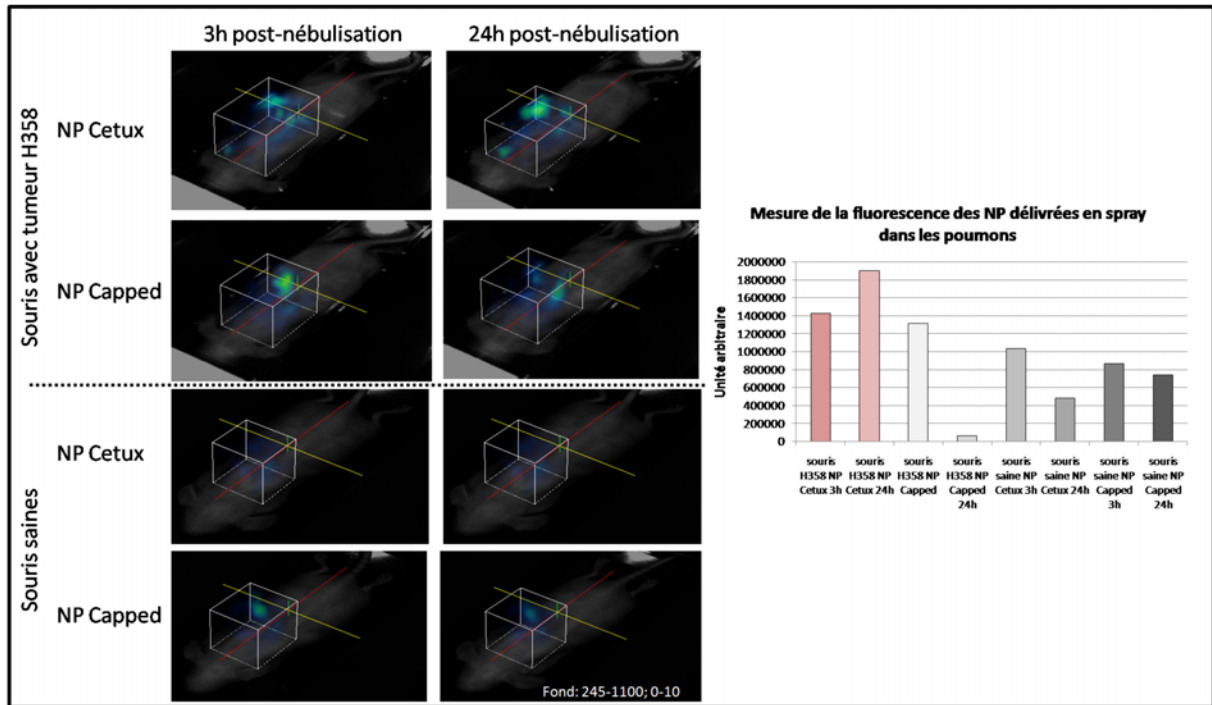
Quatre souris *Nude* NMRI sont utilisées. Parmi elles, deux souris sont porteuses d'un CBNPC orthotopique (cellules H358) et deux souris sont saines. Une souris saine (souris témoin) et une souris porteuse d'un CBNPC reçoivent, par nébulisation intra-trachéale, des nanoémulsions greffées avec du Cetuximab (NP Cetux) alors que les deux autres souris (témoins) reçoivent une nébulisation de nanoémulsions témoins (NP Capped). Les nanoémulsions contiennent un fluorophore, le DiD.

L'évolution de la fluorescence pulmonaire des nanoémulsions est suivie par fluorescence-3D 3 heures et 24 heures après nébulisation (Figure 33).

Les deux souris porteuses d'un CBNPC ont un fort signal de fluorescence 3 heures après la nébulisation. La fluorescence pulmonaire de la souris recevant les NP Cetux augmente au cours du temps. Ceci met en évidence une accumulation des nanoparticules au niveau pulmonaire. En revanche, dans le cas de la souris recevant les NP Capped, le signal de fluorescence diminue de manière significative pendant les vingt-quatre premières heures. Ce résultat met en évidence une élimination des nanoparticules au cours du temps après nébulisation intra-trachéale.

En ce qui concerne les souris témoins saines, le signal de fluorescence pulmonaire des nanoémulsions 3 heures après nébulisation des nanoparticules est beaucoup plus faible que chez les souris porteuses de tumeurs pulmonaires, mais il est présent. D'après le graphique obtenu (Figure 33), la fluorescence diminue pendant les vingt-quatre premières heures mais reste toujours présente même si elle est bien moins importante que celle observée chez la souris avec CBNPC traitée par les NP Cetux.

Les vingt-quatre heures suivant la nébulisation permettent donc d'éliminer une partie des nanoparticules fixées de manière non-spécifique dans les poumons.



**Figure 33 : Suivi *in vivo* de la fixation des nanoémulsions greffées avec du Cetuximab après nébulisation intra-trachéale**

Deux souris sont porteuses de tumeurs H358 : une souris reçoit une nébulisation de NP greffées avec du Cetuximab « NP Cetux » alors que la seconde reçoit les NP témoins « NP Capped ». Deux souris témoins saines reçoivent également un spray de NP ; la première reçoit les « NP Cetux » alors que la seconde reçoit les « NP Capped ». La fluorescence pulmonaire est observée 3 heures et 24 heures post-nébulisation intra-trachéale grâce à un système de fluorescence *in vivo* 3D (le Tomographe 3D). Le graphique représente la quantification de la fluorescence pulmonaire des différentes souris. En rouge est représentée la souris avec CBNPC traitée par les NP Cetux alors que les trois autres souris (représentées en gris) sont des témoins.

Nous montrons ici que les NP Cetux ont la propriété de se fixer, d'être retenues et de s'accumuler au niveau pulmonaire après une nébulisation intra-trachéale dans les poumons d'une souris porteuse d'un CBNPC. La faible rétention des nanoémulsions chez les souris témoins implique que les risques de toxicité liés à une fixation non spécifique des nanoémulsions sont limités.

### 3 Discussion

L'objectif de ce chapitre est d'étudier des méthodes de ciblage des tumeurs par des nanoparticules à l'aide, dans une première partie, d'un ciblage passif guidé par l'effet EPR dépendant des propriétés naturelles des tumeurs et, dans une deuxième partie, d'un ciblage actif avec des nanoémulsions greffées avec du Cetuximab.

En ce qui concerne l'étude du ciblage passif, je montre que des nanoparticules de 50 nm s'accumulent dans une tumeur sous-cutanée après administration par voie intraveineuse.

Cette méthode de ciblage tumoral passif est utilisée depuis de nombreuses années en clinique. Ainsi, Gabizon a mis en évidence que l'encapsulation de Doxorubicine dans des liposomes permet d'augmenter le temps de demi-vie plasmatique de la molécule et son accumulation dans le tissu tumoral tout en diminuant sa toxicité (Gabizon 2001). Ces nanoparticules, sont commercialisées (sous le nom de Caelyx®) en France depuis le 1<sup>er</sup> août 2001 pour la prise en charge du syndrome de Kaposi, du cancer du sein, de l'ovaire et du myélome multiple.

Nous mettons en évidence dans notre étude que cette accumulation tumorale des nanoparticules par ciblage passif dépend de la tumeur. Ce ciblage peut être évalué en fluorescence pour les nanoparticules chargées en fluorophore. Ainsi, en recherche pré-clinique, l'utilisation de la fluorescence 2D-FRI permet de suivre *in vivo* la biodistribution des nanoparticules dans le corps entier de la souris et de déterminer leur accumulation dans un organe. En revanche, cette méthode n'est pas adaptée à la clinique humaine car l'imagerie optique ne permet pas de détecter la fluorescence à plus de quelques millimètres de profondeur. Mon étude de la relation entre la fluorescence observée des nanoparticules présentes dans la tumeur et les différents paramètres IRM mesurés sur la tumeur, nous a permis d'élaborer une équation prédictive de l'effet EPR. Cette équation prend en compte trois paramètres IRM à savoir la perméabilité, le coefficient de diffusion de l'eau et le diamètre des vaisseaux. Chaque paramètre pris isolément n'est pas prédictif mais il nous est possible de les combiner et de générer une équation à 3 paramètres permettant de prédire si l'injection de nanoparticules par voie intraveineuse sera couronnée de succès, au moins en ce qui concerne leur accès aux différentes tumeurs/métastases présentes chez le patient considéré. De nombreux nano-médicaments de haut poids moléculaire sont utilisés en cancérologie. Ils sont transportés de l'appareil circulatoire vers la tumeur, à travers l'espace interstitiel par convection plutôt que par diffusion. En 1987, Jain émet l'hypothèse que la

pression osmotique dans les tumeurs est élevée (*Interstitial Fluid Pressure* ou IFP), ce qui pourrait constituer un obstacle pour ce type de médicament. L'IFP est variable d'une tumeur à l'autre, au sein même d'un patient comme à l'intérieur même d'une tumeur. Par exemple, l'IFP pourra être plus élevée au centre qu'à la périphérie d'une tumeur, créant un gradient défavorable au traitement de la région centrale de la tumeur (Jain and Gerlowski 1986). L'effet EPR ne dépend pas uniquement de l'IFP, puisque des paramètres tels que la densité de la matrice extracellulaire, l'élasticité des organes dans lesquels la tumeur se développe, sa vitesse de croissance, son niveau d'angiogénèse et autres caractéristiques tumorales seront aussi très influents et variables d'une tumeur à l'autre. L'IRM pourrait donc permettre, en mesurant ces trois paramètres, de rendre compte de la portée de cet effet EPR. Cela permettrait de ne traiter que les patients aptes à recevoir les nanoparticules, ou à proposer un « pré-traitement » qui régulariserait la vascularisation des tumeurs, ou encore à mieux comprendre d'éventuels échappements thérapeutiques attribués potentiellement, à tort, à des phénomènes de résistance aux drogues.

La deuxième partie de ce chapitre a consisté à évaluer l'utilisation de nanoémulsions greffées avec du Cetuximab comme outil théranostique administré sous forme de spray dans un modèle de tumeur pulmonaire orthotopique.

Pour cela, nous avons mis en place un modèle de tumeur pulmonaire orthotopique en implantant des cellules H358-Luc directement dans les poumons à l'aide d'un cathéter intratrachéal.

Contrairement au modèle de métastases pulmonaires utilisé dans le premier chapitre, nous voulions que les tumeurs s'installent dans l'épithélium pulmonaire, au contact de l'air et non pas dans les capillaires sanguins bordant le tissu pulmonaire comme à la suite d'une administration par voie intraveineuse et formation de pseudo-métastases.

Mordant et al. ont étudié différents protocoles d'implantation de cellules tumorales pulmonaires pour obtenir le modèle le plus adapté. Dans le premier cas, les cellules ont été implantées par voie percutanée mais une dissémination pleurale chez plus de 50% des souris qui entraînait la mort prématurée de l'animal a été observée. Dans le deuxième cas, ils ont créé une tumeur sous-cutanée à partir de cellules tumorales pulmonaires et l'ont implantée chirurgicalement au niveau pulmonaire. Cette méthode a entraîné une forte mortalité chez les souris du fait de la lourdeur du geste chirurgical réalisé sur un organe vital. Enfin, leur

troisième modèle est un modèle réalisé par une injection pulmonaire transpleurale des cellules tumorales. Cette méthode est moins invasive que les précédentes et a permis le développement de tumeurs en des points précis mais qui ont rapidement évolué au niveau loco-régional et ont formé des métastases. Ce modèle est très intéressant pour l'étude de l'invasivité tumorale (Mordant, Lorient et al. 2011).

Dans notre cas, nous voulons étudier la fixation d'un spray de nanoparticules au niveau des nodules pulmonaires. Notre modèle tumoral nous permet d'obtenir plusieurs nodules tumoraux à différents endroits des poumons sans dissémination tumorale ; il est donc bien adapté à notre étude. De plus, la méthode d'implantation est peu invasive et reproductible.

Le Cetuximab est un anticorps monoclonal anti-EGFR déjà utilisé en clinique. Il possède donc une AMM. Le choix de cet anticorps repose sur le fait qu'il cible les cellules tumorales de CBNPC qui surexpriment l'EGFR sur lesquelles il exerce un effet cytotoxique.

Dans la mesure où il est déjà utilisé isolément en clinique, son utilisation éventuelle après greffage sur des nanoparticules serait moins complexe.

Les cellules H358-Luc utilisées dans ce projet surexpriment l'EGFR mais sont résistantes au traitement par le Cetuximab (données non montrées). Or, le traitement des cellules H358-Luc par du Cetuximab entraîne une diminution de la phosphorylation de l'EGFR. Cependant, cette inhibition partielle est réversible puisque le traitement par EGF restaure le niveau basal de phosphorylation. Je montre dans cette étude que le traitement des cellules tumorales par les NP Cetux entraîne une forte inhibition de la phosphorylation de l'EGFR qui n'est pas restaurée avec le traitement par EGF. Par ce résultat expérimental je mets en évidence la spécificité de ciblage actif des cellules tumorales grâce à ces nanoparticules. En effet, les NP Cetux empêchent l'activation de l'EGFR. Cet effet est bien dû à la présence de l'anticorps puisqu'il n'est pas observé avec les NP témoins.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène à savoir que les nanoparticules génèrent un encombrement stérique important au niveau du récepteur empêchant l'EGF d'agir. L'autre hypothèse serait que les nanoparticules présentent de nombreux anticorps Cetuximab en un point, permettant à plusieurs récepteurs EGFR d'être fixés en même temps. Ceci entraîne une clusterisation de l'EGFR et une augmentation de l'internalisation du récepteur. Nous observons ici une faible diminution de l'expression de l'EGFR.



J'ai étudié l'impact du Cetuximab sur les deux voies de signalisation cellulaire majeures issues de l'EGFR, la voie de prolifération cellulaire Erk<sub>1/2</sub> et la voie de survie cellulaire Akt.

Je montre ici que le traitement des cellules tumorales par le Cetuximab seul ou greffé sur les nanoparticules entraîne la perte d'activation de la protéine Erk<sub>1/2</sub> ce qui est en accord avec l'inhibition de l'EGFR.

En revanche, en ce qui concerne l'activation d'Akt, malgré le traitement par le Cetuximab, Akt est activée dans les cellules de CBNPC étudiées. Ce résultat observé est en accord avec celui obtenu par Rebucci et al (Rebucci, Peixoto et al. 2011). De même, l'activation constitutive d'Akt est retrouvée dans des modèles de cancer ORL ou du colon résistant au Cetuximab, que les cellules tumorales soient traitées par du Cetuximab ou au contraire par de l'EGF (Yamatodani, Ekblad et al. 2009).

Ainsi, l'activation d'Akt est devenue un marqueur prédictif de la sensibilité au Cetuximab et la résistance au traitement peut être contournée en ajoutant un traitement anti-Akt (Scartozzi, Giampieri et al. 2012; Takata, Chikumi et al. 2012; Iida, Brand et al. 2013; Jeannot V 2013).

Cependant, l'activation d'Akt suite au traitement par Cetuximab n'est observée que dans le cas du traitement avec le Cetuximab seul et non pas greffé sur des nanoparticules. Je me suis alors posée la question du mécanisme cellulaire mis en jeu qui permet d'activer Akt. Notre groupe a mis en évidence que la résistance des cellules au Gefitinib, inhibiteur de tyrosine kinase, est due à l'activation d'Akt qui contourne l'inhibition de l'activation par l'EGFR en recrutant une protéine IGF1R (Hurbin, Wislez et al. 2011). Or, dans mon expérimentation, j'observe une augmentation de la phosphorylation de la protéine IGF1R, en accord avec l'hypothèse d'un recrutement de la protéine pour activer le mécanisme de résistance cellulaire en contournant la voie d'activation d'Akt. De plus, ce recrutement a lieu uniquement lors du traitement des cellules tumorales par le Cetuximab et non pas par les NP Cetux. L'hypothèse expliquant cette différence d'action est que les NP Cetux génèrent un encombrement stérique important au niveau du récepteur, empêchant le recrutement d'IGF1R.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence une possibilité de ré-activer la sensibilité des cellules au Cetuximab en les traitant par des nanoparticules. Il serait donc intéressant d'évaluer la viabilité cellulaire suite au traitement par les NP Cetux. Les nanoparticules auraient alors un rôle double en ré-activant la sensibilité cellulaire au Cetuximab et en apportant une molécule d'intérêt thérapeutique.

Par ailleurs, en plus de l'action d'inhibition de l'activation de l'EGFR, le Cetuximab entraîne une cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC) en recrutant des effecteurs cytotoxiques grâce au fragment Fc de l'anticorps. Cependant, les cellules H358-Luc utilisées dans mon projet sont KRAS mutées. Or, il a été mis en évidence que la mutation de KRAS entraîne le blocage de l'ADCC *in vitro* (Nakadate, Kodera et al. 2013) et *in vivo* chez des patients porteurs d'un cancer colorectal (Lievre, Bachet et al. 2006). Ainsi, le mécanisme de résistance observé suite au traitement par le Cetuximab dépendrait, outre du recrutement d'IGF1R pour activer Akt, de la mutation de KRAS. Il sera intéressant de vérifier l'impact de la mutation KRAS sur les effets observés et de tester les molécules sur des cellules surexprimant l'EGFR mais n'étant pas KRAS mutées (exemple des cellules de cancer ORL, les Cal33).

Enfin, les expérimentations *in vivo* mettent en évidence qu'il est possible d'administrer le Cetuximab seul ou greffé sur des nanoparticules sous forme de spray intra-trachéal. Dans ce cas, les éléments administrés sont visibles uniquement dans les poumons et ne sont pas agglutinés dans la bifurcation trachéale.

D'après mes expérimentations, la nébulisation de Cetuximab seul a permis une localisation au niveau des cellules tumorales 5 heures après l'administration puis, les anticorps excédentaires ne s'étant pas fixés sont éliminés jusqu'à 24 heures. Le signal reste présent dans le cas des souris avec une tumeur pulmonaire mais il diminue fortement. En revanche, dans le cas de la nébulisation de nanoparticules greffées avec du Cetuximab, nous observons une accumulation pulmonaire des nanoparticules entre 3 heures et 24 heures après l'administration chez la souris porteuse d'une tumeur pulmonaire. Les nanoparticules, en augmentant la taille de l'élément administré, augmentent le temps de rémanence du Cetuximab au niveau pulmonaire ce qui permet d'améliorer la probabilité de fixation sur le tissu tumoral pulmonaire.

Les effets observés avec l'utilisation des nanoémulsions découlent des propriétés intrinsèques de ce type de nanoparticules. En effet, la nébulisation nécessite d'avoir une solution homogène. Or les solutions de nanoémulsions ont une bonne stabilité puisque la petitesse des gouttelettes limite leur adhésion et le mouvement Brownien devient alors prédominant favorisant l'homogénéité de la dispersion. En effet, l'adhésion des gouttes étant limitée par la très forte courbure de leur interface, leur temps de contact est considérablement réduit et la

probabilité de coalescence est diminuée. Ce phénomène est d'autant plus marqué que l'interface des particules est chargée, favorisant la répulsion électrostatique, ou bien, comme dans notre cas, expose de longues chaînes de polymères hydrophiles, favorisant la répulsion par gêne stérique (Couffin AC march 2013).

Par ailleurs, la toxicité des nanoparticules est un élément essentiel pour leur utilisation comme outil théranostique. En effet, certains types de nanoparticules peuvent entraîner une inflammation et potentiellement le développement de maladies inflammatoires. Or, le poumon étant un organe vital, il est important de ne pas aggraver l'inflammation déjà présente à cause de la tumeur. C'est pour cela que les nanoémulsions testées sont élaborées à partir de lipides naturels, biodégradables, présents sur la liste *Inactive Ingredient Guide* qui ne sont pas toxiques par eux-mêmes. De plus, les nanoparticules lipidiques sont moins toxiques que les nanoparticules à base de polymères.

Cependant, des études ont mis en évidence que les nanoparticules ont une tendance à s'accumuler dans le foie, entraînant une toxicité (Parveen, Misra et al. 2012; Couffin AC march 2013). Dans mon projet, j'utilise les nanoparticules sous forme de spray intra-trachéal et je n'observe qu'un passage hépatique transitoire qui disparaît au bout de 24 heures ; aucune toxicité hépatique n'est constatée au moment du sacrifice.

Choi et al. ont évalué l'impact de la taille et de la charge des nanoparticules administrées par voie pulmonaire sur la translocation depuis le compartiment pulmonaire vers le circuit lymphatique et la circulation sanguine. Ils ont mis en évidence que les toutes petites nanoparticules (< 6 nm) se retrouvent rapidement dans la circulation lymphatique puis sanguine avant d'être éliminées par voie rénale. Elles ne peuvent donc pas être un outil théranostique. De même, pour les nanoparticules dont la taille se situe entre 34 et 48 nm qui se retrouvent dans la circulation lymphatique 30 minutes après leur administration. Au contraire, les nanoparticules plus grosses (100 nm) ont une faible absorption systémique (Choi, Ashitate et al. 2010) et peuvent être un outil théranostique. Ainsi, dans notre étude, nous avons décidé d'utiliser des nanoparticules de 80 nm afin de cumuler les avantages d'élimination des particules de taille moyenne et ceux des nanoparticules de grosse taille qui ont une faible absorption systémique et donc une rétention pulmonaire suffisante pour améliorer leur probabilité de fixation sur les nodules tumoraux. Cependant, il sera intéressant d'étudier leur biodistribution dans les temps précoces suivant leur administration afin d'évaluer le temps et la voie d'élimination.

Enfin, l'intérêt majeur des nanoémulsions comme outil théranostique est l'encapsulation possible des éléments nécessaires au diagnostic et/ou à la thérapie. Ainsi, l'encapsulation du fluorophore limite son photoblanchiment dû à son incorporation dans le cœur lipidique. De même, les nanoémulsions offrent la possibilité d'encapsuler des molécules hydrophobes dans le cœur de la particule, des molécules amphiphiles dans la membrane et des molécules hydrophiles à la surface, offrant un large choix pour l'utilisation de molécules thérapeutiques.

De plus, les nanoémulsions permettent un meilleur taux d'encapsulation et donc une plus grande quantité de molécules thérapeutiques dans la capsule que les nanoparticules lipidiques solides, car la cristallisation des lipides conduit généralement à l'expulsion d'une grande partie des molécules initialement encapsulées (Parveen, Misra et al. 2012; Couffin AC march 2013).

## Chapitre 3 :

Utilisation d'un vecteur synthétique de  
petite taille comme outil théranostique :  
le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>

## 1 Objectifs du projet

Le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> est une molécule développée par notre groupe en collaboration avec une équipe de chimistes du Département de Chimie Moléculaire de Grenoble (Dr Didier Boturyn, Grenoble, France). Cette molécule de petite taille est une plateforme de greffage sur laquelle quatre groupements tripeptidiques RGD, permettant de cibler les intégrines  $\alpha\beta_3$ , sont fixés sur la face supérieure, entraînant ainsi l'internalisation de la molécule dans les cellules néo-endothéliales et cancéreuses. La fixation d'un fluorophore sur le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> permet de l'utiliser comme outil diagnostique ou comme outil d'assistance à la chirurgie. Il a notamment fait la preuve de son intérêt pour l'aide à la chirurgie de fibrosarcomes spontanés chez le chat (Wenk, Ponce et al. 2013). En effet, suite à une administration systémique ou péritonéale, la petite taille de la molécule va lui permettre de diffuser aisément dans l'organisme pour se fixer sur les cellules exprimant l'intégrine  $\alpha\beta_3$  et d'être internalisée. Les intégrines  $\alpha\beta_3$  étant surexprimées sur les cellules néo-endothéliales et sur les cellules cancéreuses, nous observons ainsi un marquage fluorescent des tumeurs et des métastases présentes dans l'organisme.

D'autre part, le potentiel thérapeutique du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> a été précédemment étudié après couplage à un peptide pro-apoptotique, (KLAKLAK)<sub>2</sub>. Il a été montré que le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-(KLAKLAK)<sub>2</sub> cible de manière spécifique les cellules d'adénocarcinome ovarien humain (IGROV1) exprimant l'intégrine  $\alpha\beta_3$  et permet une libération du peptide pro-apoptotique qui pourra exercer son activité au niveau de la mitochondrie. De plus, il diminue la croissance de tumeurs implantées en sous-cutanée chez des souris après une administration intra-péritonéale (Dufort, Sancey et al. 2011). Cependant, comme une seule molécule thérapeutique peut être fixée sur un RAFT, nous avons un ratio de 1 vecteur pour 1 molécule apoptotique et donc peu d'effet si le peptide vectorisé n'est pas fortement toxique.

Notre groupe a étudié l'importance du rôle de Bax dans la voie apoptotique mitochondriale (Coll, Negoescu et al. 1998; Dubrez, Coll et al. 2001; Hurbin, Coll et al. 2005).

Nous collaborons avec le groupe du Dr Abdel Aouacheria (Lyon, France) pour développer des peptides pro-apoptotiques dérivant de Bax ayant un meilleur potentiel pro-apoptotique que la séquence (KLAKLAK)<sub>2</sub> et entraînant la formation de pores dans les membranes mitochondriales (ces peptides sont appelés « poro ») (Valero, Sancey et al. 2011).

Le projet PoroCombo (« Poro » pour pore et « Combo » pour combiné avec le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>) a permis le développement de deux séquences peptidiques issues de Bax (poro 1 et

poro 2) puis à leur couplage avec le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> (réalisé par le groupe du Dr Didier Boturyn).

Ce projet de thèse a consisté dans un premier temps à évaluer *in vitro* l'impact de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses et à analyser l'impact sur l'apoptose et plus particulièrement sur la voie mitochondriale. Dans un deuxième temps, j'ai réalisé des tests *in vivo* de la molécule (en collaboration avec le Dr Caroline Aspod, EFS, Grenoble, France) afin d'évaluer son impact sur l'évolution du volume tumoral et des caractéristiques histologiques de la tumeur.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un modèle de tumeur sous-cutanée de mélanome implantée chez la souris SCID humanisée. En effet, d'une part les tumeurs sous-cutanées sont accessibles par le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>, même lorsque la molécule est administrée par voie intrapéritonéale, et le volume tumoral est facilement mesurable. D'autre part, l'utilisation de souris SCID humanisées permet d'étudier des phénomènes immunologiques de *cross presentation* pouvant survenir si la mort des cellules tumorales entraînée par les peptides PoroCombo est immunogène et conduit à une réponse immunitaire (projet du Dr Caroline Aspod, Grenoble, France).

## 2 Résultats

### 2.1 Evaluation du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> comme outil diagnostique

Afin d'utiliser le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> comme outil théranostique, j'ai dans un premier temps évalué sa capacité diagnostique de ciblage des cellules tumorales après une administration systémique.

Pour cela, j'ai utilisé dix souris SCID porteuses de tumeurs de mélanome sous-cutanées, avec six souris porteuses de tumeurs A375 et quatre souris porteuses de tumeurs Colo829.

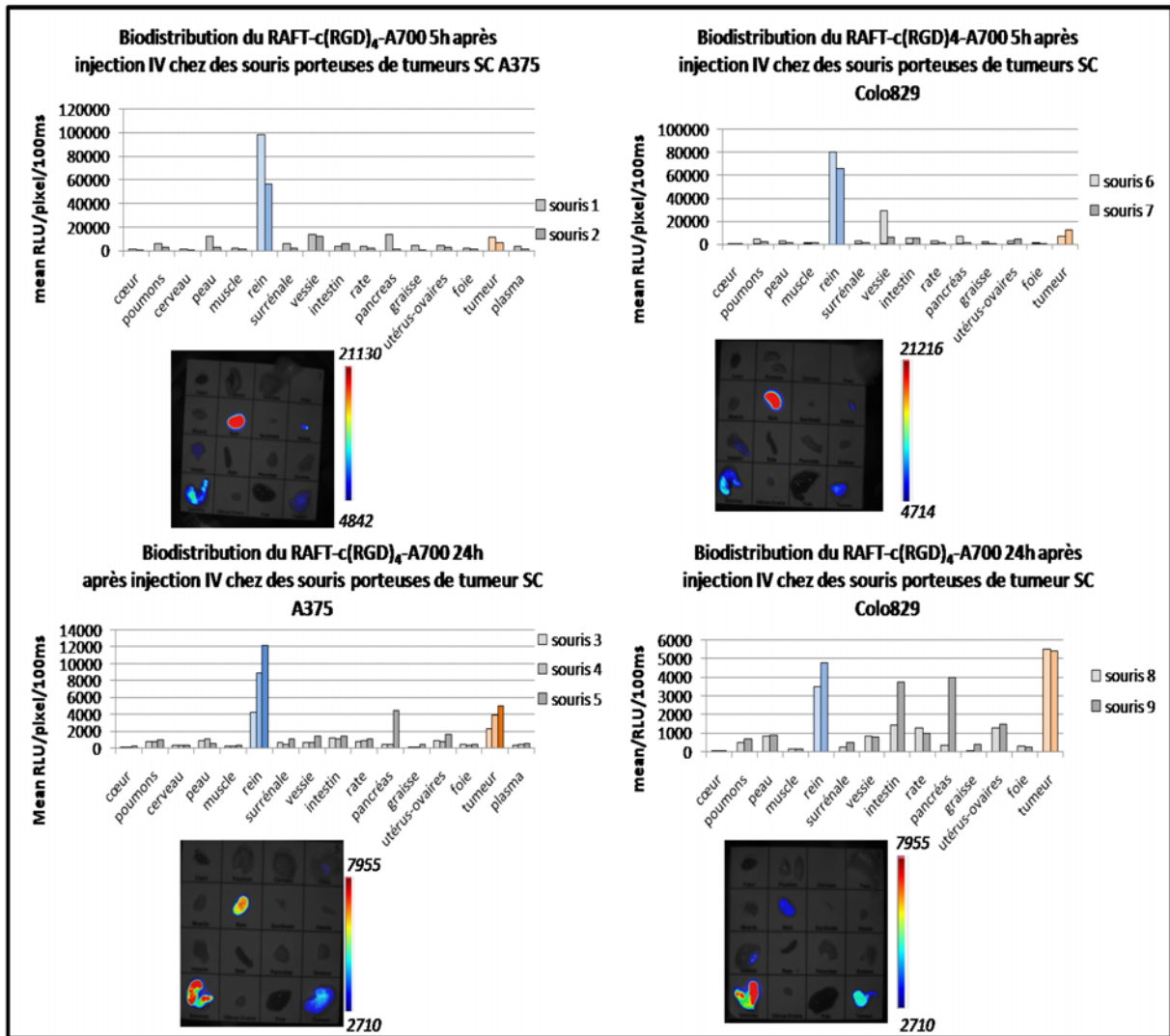
Six jours après l'implantation tumorale, 200µL de RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-Alexa 700 à 50µM sont administrés par voie intraveineuse chez les différentes souris. Cinq heures après injection, la moitié des souris de chaque groupe est sacrifiée et la biodistribution du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> est évaluée par mesure de la fluorescence des organes en 2D-FRI. Vingt-quatre heures après injection, l'autre moitié de chaque groupe de souris est sacrifiée et la fluorescence est mesurée.

D'après nos résultats (Figure 34), cinq heures après injection la tumeur est marquée en fluorescence et nous observons un fort marquage des reins alors que vingt-quatre heures après injection, l'augmentation du signal de fluorescence au niveau de la tumeur met en évidence une accumulation de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-A700 dans la tumeur alors que le marquage rénal diminue.

Le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> est éliminé par voie rénale, ce qui explique un marquage des reins important dans les temps précoces (5 heures) suivant l'administration de la molécule.

Les tumeurs sont bien marquées chez les différentes souris tout particulièrement vingt-quatre heures après injection. Le marquage du pancréas pour les souris 1, 5 et 9 et de l'intestin chez la souris 9 correspond à des métastases pancréatiques et intestinales (Figure 34).





**Figure 34: Evaluation de la biodistribution du RAFT-RGD-A700 *in vivo* et *ex vivo***

200µL de RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-Alexa700 50µM sont injectés par voie intraveineuse chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées de mélanome humain de la lignée A375 (n=5 souris ; graphiques de gauche) ou Colo829 (n=4 souris ; graphiques de droite). La fluorescence des organes est visualisée *ex vivo* en 2D-FRI (Hamamatsu, Photonics) 5 heures (graphiques du haut) ou 24 heures (graphiques du bas) après injection du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-Alexa700.

Le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-A700 est donc un bon outil diagnostique permettant de cibler les tumeurs et les métastases après une administration par voie systémique.

## 2.2 Etude des peptides pro-apoptotiques issus de Bax : poro 1 et poro 2

Afin de conférer des propriétés thérapeutiques au RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> pour en faire un outil théranostique, nous le couplons à un peptide pro-apoptotique pour le vectoriser au niveau des cellules tumorales où il sera internalisé.

Dans l'objectif d'améliorer la toxicité du peptide pro-apoptotique, nous collaborons avec l'équipe du Dr Abdel Aouacheria pour développer des peptides issus de Bax qui agissent sur la voie mitochondriale en créant des pores dans la membrane mitochondriale externe. Ainsi, à partir de la séquence de Bax de 23KDa, un peptide poro 1 de 29 acides aminés a été élaboré à partir de la séquence responsable de la formation de pores. Par la suite, un peptide plus court de 16 acides aminés, poro 2, a été élaboré à partir de poro 1 (Figure 35 A).

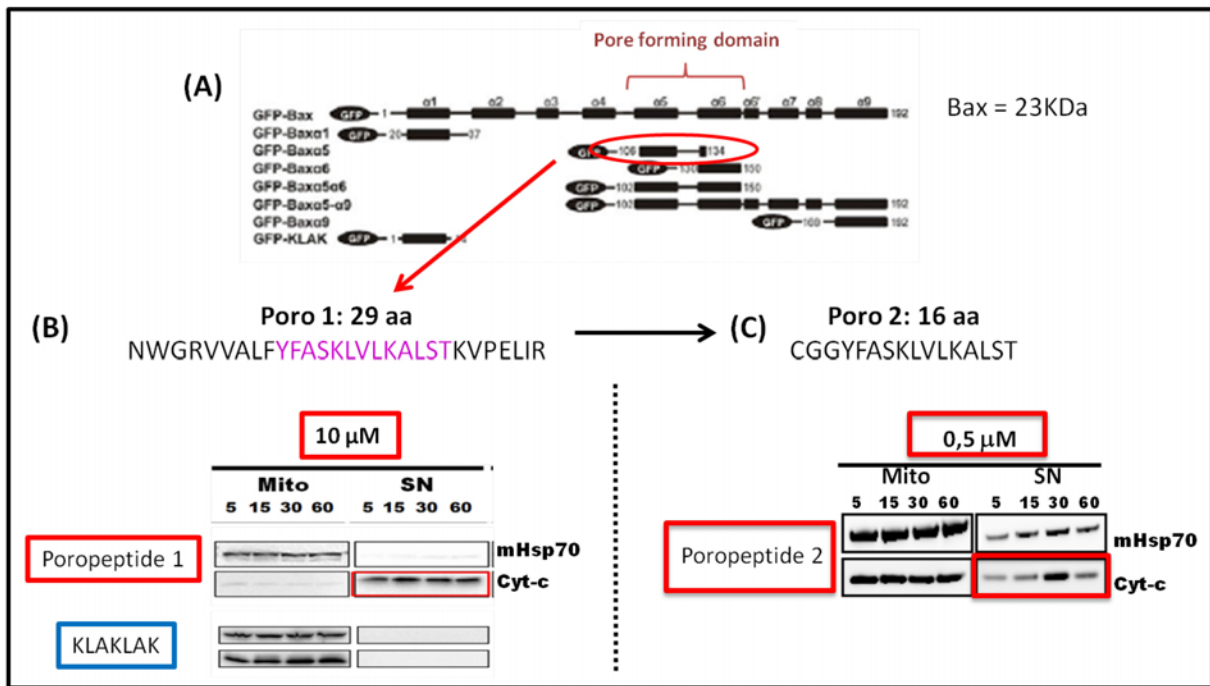
Dans un premier temps, l'efficacité des peptides poro 1 et poro 2 a été évaluée sur des mitochondries isolées.

La synthèse des peptides « poro » a été réalisée par le groupe du Dr Gilles Subra (Montpellier, France) alors que le choix de la séquence et le test de l'efficacité des peptides sur les mitochondries isolées ont été réalisés par le groupe du Dr Abdel Aouacheria (Lyon, France).

Notre but étant d'améliorer l'efficacité du peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)<sub>2</sub>, les tests d'efficacité ont été effectués en comparaison avec celle de (KLAKLAK)<sub>2</sub>.

L'équipe du Dr Aouacheria a extrait les mitochondries des cellules de mélanome humain et a mis les peptides pro-apoptotiques à leur contact. La formation de pores dans la membrane mitochondriale entraîne le relargage du cytochrome c dans le surnageant. Ainsi, ils ont testé poro 1 à différentes concentrations pour évaluer par Western blot à partir de quelle quantité ils obtiennent un relargage du cytochrome-c. D'après les résultats obtenus, l'utilisation du poro 1 à 10µM entraîne un relargage du cytochrome-c, ce qui n'est pas le cas avec la séquence (KLAKLAK)<sub>2</sub> (Figure 35 B).

Le potentiel pro-apoptotique de poro 1 est donc plus puissant que celui de (KLAKLAK)<sub>2</sub>. Néanmoins, ils ont essayé de l'améliorer en créant une séquence poro 2, issue de poro 1, qui soit plus courte et plus efficace que son prédécesseur. La séquence poro 2 est constituée de 16 acides aminés. L'évaluation par Western blot de l'efficacité de poro 2 sur des mitochondries isolées révèle que ce peptide entraîne le relargage du cytochrome-c quand il est utilisé à 0,5µM ; il est donc vingt fois plus efficace que poro 1 (Figure 35 C).



**Figure 35 : Etude de l'efficacité des peptides « poro 1 » et « poro 2 » issus de Bax sur la formation de pores dans la membrane mitochondriale**

(A) schéma représentant le développement de poro 1 et de poro 2 à partir de la séquence de Bax. (B) Etude par Western blot de la libération du cytochrome c de la mitochondrie (Mito) vers le surnageant (SN) suite au traitement des mitochondries isolées avec le peptide poro 1 à 10µM et en fonction du temps (5, 15, 30 et 60 minutes), en comparaison avec le peptide (KLAKLAK)<sub>2</sub> (KLAK). (C) Etude de la libération du cytochrome c de la mitochondrie (Mito) vers le surnageant (SN) suite au traitement des mitochondries isolées avec le peptide poro 2 à 0,5µM en fonction du temps (5, 10, 30 et 60 minutes). mHsp70 est un marqueur de la matrice mitochondriale.

Figure et résultats du groupe du Dr Abdel Aouacheria, Lyon, France

Ainsi, le travail de nos collaborateurs a permis d'identifier un peptide pro-apoptotique puissant, poro 2, qui, une fois administré à l'intérieur de la cellule ciblée, pourra entraîner la formation de pores mitochondriaux et, par suite, l'apoptose cellulaire.

### 2.3 Synthèse des composés PoroCombo

Le groupe du Dr Didier Boturyn (Grenoble, France) maîtrise la synthèse du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> depuis une dizaine d'années. Dans le cadre du projet PoroCombo, ils ont utilisé la même méthode de synthèse que celle utilisée pour le composé RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-(KLAKLAK)<sub>2</sub> en remplaçant le (KLAKLAK)<sub>2</sub> par le peptide poro 2, lui-même synthétisé par le groupe du Dr Gilles Subra (Montpellier, France). Le peptide poro 2 est relié au RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> par un pont disulfure. Grâce à cette liaison, une fois la molécule internalisée dans la cellule, le pont disulfure sera réduit et le peptide sera relargué dans le cytosol. Le relargage du peptide après

internalisation cellulaire a été étudié par notre groupe dans la précédente étude de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-(KLAKLAK)<sub>2</sub> en utilisant une technique de FRET (Dufort, Sancey et al. 2011).

La synthèse présentée est le travail de Michaël Claron sous la direction du Dr Didier Boturyn. La plateforme peptidique RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> est synthétisée en accrochant les différents acides aminés du RAFT de façon linéaire sur une bille de résine. Les groupements RGD cycliques sont liés à leur acide aminé (lysine) avant liaison à la chaîne linéaire accrochée sur la résine. La chaîne d'acides aminés du RAFT est décrochée de la résine et la déprotection en milieu acide dilué permet la cyclisation pour former la plateforme peptidique RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>. Enfin, le propeptide poro 2 ou le peptide poro témoin est fixé par un pont disulfure sur la face inférieure du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>. Nous obtenons ainsi la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 ou RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-porotémoin (Figure 36).

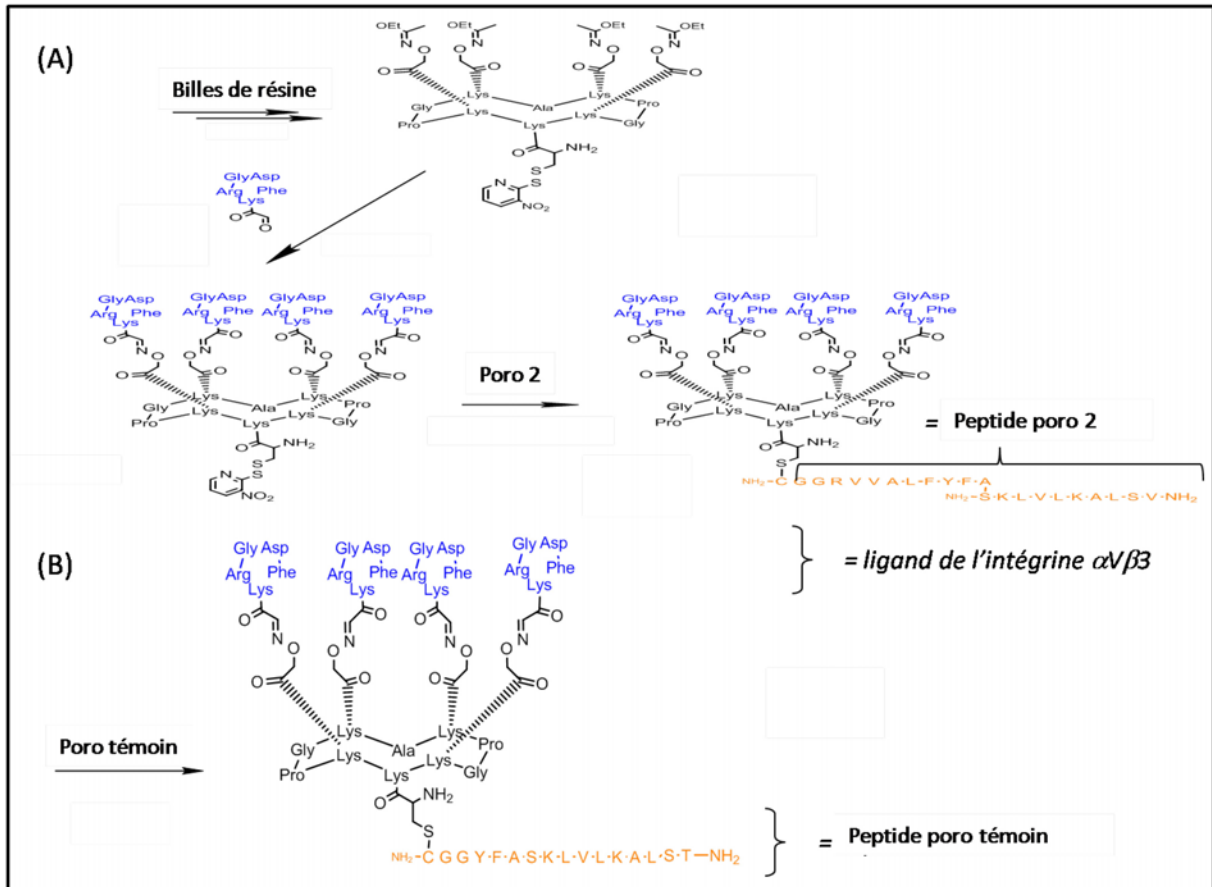


Figure 36 : Synthèse des composés PoroCombo

La molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 et la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-porotémoin ont été synthétisées avec une méthode bien établie qui consiste à synthétiser la plateforme RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> en utilisant des billes de résine. Puis les peptides poro 2 et poro témoin (synthétisés par le Dr Gilles Subra, Montpellier, France) sont greffés sur la plateforme peptidique RAFT.

La figure et la synthèse ont été réalisées par Michaël Claron (groupe du Dr Didier Boturyn, Grenoble, France).

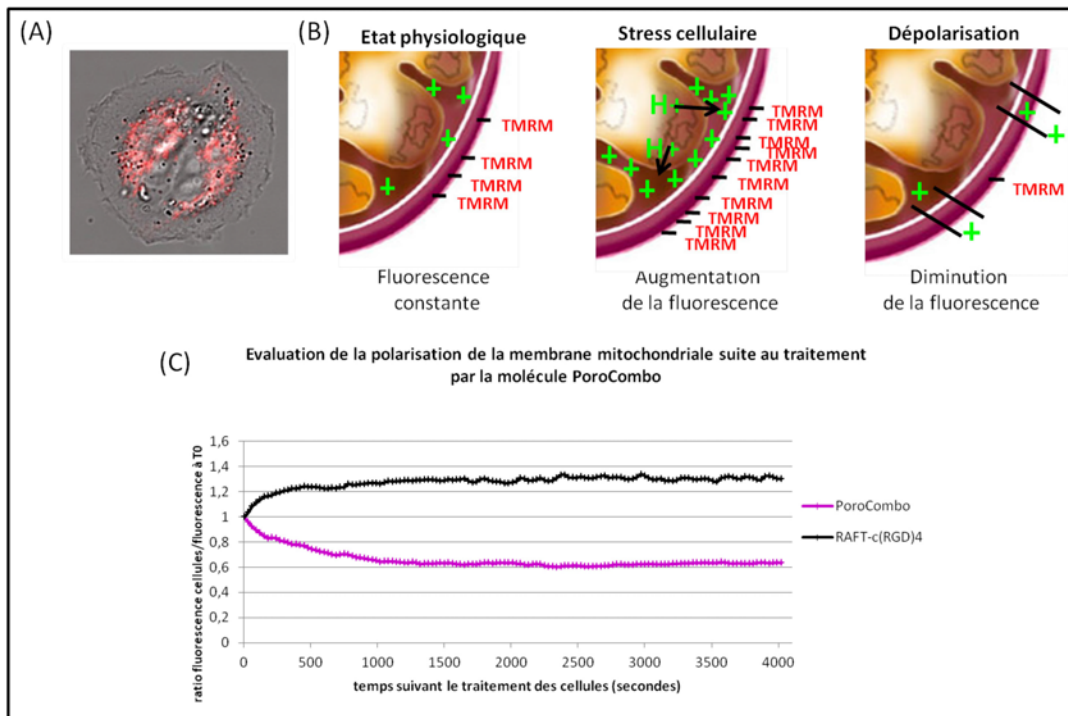
## **2.4 Evaluation de l'impact de la molécule sur la membrane mitochondriale**

Le peptide poro 2 entraîne la dépolarisation de la membrane mitochondriale en créant des pores dans la membrane mitochondriale externe.

Afin de détecter la formation de pores mitochondriaux suite au traitement des cellules par les molécules PoroCombo, j'ai marqué les cellules avec du TMRM et suivi la fluorescence au cours du temps en microscopie confocale. Une augmentation de la fluorescence reflèterait un stress cellulaire alors que la perte massive de fluorescence mettrait en évidence la formation de pores mitochondriaux.

J'ai évalué l'impact de la molécule PoroCombo RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 sur la polarisation de la membrane mitochondriale par suivi de la fluorescence mitochondriale au cours du temps par microscopie confocale. Les cellules de mélanome humain Colo829 sont traitées avec 10µM de molécule. L'évolution de la fluorescence est évaluée au cours de la première heure suivant le traitement.

D'après mes résultats, le traitement des cellules Colo829 par la molécule témoin a entraîné une augmentation de 30% de la fluorescence au cours de la première heure de traitement. Cette augmentation reflète un stress cellulaire et a principalement lieu durant les quinze premières minutes après le début du traitement. Inversement, le traitement des cellules par la molécule PoroCombo a entraîné une diminution de 40% de la fluorescence de la membrane mitochondriale au cours des vingt-cinq premières minutes avec un ratio de fluorescence de 1 au moment du traitement qui passe à 0.6 1500 secondes (soit vingt-cinq minutes) après le début du traitement (Figure 37 C). Cette diminution reflète la fuite des protons de l'espace intermembranaire mitochondrial et donc la formation de pores dans la membrane mitochondriale externe.



**Figure 37 : Evaluation de l'impact des molécules PoroCombo sur la dépolarisation de la membrane mitochondriale**

Les cellules Colo 829 sont ensemencées dans des LabTek® 8 puits, sont marquées avec du TMRM et observées en microscopie confocale. (A) image au microscope confocal avec un grossissement x63 d'une cellule Colo829 dont les mitochondries sont marquées avec du TMRM (rouge), (B) principe de l'évolution de la fluorescence du TMRM après fixation mitochondriale selon l'état physiologique de la cellule, (C) suivi au cours du temps par microscopie confocale avec un grossissement x20 de la fluorescence du TMRM après traitement des cellules avec 10µM de molécule PoroCombo. La condition témoin est le traitement par le vecteur RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> seul.

D'après ces résultats, la molécule PoroCombo entraîne la formation de pores dans la membrane mitochondriale. De plus, le traitement par le vecteur seul RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> n'entraîne pas la formation de pores. Ainsi l'effet observé est dû à la présence du peptide pro-apoptotique Poro 2. Par ailleurs, ces résultats mettent en évidence que la molécule PoroCombo a bien été internalisée et le peptide poro 2 libéré puisqu'il a réagi avec les mitochondries.

## 2.5 Impact du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 sur la viabilité cellulaire

### 2.5.1 Evaluation de la viabilité cellulaire

Une fois la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 développée et synthétisée par les chimistes, mon objectif a été d'évaluer son impact sur la viabilité cellulaire.

J'ai évalué la viabilité cellulaire de trois lignées de mélanome humain, à savoir les cellules Colo829, Me275 et A375, suite au traitement par la molécule PoroCombo. Ces lignées ont des caractéristiques immunologiques différentes en exprimant plus ou moins l'antigène Mélana permettant une réponse des cellules dendritiques et donc une *cross presentation* (projet du Dr Caroline Aspord).

La veille du traitement, les cellules sontensemencées en plaques 96 puits. Elles sont traitées pendant 24 heures avec la molécule PoroCombo à différentes concentrations.

La viabilité cellulaire est déterminée grâce à l'utilisation d'un test MTT qui met en évidence l'activité mitochondriale de la cellule.

D'après les résultats obtenus (Figure 38), la molécule PoroCombo a un impact sur la viabilité cellulaire en la diminuant proportionnellement à la concentration utilisée, et ce, quelle que soit la lignée cellulaire étudiée.

Ainsi, pour les cellules Colo829 et Me275, la viabilité cellulaire est de 80% lors d'un traitement à 1µM et elle diminue progressivement pour atteindre 40% avec un traitement à 10µM. 60% des cellules sont donc mortes au bout de vingt-quatre heures avec cette concentration.

Dans le cas des cellules A375, suite au traitement par la molécule PoroCombo, nous observons une viabilité de 30% pour les cellules recevant 1µM à 5µM de traitement. En revanche, après un traitement à 10µM, moins de 20% des cellules sont viables (Figure 38).

La perte de viabilité des cellules A375 pour un traitement entre 1µM et 5µM peut être due au décollement des cellules suite au traitement par le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> (Figure 38).

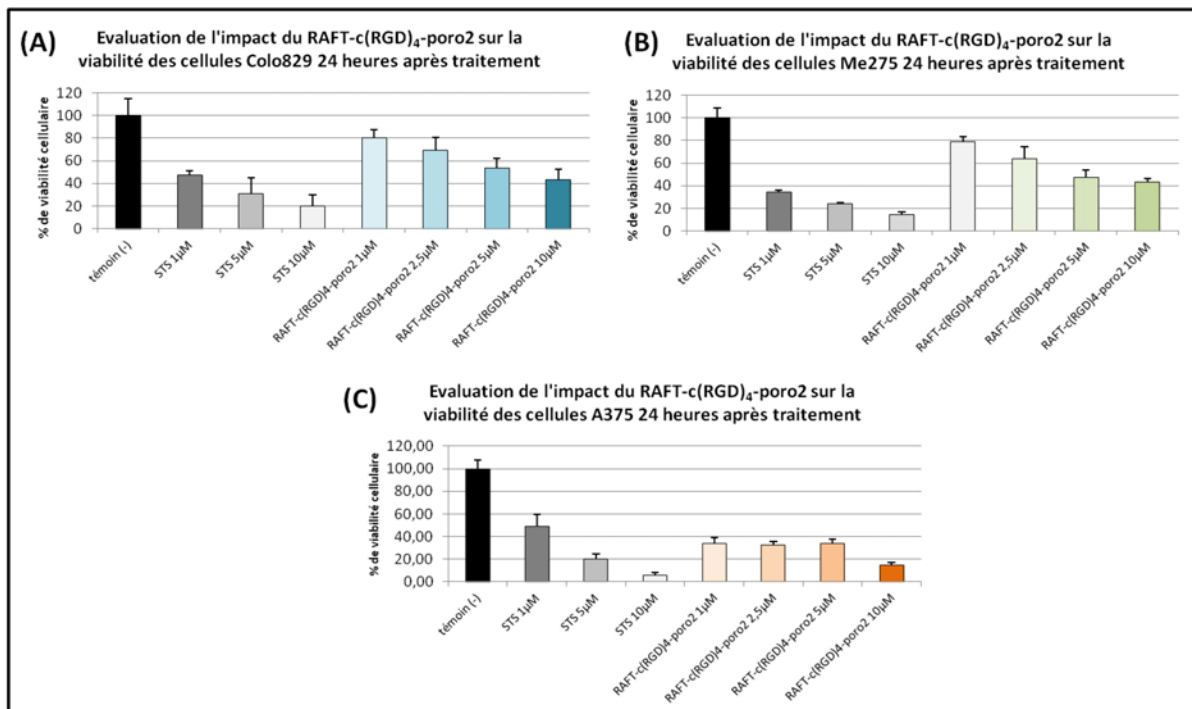


Figure 38 : Impact des molécules PoroCombo sur la viabilité cellulaire

1,5x10<sup>4</sup> cellules de mélanome humain sontensemencées dans des plaques 96 puits. Les cellules sont traitées pendant 24 heures avec les molécules PoroCombo à différentes concentrations ou avec la staurosporine (STS) témoin positif pro-apoptotique. Un test MTT est réalisé afin d'évaluer la viabilité cellulaire des cellules de mélanome humain (A) Colo829, (B) Me275, (C) A375.

En conclusion, je montre avec ces résultats que la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 entraîne une forte diminution de la viabilité cellulaire dans le cas des trois lignées de mélanome étudiées.

### 2.5.2 Mécanismes impliqués dans l'impact sur la viabilité cellulaire

Nous avons montré précédemment que la molécule PoroCombo entraîne une diminution de la viabilité cellulaire dans le cas des trois lignées de mélanome humain étudiées.

Mon objectif est de déterminer le mécanisme mis en jeu au niveau cellulaire.

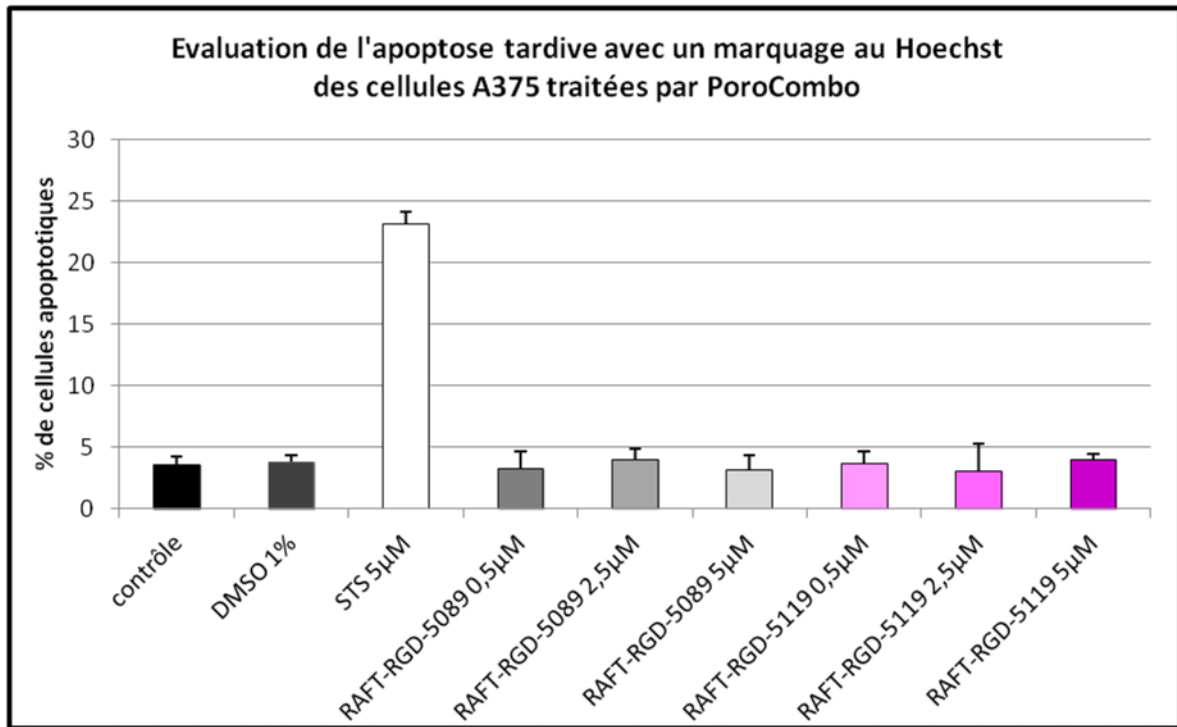
#### 2.5.2.1 Evaluation de l'apoptose tardive : marquage au Hoechst

J'ai dans un premier temps évalué l'apoptose tardive, c'est-à-dire la formation de corps apoptotiques d'ADN dans le noyau cellulaire. Pour cela, j'ai traité les cellules de mélanome humain A375 pendant vingt-quatre heures par la molécule PoroCombo ou par la molécule présentant un peptide témoin, à différentes concentrations.

Après un marquage au Hoechst, le pourcentage de cellules apoptotiques est évalué par comptage.

D'après les résultats obtenus, le traitement des cellules par la staurosporine 5µM, témoin positif, entraîne la formation de corps apoptotiques chez 23% des cellules traitées. En revanche, dans le cas des cellules traitées par la molécule PoroCombo nous observons moins de 5% de cellules apoptotiques, et ce quelle que soit la concentration utilisée. Ce pourcentage correspond à celui observé pour les témoins négatifs avec les cellules non-traitées ou avec les cellules traitées par la molécule PoroCombo témoin (Figure 39).





**Figure 39 : Evaluation de l'apoptose tardive suite au traitement par molécules PoroCombo**

Les cellules de mélanome humain A375 sontensemencées à raison de  $1,5 \times 10^4$  cellules/puits. Les cellules sont traitées pendant 24 heures par les molécules PoroCombo avec « 5119 » peptide poro 2 et « 5089 » peptide témoin ou par la staurosporine (STS) témoin positif pro-apoptique. Les cellules sont marquées par du Hoechst. et 300 noyaux cellulaires sont comptés en distinguant ceux présentant des corps apoptotiques et ceux n'en présentant pas.

Ces résultats ne mettent pas en évidence d'apoptose cellulaire. Cependant le marquage au Hoechst évalue l'apoptose tardive des cellules. Nous évaluerons donc l'apoptose par d'autres méthodes.

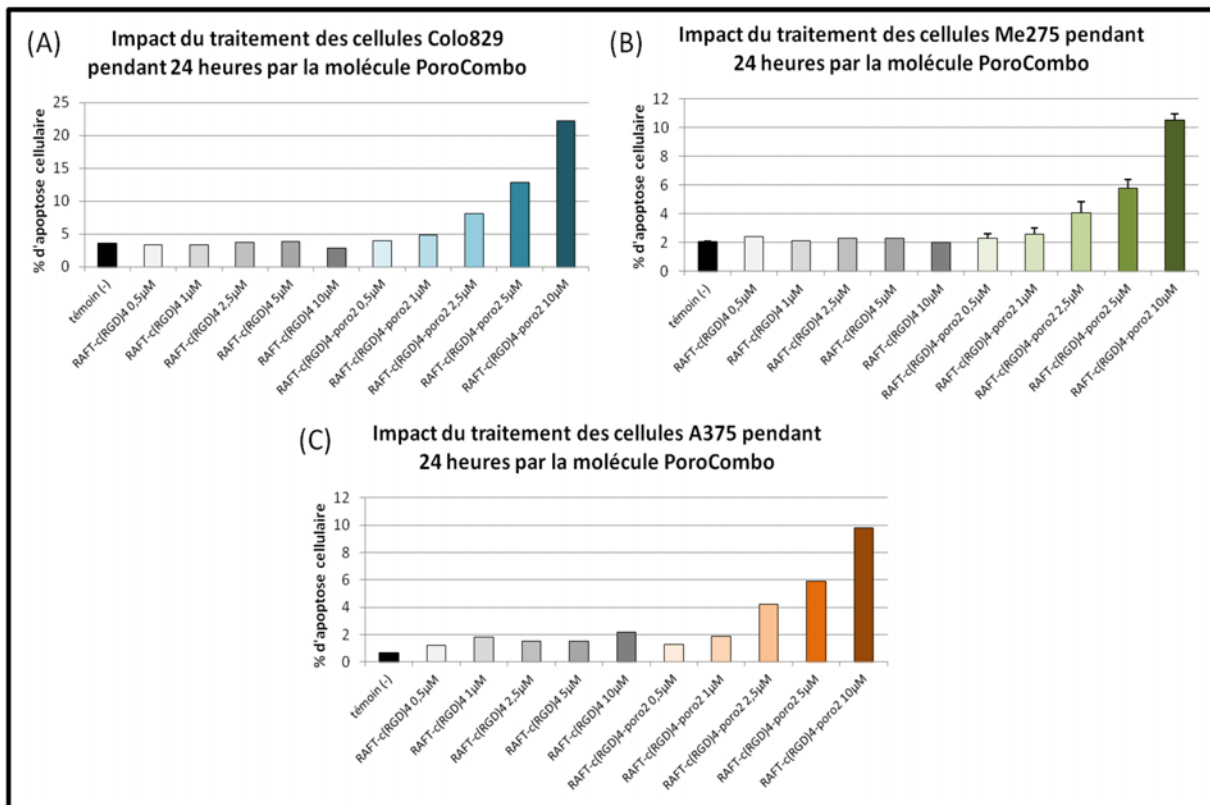
#### 2.5.2.2 Evaluation de l'activation des voies apoptotiques : marquage de la caspase 3 active

La caspase 3 est une protéine clef de l'apoptose commune aux différentes voies de l'apoptose. Ainsi, afin d'évaluer si la diminution de la viabilité cellulaire des cellules traitées par la molécule PoroCombo est bien due à l'apoptose cellulaire, j'ai évalué l'activation de la Caspase 3 par cytométrie en flux.

D'après les résultats obtenus, le traitement par la molécule PoroCombo a un impact sur l'apoptose cellulaire en l'augmentant proportionnellement à la concentration moléculaire

utilisée. En effet, le traitement des cellules Me275 et A375 entraîne une activation de la caspase 3 chez plus de 4% des cellules lors d'un traitement à 2,5µM ; cette activation augmente jusqu'à plus de 10% lors d'un traitement à 10µM. En ce qui concerne le traitement des cellules Colo829, l'effet sur l'activation de la caspase 3 est beaucoup plus important puisque 7% des cellules ont la caspase 3 activée après un traitement avec la molécule PoroCombo à 2,5µM. Cette activation augmente proportionnellement avec la concentration utilisée pour atteindre 22% d'activation après un traitement à 10µM.

En revanche, le traitement des cellules par la molécule témoin RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> ne présentant pas de peptide pro-apoptotique n'entraîne pas d'activation de la caspase 3 et ce, quelle que soit la lignée cellulaire étudiée et quelle que soit la concentration en molécule utilisée (Figure 40).



**Figure 40: Evaluation de l'activation de la Caspase 3 suite au traitement par la molécule PoroCombo**

Les cellules de mélanome humain Colo829 (A), Me275 (n= 2) (B) et A375 (C) sont ensemencées en plaques 12 puits à raison de  $1.2 \times 10^5$  cellules/puits et sont traitées par la molécule PoroCombo pendant 24 heures. La molécule PoroCombo est nommée RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 alors que les témoins sont traités par le véhicule seul soit RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>. Les cellules sont marquées avec un anticorps anti-caspase 3 active, marqué Phycoérythrine, et analysées en cytométrie en flux.

En conclusion, nous pouvons en déduire que l'effet d'activation de la caspase 3 suite au traitement par la molécule PoroCombo est bien dû au peptide pro-apoptotique poro2 et non pas à son vecteur le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>.

### 2.5.2.3 Evaluation de la mort cellulaire

Afin d'évaluer la mort cellulaire en général et non pas seulement l'apoptose, j'ai réalisé un comptage cellulaire au bleu de Trypan.

Pour cela, les cellules A375 sont traitées pendant 24 heures par la molécule PoroCombo à 2.5µM et 5µM en comparaison avec la molécule poro témoin (RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-porotémoin) aux mêmes concentrations.

Le traitement des cellules avec la molécule poroCombo à 5µM entraîne la mort de 30% des cellules alors que le traitement avec la staurosporine 5µM entraîne la mort de 40% des cellules traitées.

En revanche, le traitement par la molécule Poro témoin à 2.5µM ou 5µM ou par la molécule PoroCombo à 2.5µM n'entraîne pas plus de mort cellulaire que dans le cas des cellules non-traitées (Figure 41)

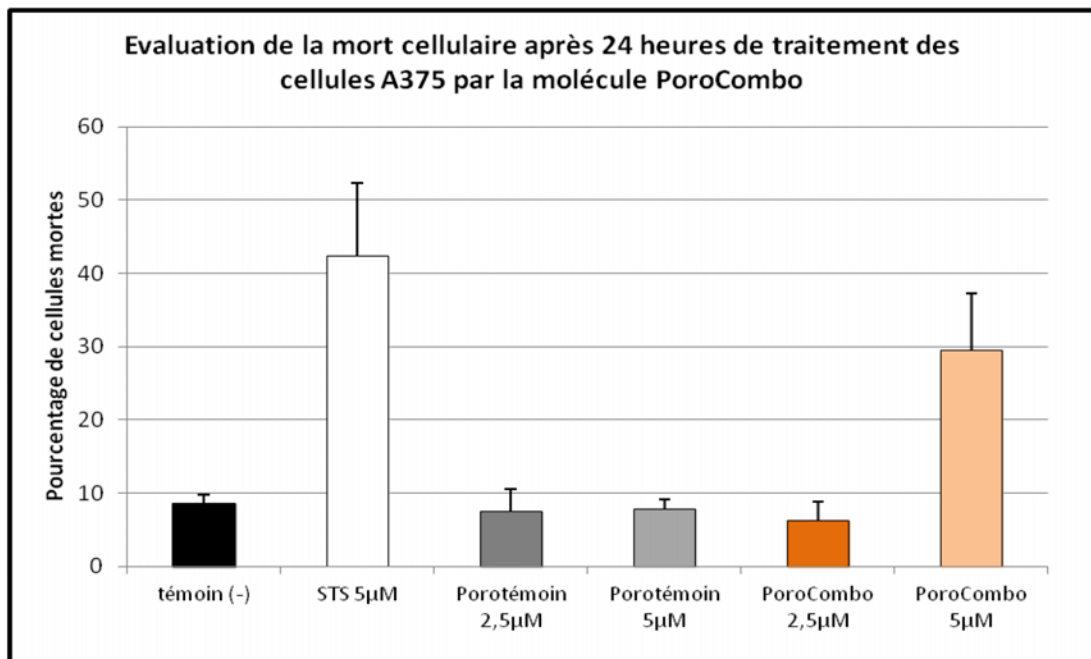


Figure 41 : Evaluation de la mort cellulaire par marquage au bleu de Trypan après traitement par la molécule PoroCombo

Le témoin positif pro-apoptotique est la staurosporine (STS) alors que le Porotémoin est une molécule de RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> sur laquelle est greffée une version tronquée du peptide poro2.

Ainsi, nous montrons dans cette expérience que l'utilisation de la molécule PoroCombo entraîne la mort cellulaire et cet effet est dû à la présence du peptide poro 2 en quantité suffisante. Nous montrons donc avec ce résultat que l'effet observé sur la viabilité cellulaire n'est pas seulement dû à de l'apoptose puisque le pourcentage de cellules mortes observé est supérieur à celui obtenu avec le marquage de la caspase 3 pour un traitement à la même concentration.

## 2.6 Evaluation *in vivo* de l'impact du RAFT-(cRGD)<sub>4</sub>-poro2 comme outil thérapeutique

Le but du développement du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 comme outil théranostique est de l'utiliser *in vivo* pour la prise en charge de tumeurs. Les tests *in vitro* nous ont permis de vérifier que cette molécule permet la diminution de la viabilité des cellules traitées alors que les tests *in vivo* de biodistribution nous ont permis de confirmer que le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> cible les cellules tumorales et métastatiques après une administration systémique dans notre modèle de souris.

Ainsi, la poursuite de mon projet de thèse a consisté à évaluer l'impact de la molécule PoroCombo après une administration systémique chez des souris porteuses de tumeurs de mélanome humain sous-cutanées.

### 2.6.1 Protocole

Les tests *in vivo* de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 ont été réalisés conjointement avec notre collaborateur le Dr Caroline Aspod (EFS, Grenoble, France) qui travaille sur la *cross presentation* des tumeurs par le système immunitaire dans un modèle de souris SCID humanisées.

Six souris SCID âgées de quatre semaines sont irradiées puis des cellules humaines CD34+, permettant de reconstituer le système immunitaire, sont administrées. Douze semaines après l'administration des cellules, le système immunitaire humain est considéré comme complet.

Au jour 0, les cellules Me275 sont implantées en position sous-cutanée sur le flanc gauche des souris. A partir de ce jour, nous avons observé la croissance tumorale quotidiennement en mesurant la tumeur au pied à coulisse. Deux jours après l'implantation tumorale, la tumeur est bien visible et nous avons commencé le traitement avec la molécule PoroCombo.

Deux groupes de souris sont constitués, un groupe traité et un groupe témoin. Dans chaque groupe nous avons un mâle et deux femelles.

Chaque souris traitée reçoit une injection intra-péritonéale de 200µL contenant 0,132µmol de molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 par jour pendant dix jours (du jour 2 au jour 11) alors que les souris témoins reçoivent une injection de 200µL de sérum physiologique. Dix-sept jours après l'implantation tumorale, soit six jours après l'arrêt du traitement, les souris sont sacrifiées et les tumeurs sont récupérées afin de réaliser des coupes histologiques avec différents marquages (Figure 42).

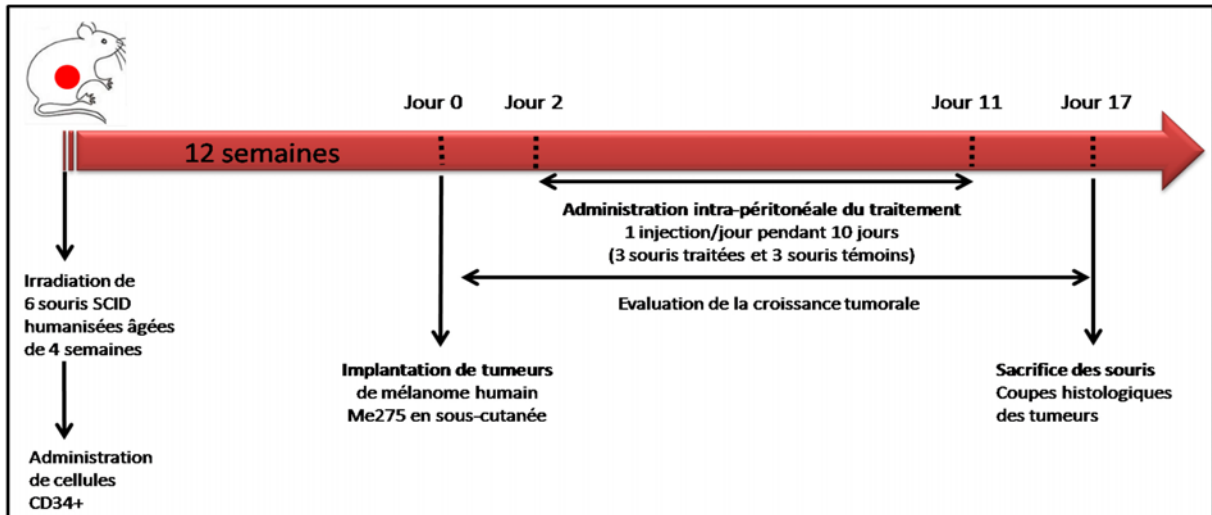


Figure 42 : Protocole de l'évaluation *in vivo* de l'impact du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 sur la croissance tumorale

### 2.6.2 Impact de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 sur la croissance tumorale

Au premier jour de traitement, les deux groupes de souris sont homogènes. Durant les quatre jours suivant le début du traitement, le volume tumoral diminue chez toutes les souris. Cette diminution est due à la résorption de l'inflammation péri-tumorale engendrée par l'implantation des cellules tumorales. Le volume tumoral mesuré à partir du cinquième jour est exempt d'inflammation et reflète bien le volume de la tumeur elle-même.

Dans le cas du groupe de souris témoin, le volume tumoral augmente au cours du temps chez toutes les souris. La courbe de croissance tumorale des souris a une allure exponentielle, la première souris témoin ayant un volume tumoral de 70 mm<sup>3</sup> au jour 6 et de 210 mm<sup>3</sup> onze jours plus tard. Les deux autres souris témoins ont également une augmentation du volume tumoral qui est cependant moins importante lors du dernier jour de mesure.

Les souris traitées par la molécule PoroCombo ont, quant à elles, une croissance tumorale ralentie par rapport aux souris témoins. En effet, parmi les trois souris traitées, deux souris ont un volume tumoral quasiment identique tout au long de la durée de l'expérimentation mais l'une d'elles voit son volume tumoral augmenter la veille du jour du sacrifice. De plus, la croissance tumorale de la troisième souris augmente fortement après la fin du traitement donnant l'impression d'un échappement thérapeutique (Figure 43 A).

Ainsi, le lendemain de la fin du traitement (jour 12), une différence de volume tumoral est visible entre les deux groupes avec une moyenne de 50mm<sup>3</sup> pour le groupe traité contre 80mm<sup>3</sup> pour le groupe témoin avec de très faibles écart-types (Figure 43 B). Cette différence

n'est pas statistiquement significative mais cela peut être dû au faible nombre de souris dans chaque groupe. Au cours des jours suivants, l'échappement thérapeutique d'une des souris du groupe traité entraîne une diminution de la différence en terme de moyenne de volume tumoral entre les deux groupes et une augmentation des écart-types. Ainsi, la différence visuelle observable en distinguant les différentes souris n'est pas retrouvée sur le graphique exprimé en moyenne de volume tumoral par groupe.

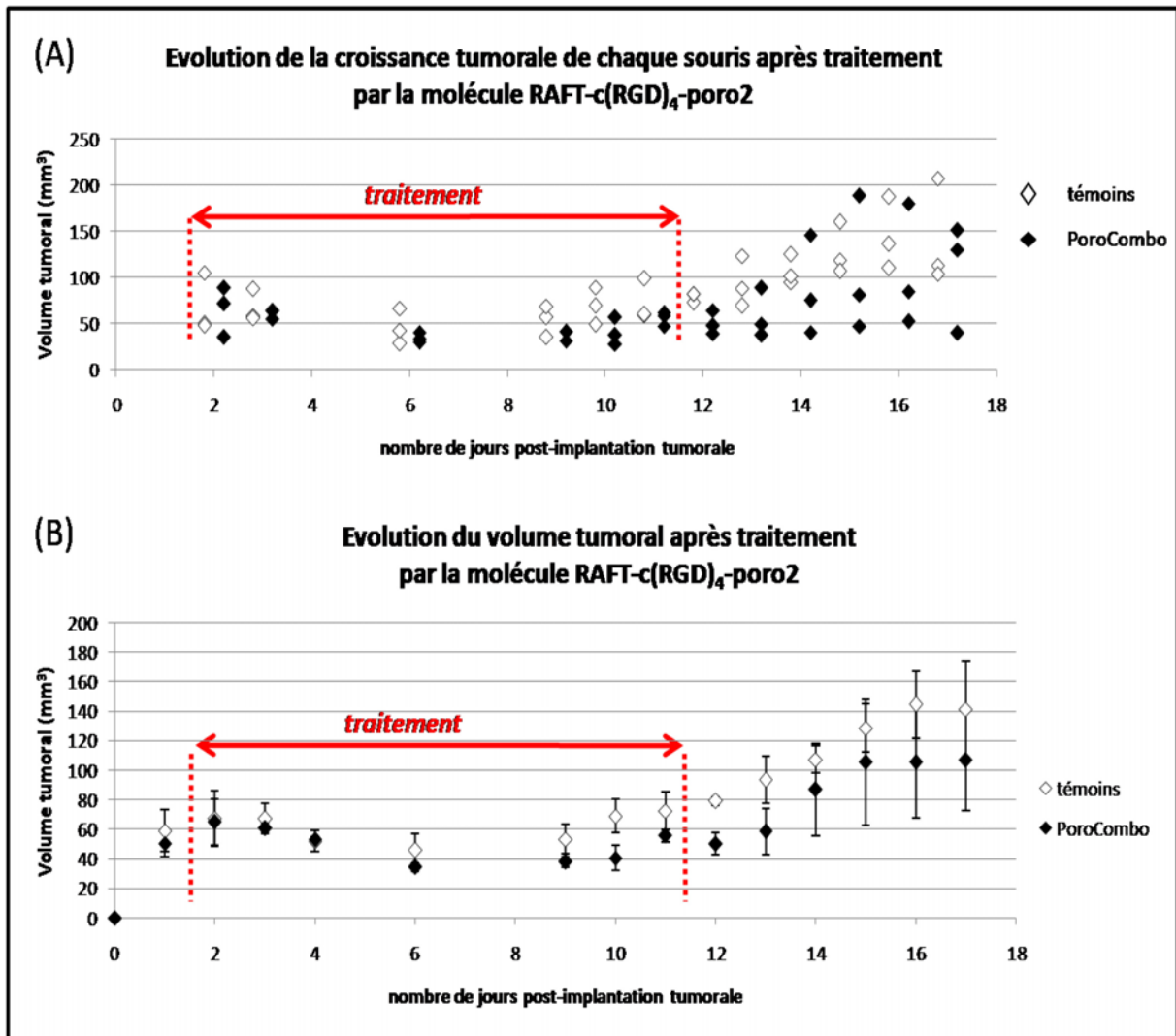


Figure 43 : Evaluation de l'impact de la molécule PoroCombo sur la croissance tumorale

Six souris SCID humanisées porteuses de tumeurs sous-cutanées de mélanome humain Me275 sont traitées par des injections intra-péritonéales à raison de 1 injection/jour pendant 10 jours. 3 souris reçoivent 200µL de molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 contenant 0,132µmol de molécule (noir) alors que les 3 souris témoins reçoivent 200µL de sérum physiologique (blanc). Le volume tumoral est déterminé par mesure de la longueur et de la largeur tumorale avec un pied à coulisse (A) ; chaque point représente une souris. (B) chaque point représente la moyenne du volume tumoral pour chaque groupe de souris.

Ces résultats préliminaires, obtenus sur un faible nombre d'animaux par groupe, sont prometteurs en terme d'impact de la molécule sur la croissance tumorale.

2.6.3 *Evaluation des modifications anatomopathologiques des tumeurs suite au traitement par les molécules PoroCombo*

Nous avons montré précédemment l'impact de la molécule PoroCombo sur la croissance tumorale. Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai essayé d'identifier l'impact du traitement sur les caractéristiques de la tumeur elle-même.

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et les tumeurs sont prélevées puis sont ouvertes par section complète. L'observation visuelle de l'intérieur des tumeurs (Figure 44 photos à gauche) révèle une masse blanchâtre de texture différente à l'intérieur de la tumeur dans le cas de deux des trois souris du groupe traité alors que les tumeurs des souris du groupe témoin ont un aspect lisse, brillant et homogène.

Nous avons ensuite réalisé des coupes histologiques de 7 µm d'épaisseur et réalisé des marquages immunohistologiques des tumeurs afin d'identifier l'impact de la molécule PoroCombo sur la tumeur.

Le marquage à l'hématoxyline/éosine (HE) met en évidence la densité de cellules présentes dans la tumeur. Dans le groupe témoin, la densité cellulaire est homogène sur l'ensemble de la tumeur alors que dans le groupe traité la tumeur peut être divisée en deux parties : le cœur de la tumeur pauvre en cellules et la périphérie de la tumeur où la densité cellulaire est plus importante.

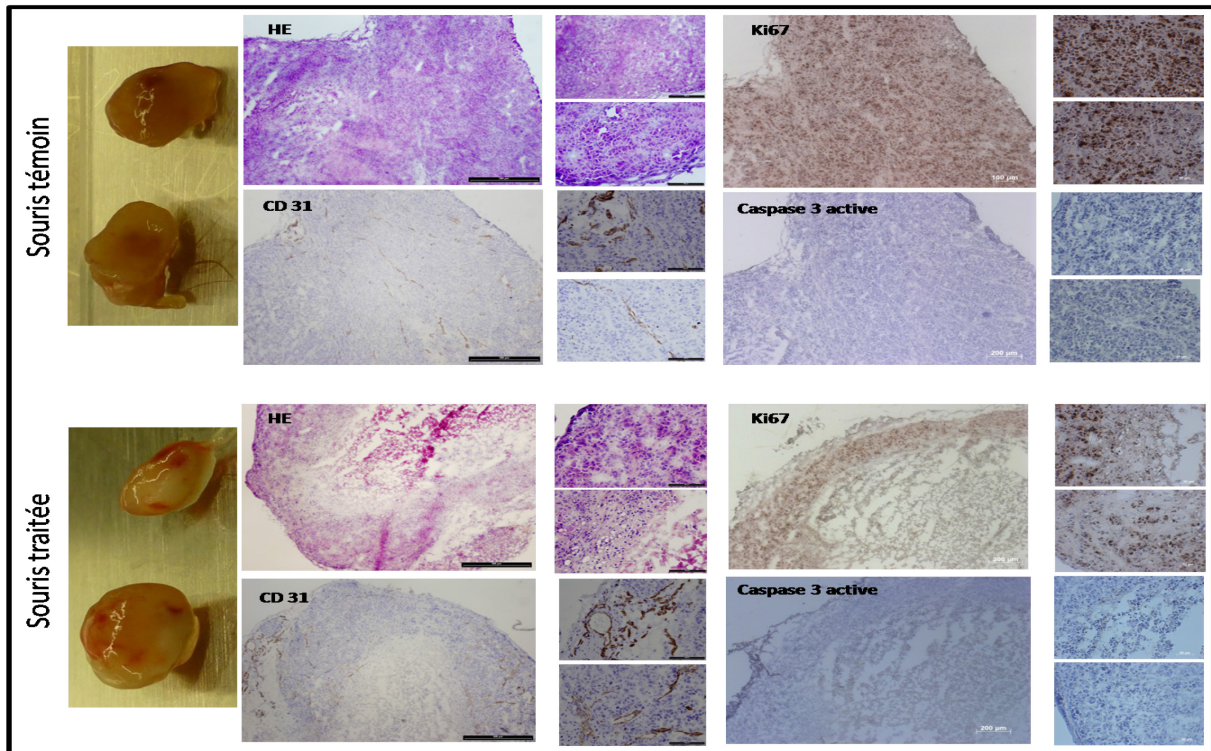
Un marquage de la prolifération cellulaire a été réalisé avec un anticorps anti-Ki67 marqué PE (marquage marron) (Figure 44). Les souris témoins ont une prolifération cellulaire homogène dans toute la tumeur alors que les souris traitées ont une prolifération limitée aux cellules de la périphérie et un cœur tumoral non proliférant.

Le RGD agit sur les intégrines  $\alpha\beta_3$  en les inhibant et cet effet est amplifié par la toxicité du peptide « poro » ; il peut donc diminuer l'angiogénèse tumorale. Ainsi, afin d'évaluer si la molécule PoroCombo a un impact sur l'angiogénèse tumorale, un marquage des cellules endothéliales avec un anticorps anti-CD31 couplé à la phycoérythrine (PE) (marron) a été réalisé (Figure 44). L'observation visuelle ne permet pas d'identifier de différence entre les souris témoins et les souris traitées.

Enfin, la molécule PoroCombo présentant un peptide pro-apoptotique, un marquage de la caspase 3 active a été réalisé afin d'évaluer l'apoptose cellulaire (Figure 44). Le marquage étant faible, il ne nous a pas permis de visualiser de différence entre les deux groupes. Ceci peut s'expliquer par le jour tardif du sacrifice des souris. Il serait intéressant d'effectuer ce



marquage sur des souris sacrifiées dès la fin du traitement afin d'observer les mécanismes d'apoptose en cours.



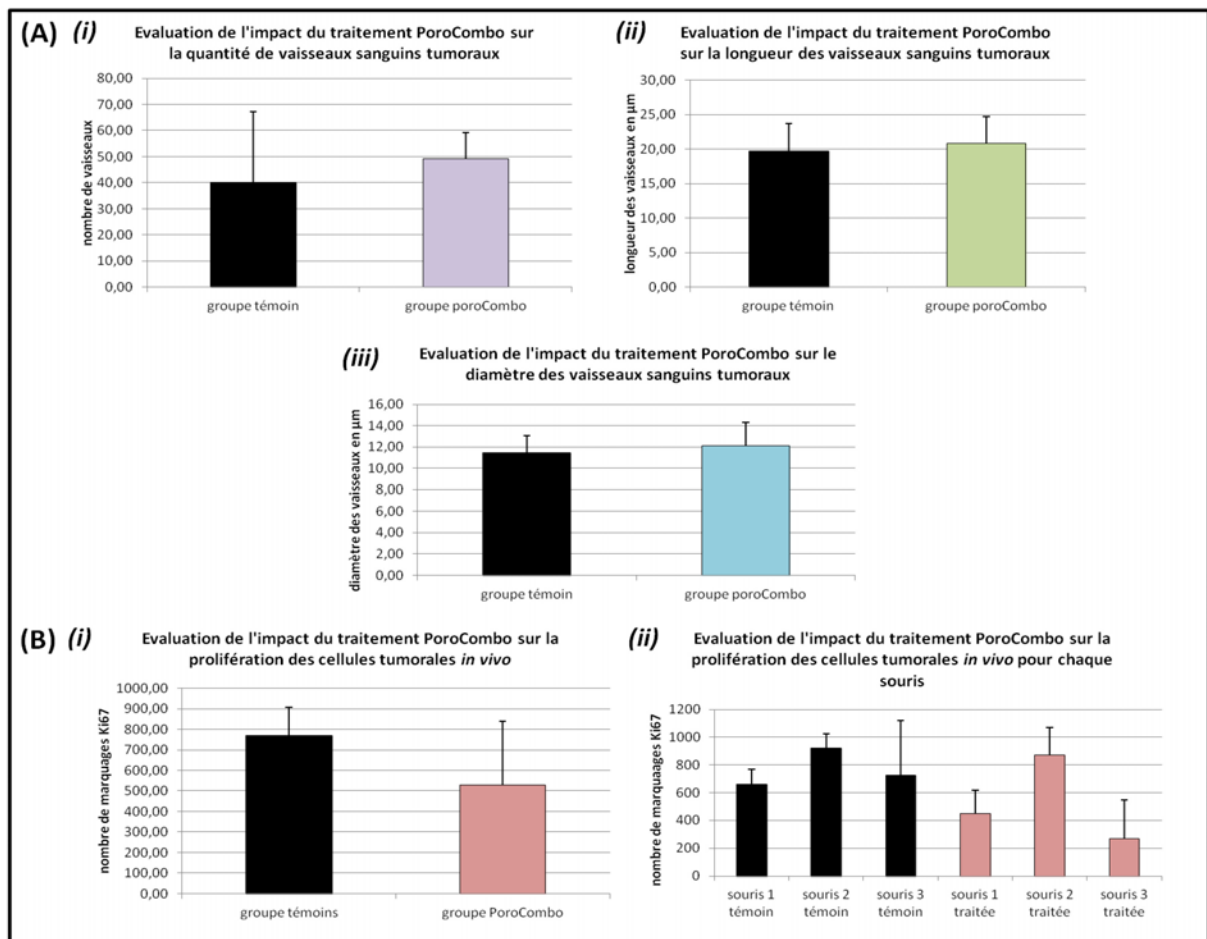
**Figure 44 : Evaluation par marquage immuno-histologique de l'impact du traitement PoroCombo sur les tumeurs**

Une souris de chaque groupe, à savoir une souris témoin recevant du sérum physiologique (en haut) et une souris traitée par la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 (en bas), est montrée en exemple. Les photos tout à gauche sont celles des tumeurs coupées en deux au moment de l'extraction tumorale. Nous pouvons observer la différence d'apparence macroscopique des tumeurs entre la souris traitée et la souris témoin. Des marquages ont été réalisés sur les coupes histologiques de 7 µm avec de l'hématoxyline/éosine (HE) pour observer la densité cellulaire de la tumeur alors que les marquages immunohistologiques avec un anticorps anti-Ki67 marqué PE (Ki67) nous permettent d'observer la prolifération cellulaire. Le marquage avec un anticorps anti-CD31 marqué PE (CD31) permet d'observer les cellules endothéliales présentes alors que le marquage avec l'anticorps anti-caspase3 active marqué PE (Caspase 3 active) permet de marquer les cellules apoptotiques. Pour les marquages PE, le signal de l'anticorps apparaît en marron alors que le tissu non marqué apparaît en bleu. Pour chaque marquage nous avons une image obtenue avec l'objectif x20 et deux images obtenues avec l'objectif x40.

En ce qui concerne le marquage des vaisseaux sanguins, il ne nous a pas permis d'observer une différence visuelle. Cependant, afin d'évaluer l'impact sur le nombre ou sur la morphologie des vaisseaux sanguins tumoraux suite au traitement par la molécule PoroCombo, j'ai évalué, à l'aide du logiciel Metamorph, le nombre de vaisseaux mais également leur longueur et leur diamètre dans les tumeurs des différentes souris. D'après les résultats obtenus, aucune différence significative n'est observable entre le groupe des souris traitées par la molécule PoroCombo et le groupe des souris témoins (Figure 45 A). Cependant, le fort écart-type observé pour le nombre de vaisseaux dans le groupe témoin est dû à l'inhomogénéité de vascularisation selon l'endroit visualisé dans la tumeur.



En ce qui concerne la quantification du marquage de la prolifération avec un anticorps Ki67, dans le groupe témoin les trois souris ont un marquage assez similaire. En revanche, dans le groupe des souris traitées, la souris numéro 2 a un marquage beaucoup plus important que les deux autres souris (Figure 45 B). Cette souris correspond à celle pour laquelle un échappement thérapeutique est observé avec une augmentation exponentielle de son volume tumoral dans les jours suivant l'arrêt du traitement. Inversement, la souris numéro 3 est la souris avec la courbe de croissance tumorale la plus constante au cours du temps. L'important écart-type mesuré par souris dans la quantification du Ki67 est dû au faible marquage du centre de la tumeur et au fort marquage de la périphérie. Ainsi, l'important écart-type observé pour le groupe de souris traité ne permet pas d'observer une différence significative entre les deux groupes en ce qui concerne le marquage de la prolifération cellulaire.



**Figure 45: Evaluation quantitative de l'impact du traitement PoroCombo sur la vascularisation et sur la prolifération tumorale**

Le marquage des vaisseaux sanguins tumoraux avec un anticorps CD31 marqué à la phycoérythrine (A) a permis d'évaluer grâce au logiciel Metamorph, la moyenne du nombre (i), de la longueur (ii) et du diamètre (iii) des vaisseaux sanguins dans les tumeurs des souris témoins (noir) ou traitées par la molécule PoroCombo (couleur). Le marquage de la prolifération cellulaire avec l'anticorps Ki67 couplé à la phycoérythrine (B) permet de comparer la différence de marquage entre les deux groupes en terme de moyenne (i) ou par souris (ii) entre le groupe témoin (noir) et le groupe traité (rose).

Les résultats obtenus sur les souris sont prometteurs mais doivent être reproduits sur un plus grand nombre d'animaux.

### 3 Discussion

Afin de pouvoir utiliser le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> comme outil théranostique, nous avons dans un premier temps évalué sa capacité de ciblage tumoral dans notre modèle. Nous montrons dans cette étude que l'administration intraveineuse de RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-A700 permet de marquer les tumeurs de mélanome sous-cutané indépendamment de la lignée tumorale étudiée.

Cinq heures après l'administration du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-A700, les tumeurs sont bien visibles en 2D-FRI. La fluorescence s'accumule dans la tumeur au cours du temps et c'est ainsi que nous observons un signal de fluorescence de forte intensité après vingt-quatre heures. Par ailleurs, les métastases pancréatiques et intestinales des souris sont également marquées. Ce résultat est en accord avec nos précédentes études (Garanger, Boturyn et al. 2005; Keramidas, Josserand et al. 2010).

La molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-A700 est abondamment retrouvée dans les reins 5 heures après l'administration puis le signal diminue à 24 heures. Ceci met en évidence une élimination rénale rapide en accord aussi avec nos précédentes études. En effet, suite à la filtration glomérulaire, les peptides sont ré-absorbés et endocytés dans les lysosomes, par les cellules tubulaires proximales ; les peptides métabolisés sont libérés dans la circulation sanguine puis sont rapidement éliminés. Nous avons mis en évidence qu'il est possible d'améliorer l'élimination rénale en pré- ou co-administrant de la Gélofusine qui protège les reins en diminuant leur activité sans affecter l'accumulation tumorale (Sancey, Ardisson et al. 2007; Briat, Wenk et al. 2012).

En conclusion, le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-A700 permet de cibler les tumeurs tant primaires que métastatiques après une administration systémique dans les modèles étudiés.

Afin d'utiliser le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> comme outil thérapeutique nous l'avons couplé à un peptide pro-apoptotique issu de Bax permettant la formation de pores mitochondriaux qui, suite à la libération du cytochrome-c, doit conduire les cellules à l'apoptose. Avant de greffer ce peptide sur le vecteur RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>, sa toxicité a été évaluée sur des mitochondries isolées. Nous montrons que les peptides poro 2 au contact direct des mitochondries, entraînent effectivement la formation de pores mitochondriaux permettant la libération du cytochrome-c. De plus, la recherche sur l'optimisation du peptide s'est avérée très efficace puisque le peptide poro 2 de 16 acides aminés est vingt fois plus efficace que le peptide poro 1 de 29 acides aminés. Par ailleurs les poropeptides sont beaucoup plus toxiques que le peptide

(KLAKLAK)<sub>2</sub> utilisé dans des précédentes études (Dufort, Sancey et al. 2011) puisque que le poro 2 entraîne la libération du cytochrome-c lors d'un traitement des mitochondries à 0.5µM alors que 25µM de (KLAKLAK)<sub>2</sub> ne l'entraîne pas.

Le but d'utiliser le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> comme outil thérapeutique est de permettre de vectoriser le peptide à l'intérieur des cellules tumorales afin qu'il puisse dépolariser les mitochondries.

Nous avons précédemment mis en évidence que le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> est internalisé dans les cellules tumorales après interaction avec les intégrines αvβ3. Il permet la clusterisation de ces intégrines sur la membrane plasmique, en particulier au niveau des jonctions intercellulaires, puis est internalisé à l'intérieur de vésicules pour finir enfin dans le cytoplasme. Finalement, nous retrouvons moins de 20% de la fluorescence en intracellulaire. L'endocytose passe par la voie des clathrines (Garanger, Boturyn et al. 2005; Sancey, Garanger et al. 2009).

Le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> est donc internalisé dans les cellules. Cependant, afin de permettre au peptide pro-apoptotique d'agir sur la mitochondrie, il est nécessaire qu'il soit libéré de son vecteur une fois arrivé dans la cellule. C'est dans cet objectif que lors d'une précédente étude le peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)<sub>2</sub> a été relié au RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> par un pont disulfure afin qu'il soit réduit dès son internalisation et libéré. La libération intracellulaire du peptide a été confirmée par une méthode de microscopie confocale associée à du FRET. De plus, il a été mis en évidence que le peptide se colocalisait avec les mitochondries (Dufort, Sancey et al. 2011).

L'utilisation du pont disulfure a déjà montré son efficacité pour libérer un élément à l'intérieur de la cellule dans de précédentes études (Razkin, Josserand et al. 2006; Jin, Razkin et al. 2007). Nous avons synthétisé la molécule PoroCombo selon la même méthode et donc greffé le peptide pro-apoptotique poro 2 sur le vecteur RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> par l'intermédiaire d'un pont disulfure puis avons évalué sa toxicité sur des cellules de mélanome en culture *in vitro*.

Le test du marquage de la membrane mitochondriale met en évidence une dépolarisation membranaire faisant suite au traitement par la molécule PoroCombo. Cette dépolarisation est bien due au peptide poro 2 lui-même puisqu'elle n'est pas observée lors du traitement par le vecteur RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> seul. Or, l'action de poro 2 sur la mitochondrie nécessite que le peptide soit présent dans la cellule et sous forme active, c'est pourquoi nous pouvons en conclure qu'il a bien été internalisé dans la cellule puis libéré.

Il serait néanmoins intéressant de réaliser une expérience de FRET entre le vecteur RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> et le peptide poro 2 afin de confirmer les mécanismes cellulaires mis en jeu.

La molécule PoroCombo entraîne une diminution de la viabilité cellulaire avec 40% de cellules viables après 24 heures de traitement. Or, dans l'étude du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-(KLAKLAK)<sub>2</sub>, le même pourcentage de viabilité cellulaire était observable mais après 48 heures de traitement (Dufort, Sancey et al. 2011). Il faut noter que, contrairement au peptide (KLAKLAK)<sub>2</sub>, les acides aminés du peptide poro 2 sont en configuration D (acides aminés non naturels) et sont donc moins sujets aux dégradations par des protéases. Cependant, nous n'avons pas testé ce stéréoisomère sur les mitochondries isolées et il se peut qu'il soit moins toxique bien que plus stable. Le peptide (KLAKLAK)<sub>2</sub> avait été protégé, lui, par ajout d'une fonction amine en C-Ter mais utilisait des acides aminés L.

Concernant l'évaluation des mécanismes cellulaires impliqués dans la diminution de la viabilité cellulaire, l'étude de l'apoptose tardive avec le marquage au Hoechst s'est révélée être négative pour un traitement à 5µM. Ce résultat peut être dû, outre à la concentration en molécule trop faible, à l'évaluation trop précoce de ce phénomène puisque l'expérimentation a été réalisée 24 heures seulement après le traitement des cellules. En effet, dans le cas de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-(KLAKLAK)<sub>2</sub> nous n'obtenions que 7% de marquage lors d'un traitement à 5µM et ce, après 48 heures de traitement (Dufort, Sancey et al. 2011).

En revanche, l'évaluation de la mise en œuvre des voies apoptotiques avec l'activation de la caspase 3 met en évidence une activation proportionnelle à la concentration utilisée. La molécule PoroCombo entraîne bien l'apoptose cellulaire lors du traitement des trois lignées de mélanome alors que le vecteur RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> seul n'entraîne pas plus d'apoptose que dans le cas des cellules non-traitées. Par ailleurs, il est difficile de rendre compte de l'impact du PoroCombo sur la mort cellulaire globale uniquement par le taux d'apoptose qui reste modeste. L'apoptose ne semble donc pas être le seul mécanisme impliqué et il y a donc probablement induction de mort par nécrose. Dans ce cas, le peptide poro2 induirait une diminution de l'activité mitochondriale insuffisante pour induire l'apoptose dans un contexte de cellules tumorales particulièrement résistantes, mais suffisante pour réduire la quantité d'ATP et donc d'énergie disponible pour les cellules ce qui ralentirait leur activité métabolique et les conduirait vers la nécrose.

L'évaluation *in vivo* de l'efficacité de la molécule PoroCombo a mis en évidence un ralentissement de la croissance tumorale dans le cas des souris traitées. Cependant, un échappement thérapeutique a eu lieu sur une première souris en fin de traitement puis sur une deuxième souris dans les jours suivant l'arrêt du traitement.

Nous mettons en évidence l'impact de notre molécule sur la prolifération cellulaire avec une forte diminution au niveau du cœur de la tumeur.

Cependant, comme nous l'avons précédemment démontré, l'administration intra-tumorale du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> à répétition et à forte dose dans une tumeur ovarienne, entraîne un ralentissement de la croissance tumorale par diminution de l'angiogénèse (Garanger, Boturyn et al. 2005). Il sera donc important de répéter notre expérimentation en traitant les souris avec du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> seul afin de vérifier que l'effet observé est bien dû au peptide pro-apoptotique poro 2 seul et non pas à son vecteur. Cette expérience est en cours.

Le RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 présente donc potentiellement un double intérêt avec non seulement l'action pro-apoptotique du peptide poro 2 mais également l'action anti-angiogénique du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>. L'étude du nombre et de la morphologie des vaisseaux sanguins tumoraux dans nos 3 souris n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative selon que les souris reçoivent ou non la molécule PoroCombo. Cependant, en collaboration avec le Dr Caroline Asford (EFS, Grenoble, France), nous avons également étudié d'autres mécanismes, en particulier immunitaires, engendrés par ce traitement. Nous avons mis en évidence une nette diminution de la quantité de VEGF, facteur pro-angiogénique connu, dans le plasma des souris traitées (données non montrées) ce qui s'avèrerait très intéressant si cela est confirmé par les prochaines expérimentations.

Par ailleurs, nous pensons que PoroCombo pourrait induire des réponses immunes anti-tumorales en stimulant un processus de « mort cellulaire immunogénique ». Or, en étudiant les facteurs de l'immunité, nous avons pu constater que le traitement par la molécule PoroCombo entraîne la libération massive du facteur MCP-1 dans le sang qui va recruter les effecteurs de l'immunité anti-tumorale (données non montrées). Ce résultat confirme aussi que la molécule PoroCombo entraîne bien l'apoptose *in vivo* puisque l'activation du système immunitaire n'a pas lieu suite à un processus nécrotique.

La poursuite du projet consistera à tester la molécule PoroCombo sur un plus grand nombre d'animaux et à évaluer les mécanismes impliqués dès la fin du traitement sans attendre l'échappement thérapeutique. Par ailleurs, bien que nous observions une amélioration de l'activité par rapport à notre précédente molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-(KLAKLAK)<sub>2</sub>, nous sommes toujours contraints par le ratio de 1 vecteur pour 1 peptide pro-apoptotique internalisé. Or, la quantité de peptide libéré dans la cellule est un critère majeur pour l'efficacité de la molécule. Il serait donc intéressant de pouvoir créer une molécule vectorisant plusieurs peptides pro-apoptotiques en même temps.

De même, il serait envisageable, comme dans le cas des chimiothérapies conventionnelles, de réaliser plusieurs cycles de traitement afin de ralentir la croissance tumorale dans un premier temps puis de réduire la taille tumorale.

En conclusion, nous avons développé un outil théranostique très intéressant puisqu'il permet, non seulement de cibler les tumeurs lorsqu'il est couplé à un fluorophore, mais également d'avoir une action thérapeutique multiple en agissant sur la viabilité cellulaire, sur l'angiogénèse et sur le système immunitaire anti-tumoral.

*Conclusions*

*et*

*Perspectives*



Nous avons étudié trois outils différents ayant *a priori* des propriétés théranostiques, afin de démontrer leur intérêt pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs.

Ces 3 outils diffèrent par leur origine (naturelle ou synthétique), leurs caractéristiques comme agents vecteurs (cellules, nanoparticules, petites molécules) et leurs applications potentielles.

Nos travaux présentés ici indiquent essentiellement :

-a/ Que les CSM permettent de normaliser la vascularisation des tumeurs mais ne sont utilisables ni pour l'imagerie précoce des tumeurs ni comme « cheval de Troie » capable de véhiculer un agent ou un gène thérapeutique. En effet, bien que les CSM ne soient pas de bons vecteurs dans la mesure où nous n'avons pas pu démontrer des propriétés de ciblage tumoral dans certains modèles, nous mettons en évidence un impact positif sur l'angiogénèse avec une amélioration de la structure vasculaire qui va entraîner une réorganisation des flux sanguins au niveau de la tumeur. La poursuite de ce projet consistera, d'une part, à étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu à ce niveau et, d'autre part, à évaluer si ce traitement à base de CSM pourrait améliorer le ciblage passif des tumeurs par des nanoparticules en modifiant l'effet EPR. Les CSM pourraient alors être utilisées en pré-traitement afin de standardiser et optimiser l'effet EPR. Nous mettrons alors en application les méthodes d'IRM et de fluorescence décrites dans ce travail pour caractériser cet effet.

-b/ Qu'un anticorps comme le Cetuximab utilisé en clinique pour la thérapie des tumeurs acquiert des propriétés nouvelles lorsqu'il est présenté par des nanoparticules. En particulier, cela pourrait aboutir à une efficacité thérapeutique accrue de l'anticorps associée à une diminution du risque d'apparition de formes de résistances au traitement. Ce type de nanovecteur permettrait aussi la détection des nodules tumoraux répartis dans les poumons après aérosolisation. Ce mode d'administration semble être très adapté et prometteur pour les nanomédicaments de taille supérieure à une dizaine de nanomètres, en complément ou en remplacement de l'injection par voie systémique. Par la suite, il faudra finir cette analyse et regarder avec quelle efficacité une nanoparticule délivrée par nébulisation pourrait être redistribuée à la tumeur dans un second temps par la voie sanguine après passage de la muqueuse épithéliale.

- c/ Qu'une « petite molécule » très bien définie et contrôlée du point de vue chimique et pharmacologique, comme le PoroCombo, pourrait être la plus appropriée des trois vecteurs testés pour délivrer une drogue dans le cytoplasme des cellules après injection par voie systémique. En effet, cela permet le ciblage de la cellule tumorale avec libération intracellulaire d'un peptide pro-apoptotique sous forme active. De plus, ces molécules PoroCombo à base de cRGD présentent une triple activité thérapeutique puisque, non seulement le peptide libéré entraîne la mort cellulaire mais nous générons aussi un effet RGD-spécifique anti-angiogénique tel que décrit pour le cilengitide et possiblement, une réaction immunitaire anti-tumorale comme le suggèrent nos résultats préliminaires. Ces propriétés thérapeutiques sont, de plus, associées à des performances extrêmement intéressantes pour la détection des tumeurs par imagerie.

Mes travaux ont donc globalement contribué à définir des méthodes et modèles *in vivo* d'évaluation de ces trois types de « bio-vecteurs ». Ils ouvrent la porte vers un grand nombre d'applications et d'études complémentaires qui seront poursuivies dans notre laboratoire.

*Matériel*  
*et*  
*Méthodes*

# 1 Les animaux

Avant toute expérimentation les protocoles réalisés sont soumis au Comité d’Ethique de Grenoble.

## 1.1 Souche de souris

Les souris utilisées sont des femelles âgées de 5 semaines de type *Nude* NMRI. Elles proviennent des laboratoires Janvier (Le Genest Saint Isle (53), France). A leur arrivée, elles sont placées en stabulation durant une semaine avant toute expérimentation. Les souris *Nude* NMRI sont caractérisées par une aplasie du thymus ce qui leur donne la particularité d’être déficientes en lymphocytes T. La réponse aux lymphocytes T dépendant des antigènes est faible mais une augmentation des Natural Killers (NK) en compensation de cette immunodépression est observée. Le caractère *Nude* NMRI facilite notamment le développement de tumeurs xénogreffées en évitant leur rejet immunitaire. Elles sont maintenues dans des conditions exemptes d’agents pathogènes, à température et hygrométrie contrôlées. En plus d’être immunodéprimées, les souris *Nude* NMRI n’ont pas de poils. Ceci permet de s’affranchir de l’autofluorescence des poils due à la kératine et permet de réaliser un suivi *in vivo* des fluorophores du proche-infrarouge.

Les souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) sont des souris ayant une lymphopénie profonde en lymphocytes B et T. Les souris que nous utilisons ont été humanisées et élevées par le Dr Caroline Aspod (EFS, Grenoble, France). L’irradiation totale des souris âgées de 4 semaines permet d’éliminer le système immunitaire restant et d’implanter des cellules humaines CD34+ pour reconstituer un système immunitaire humain qui sera complet au bout de 12 semaines.

Ces souris, très fortement immunodéprimées, sont élevées en incubateur en surpression. Les expérimentations sont réalisées sous hotte à flux laminaire.

## 1.2 Méthodes d’anesthésie

### 1.2.1 Anesthésie gazeuse

La plupart des expérimentations sont réalisées sous anesthésie par isoflurane gazeux (3-4% en induction puis 2% en maintien) avec un système Minerve (Esternay, France) avec de l’isoflurane Bellamont (Cournon d’Auvergne, France).

### 1.2.2 Anesthésie chimique

Certaines expérimentations ne permettent pas l'utilisation d'un système anesthésique gazeux, notamment lors d'un geste qui nécessite une anesthésie très profonde tel que le sacrifice par ParaFormaldéhyde (PFA). Dans ce cas une anesthésie chimique est instituée. Un mélange de 50µL de chlorhydrate de médétomidine 0.085% (Domitor<sup>®</sup> Pfizer), et 500µL de Kétamine (Imalgène1000<sup>®</sup> Merial) dilués dans 4450µL de PBS stérile (Phosphate Buffer Saline : 155mM NaCl ; 4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 16mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; pH8) est administré par voie intrapéritonéale à raison de 200µL par 20 grammes de souris.

### 1.3 Méthodes de sacrifice des animaux

Selon l'expérimentation réalisée et les analyses *ex vivo* en découlant, nous utilisons la méthode de sacrifice la mieux adaptée.

La plupart des sacrifices sont réalisés par dislocation cervicale. Pour cela les souris sont endormies à l'isoflurane (3%) puis la dislocation cervicale est réalisée alors que la souris est maintenue endormie.

Dans le cas d'une étude de biodistribution, préalablement au sacrifice, un prélèvement sanguin par voie percutanée intracardiaque est réalisé alors que les souris sont maintenues endormies par de l'isoflurane 2% sur une plaque chauffante à 37°C. Enfin, une fois la dislocation cervicale réalisée, les organes sont prélevés. Dans le cas des coupes histologiques, les organes sont congelés en les recouvrant d'O.C.T compound Tissue-Tek<sup>®</sup> (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq) puis en les plongeant dans de l'isopentane (Carlo Erba), lui-même refroidi par de l'azote liquide (-196°C). Les échantillons sont stockés à -80°C.

En revanche, lors des expérimentations réalisées avec un modèle de glioblastome orthotopique, les souris sont sacrifiées par perfusion intra-cardiaque de PBS puis de paraformaldéhyde (PFA) (4% de poudre de paraformaldéhyde dissoute dans un tampon de phosphate de Sörensen 0.1M (pH7.3)) qui permet de fixer les tissus de la souris après qu'ils aient été bien rincés afin d'éliminer la totalité de leur sang. Ce type de fixation permet de réaliser des coupes histologiques du cerveau nettes avec un minimum d'autofluorescence due au sang. Pour la fixation avec du PFA, les souris sont anesthésiées avec une solution de Domitor/Kétamine (cf anesthésie chimique), puis une perfusion intra-cardiaque dans le ventricule gauche, l'oreillette droite étant sectionnée, est réalisée avec 10mL de PBS. Quand tout le sang de la souris est éliminé, une perfusion avec 10mL de PFA 4% est réalisée afin de

fixer les tissus. Les organes sont ensuite placés dans une solution de sucrose 30% et sont conservés à +4°C en attendant d'être coupés au cryomicrotome.

Dans le cas d'analyses ultérieures de biologie moléculaire, les tumeurs sont directement congelées à -80°C.

#### **1.4 Les différentes voies d'injection**

Au cours des expérimentations, différentes voies d'injection sont mises en œuvre. Selon la voie d'injection, un volume maximal est administrable. Ainsi, 300µL peuvent être injectés par voie intrapéritonéale contre 200µL pour la voie intraveineuse et péri-tumorale.

Les injections par voie intraveineuse, intra-artérielle et péri-tumorale sont réalisées sur souris endormies par anesthésie gazeuse, à l'isoflurane.

Pour l'injection par voie intraveineuse, les souris sont placées sur un tapis chauffé à 37°C. L'injection est réalisée dans la veine caudale.

En ce qui concerne l'injection par voie artérielle, les souris sont endormies à l'isoflurane 3% et maintenues endormies à l'isoflurane 2%. Les souris sont positionnées sur le dos sur un tapis chauffant recouvert d'un champ opératoire. Une incision longitudinale est réalisée à la partie médiane du cou près de la mâchoire. La bifurcation entre la carotide externe et la carotide interne est repérée à l'aide d'une loupe binoculaire (Realux, France). Une ligature est posée en amont de l'endroit où l'incision de l'artère carotide interne est réalisée. L'aiguille qui permet de réaliser l'injection est introduite dans l'artère. Une fois l'injection réalisée, l'artère est ligaturée en aval de l'incision. La plaie cutanée est suturée. L'asepsie est faite à la povidone iodée. Un traitement antalgique par administration de 20µL de Rimadyl® 50mg/mL (Pfizer) en sous-cutanée est réalisé.

L'injection intrapéritonéale est réalisée en injectant jusqu'à 300µL dans le quadrant abdominal inférieur gauche ou droit, entre les mamelles. Dans le cas du projet PoroCombo, 200µL sont injectés par voie intra-péritonéale lors de chaque injection.

En ce qui concerne la nébulisation, les souris sont endormies par anesthésie chimique et sont placées sur le dos sur un support incliné. Le nébuliseur est rempli avec la solution à nébuliser alors que la seringue est remplie de PBS. Un clip permettant de s'assurer qu'un volume de 50µL sera injecté est placé sur le piston puis retiré. La trachée est repérée grâce à l'utilisation d'un laryngoscope (Welch Allyn) puis le nébuliseur (microSprayer®, Penn Century Inc <sup>TM</sup>)

est introduit dans la trachée jusqu'à la bifurcation trachéale et les 50 $\mu$ L de solution sont nébulisés. Les souris sont placées sur un tapis chauffant jusqu'à leur réveil avec une surveillance accrue de leur fréquence respiratoire.

## 2 Les lignées cellulaires

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'air. Les cellules sont repiquées deux fois par semaine. Pour cela, un mélange de trypsine/EDTA (Gibco) est mis sur les cellules après rinçage avec du PBS puis les cellules sont récupérées dans du milieu de culture contenant 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Invitrogen) afin d'inhiber l'action de la trypsine.

Le comptage des cellules est réalisé sur une cellule de Malassez ou avec un compteur de cellules Invitrogen, après un marquage au bleu de trypan permettant d'évaluer la viabilité cellulaire en colorant en bleu le cytoplasme des cellules mortes.

### 2.1 Cellules souches mésenchymateuses humaines

Les Cellules Souches Mésenchymateuses humaines (CSMh) sont obtenues à partir de la moelle osseuse de patients donneurs sains après réception de leur consentement écrit (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Grenoble, France).

Les cellules souches mésenchymateuses sont maintenues en culture *in vitro* dans un milieu Minimum Essential Medium eagle (MEM Sigma®) supplémenté par du glutamax, 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Invitrogen). Les cellules ne sont pas cultivées au-delà de 4 passages.

### Marquage des CSM

#### Marquage par la GFP-Actine

Trois semaines avant l'injection, les CSM ont été modifiées de manière stable avec un lentivirus de troisième génération (pLV-Actine-GFP) permettant l'expression du gène GFP-actine (Green Fluorescent Protein ; Ex/Em = 488nm/507nm) sous contrôle d'un promoteur CMV (CytoMegalovirus). Le lentivirus pLV-Actine non répliquatif a été développé et donné gracieusement par le Docteur Olivier Destaing (Institut Albert Bonniot, Grenoble, France). Le surnageant lentiviral est mis dans le milieu de culture des CSM.

Deux semaines après la modification, l'absence de lentivirus dans la culture cellulaire est vérifiée en dosant la protéine virale p24, par un test ELISA, dans le surnageant des CSM, puis, afin d'évaluer l'efficacité et la stabilité du marquage, les cellules sont observées en microscopie de fluorescence grâce à l'expression de la protéine fluorescente (GFP) ainsi que par cytométrie en flux (FACS Aria Cell-Sorting System, BD Biosciences).

### **Marquage par des nanoparticules**

Le jour précédant l'injection *in vivo*, les CSM sont marquées par des nanoparticules BANGS (Bangs laboratory, Fisher, IN, Etats-Unis ; 0.01 $\mu$ g/ $\mu$ L) à raison de 21 $\mu$ g de fer pour 8x10<sup>6</sup> cellules pour 1mL de milieu de culture cellulaire (Valable *et al.*, 2008). Ces nanoparticules sont constituées d'un cœur de fer carboxylé polydispersé (0.9 $\mu$ m de diamètre, 63.4% magnétite w/w) entouré de molécules Flash Red fluorescentes dans le proche-infrarouge (Ex/Em=660nm/690nm). Ces nanoparticules peuvent être observées en utilisant l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) grâce au fer et par l'imagerie optique de fluorescence grâce aux fluorophores. Les CSM sont incubées avec les nanoparticules pendant 18 heures dans une atmosphère à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Ces dernières étant endocytées très efficacement, nous obtenons ainsi des CSM marquées avec des nanoparticules (CSM-NP).

## **2.2 Cellules de glioblastome humain**

Les cellules U87 MG (American Type Culture Collection, Manassas, VA) sont une lignée de glioblastome-astrocytome humain.

La lignée U87-Luc est un sous-clone de la lignée U87, transfectée par un rétrovirus pour exprimer de manière stable le gène rapporteur de la luciférase Firefly (fLuc).

Les cellules U87 et U87-Luc sont maintenues en culture *in vitro* dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-glutamax, Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C, du glucose 4,5g/L, 1% de glutamine et des acides aminés non essentiels 1X (Gibco).

## **2.3 Cellules de tumeur mammaire murine**

Les cellules TS/A-pc sont des cellules d'adénocarcinome mammaire murin. Elles sont maintenues en culture *in vitro* dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de



veau fœtal (SVF, Invitrogen) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C, 1% de glutamine et du  $\beta$ -mercapto-éthanol (25 $\mu$ M). Une attention particulière est apportée pour que les cellules n'atteignent pas plus de 70% de confluence.

La lignée TS/A-pc-pGL3 est un sous-clone de la lignée TS/A-pc transfectée de façon stable par le plasmide pGL3 (Promega, Charbonnières, France) codant pour la luciférase Firefly. Les conditions de culture sont identiques à celles de la lignée TS/A-pc avec ajout de G418 (40 $\mu$ g/mL) pour maintenir la pression de sélection des cellules ayant incorporé le plasmide.

## 2.4 Cellules de CBNPC

La lignée H358-Luc est un sous clone des cellules H358 qui sont des cellules de cancer pulmonaire de type CBNPC, modifiées de façon stable par un rétrovirus, pour exprimer le gène de la luciférase. L'utilisation de ces cellules dans notre modèle de tumeur orthotopique pulmonaire nous permet de suivre la croissance tumorale par mesure de la bioluminescence. Les cellules H358-Luc sont maintenues en culture dans un milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C et par 1% de glutamine.

## 2.5 Cellules de mélanome humain

Trois lignées de mélanome humain ont été utilisées dans le projet d'utilisation du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> comme outil théranostique à savoir les cellules Colo 829, les cellules A375 et les cellules Me275.

Les cellules A375, provenant de l'ATCC, sont des cellules adhérentes de mélanome malin humain. Elles sont maintenues en culture dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-glutamax, Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C et par 1% de glutamine.

Les cellules Colo829 également issues de l'ATCC, sont des cellules adhérentes de mélanome malin humain. Elles sont maintenues en culture dans du milieu RPMI-1640 (Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C et par 1% de glutamine.

Les cellules Me275, quant à elles, ne sont pas commercialisées actuellement. Nous bénéficions d'une autorisation temporaire d'utilisation sur un autre projet de recherche et

réalisons actuellement une demande de prolongation de cette autorisation pour notre projet PoroCombo. Ces cellules sont cultivées dans du RPMI-1640 (Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C et par 1% de glutamine, 4,5g/L de glucose.

### **3 Les modèles tumoraux**

#### **3.1 Modèle orthotopique de glioblastome humain**

Des cellules de glioblastome humain U87 et U87-Luc ont été utilisées pour développer un modèle de tumeur cérébrale orthotopique. Toutes les implantations sont pratiquées sur des souris anesthésiées à l'isoflurane.

Les cellules (U87, U87-Luc) cultivées en monocouches subconfluentes sont lavées au PBS puis détachées par trypsination (trypsine/EDTA, Gibco) pendant 5 minutes, comptées au compteur de cellules Invitrogen et resuspendues dans du PBS (Sigma, France) afin d'obtenir une concentration de  $10^5$  cellules/5 $\mu$ L.

Les tumeurs cérébrales ont été obtenues par implantation stéréotaxique (bregma ; ML : 2.0mm ; DV : 3mm).

Les souris femelles *Nude* NMRI sont placées sur un cadre stéréotaxique (KOPF®) et une anesthésie locale avec injection de 20 $\mu$ L de bupivacaïne (5mg/mL, Mylan) est réalisée en sous-cutanée au niveau du crâne. Trois minutes après l'anesthésie locale, une incision longitudinale de la peau du crâne est réalisée le long de la ligne médiane. Les repères stéréotaxiques sont repérés et le crâne ainsi que la dure-mère sous-jacente sont délicatement percés avec le biseau d'une aiguille. La seringue de Hamilton 1705 (avec aiguille incorporée) est introduite jusqu'à 3,5 mm de profondeur puis est retirée de 0,5 mm afin que l'extrémité de son aiguille se trouve dans le cerveau à 3 mm de profondeur à partir de la boîte crânienne. La suspension cellulaire ( $10^5$  cellules dans 5 $\mu$ L) est ensuite injectée lentement (5 min) à travers la seringue, grâce à un pousse-seringue électrique (Perkin Elmer). Trois minutes après la fin de l'injection, la seringue est retirée progressivement à raison de 0,5mm toutes les 30 secondes afin d'éviter un reflux de la suspension cellulaire à cause de la surpression cérébrale. La perforation osseuse est obstruée avec de la cire de Horsley (B-Braun) et la peau du crâne est suturée.

Une analgésie post-opératoire préventive est réalisée par une injection sous-cutanée de 20 $\mu$ L de carprofène (Rimadyl® 50mg/mL, Pfizer) pour une souris de 25 grammes. Le site opératoire est désinfecté avec de la povidone iodée.

Le développement tumoral est visualisé par imagerie IRM (Bruker 4,7T ou 7T) ou par bioluminescence (Hamamatsu, Photonics) une semaine après l'implantation des cellules tumorales.

### **3.2 Modèle de tumeurs mammaires murines métastasées au niveau pulmonaire**

Afin de modéliser des métastases pulmonaires d'un cancer mammaire, 1x10<sup>5</sup> cellules TS/A-pGL3 sont trypsinées puis rincées dans du PBS. Les cellules sont reprises dans 200 $\mu$ L de PBS (Gibco) et sont injectées par voie intraveineuse chez les souris maintenues endormies par de l'isoflurane à 2%. Le développement tumoral est suivi par mesure de la bioluminescence (Hamamatsu, Photonic) des cellules tumorales 5min après administration intra-péritonéale de 300 $\mu$ L de luciférine (150mg/Kg de souris, Perkin-Elmer).

### **3.3 Le modèle tumoral : modèle de CBNPC humain orthotopique**

Les cellules H358 ou H358-Luc sont trypsinées et sont rincées au PBS. 10x10<sup>6</sup> cellules sont reprises dans du PBS pour un volume final de 50 $\mu$ L.

Les souris sont endormies par anesthésie chimique et sont placées sur un support incliné. Les cordes vocales sont repérées avec le laryngoscope et un cathéter est introduit dans la trachée. Enfin les 50 $\mu$ L de cellules sont administrés *via* le cathéter. Dans le cas de cellules H358-Luc, le développement de la tumeur pulmonaire est vérifié par imagerie de bioluminescence sur le système d'imagerie IVIS kinetic (Perkin Elmer), 5 minutes après l'administration intra-péritonéale de luciférine (150mg/Kg souris, Perkin Elmer).

### **3.4 Le modèle de tumeur sous-cutanée**

Les cellules sont trypsinées puis rincées dans du PBS. 10x10<sup>6</sup> cellules Me275 sont reprises dans 200 $\mu$ L de PBS.

La manipulation des souris SCID s'effectuant sous hotte à flux laminaire l'injection est réalisée sur souris éveillées.

Les 200 $\mu$ L sont injectés en sous-cutanée sur le flanc de la souris au dessus de la cuisse mais en dessous du niveau des reins.

L'intérêt majeur du modèle sous-cutané est la facilité de mesure physique du volume de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse. Partant du principe que la tumeur a une forme d'ellipse, son volume est calculé par la formule :  $0,52 \times \text{longueur} \times \text{largeur}^2$  (O'Reilly, Boehm et al. 1997)

## **4 Molécules et nanoparticules utilisées**

### **4.1 Les nanoparticules**

Les nanoémulsions sur lesquelles du Cetuximab est greffé (NP-Cetux), ainsi que les nanoémulsions témoins (NP-Capped) n'étant pas greffées avec un anticorps monoclonal, ont été synthétisées dans le laboratoire du Dr Anne-Claude Couffin (CEA-Leti DTBS, Grenoble, France).

### **4.2 Les molécules du projet PoroCombo**

Les différentes parties des molécules étudiées ont été synthétisées par deux équipes de chimistes avec lesquelles nous collaborons pour ce projet.

Ainsi, les peptides pro-apoptotiques « poro » ont été produits dans le laboratoire du Dr Gilles Subra (IBMM, UMR CNRS 5247, Montpellier, France).

D'autre part, la synthèse du RAFT-c(RGD)<sub>4</sub> ainsi que le couplage avec les peptides « poro », ont été réalisés par Michaël Claron dans le laboratoire du Dr Didier Boturyn (DCM, UMR CNRS-UJF 5250, Grenoble, France).

Les molécules utilisées sont les suivantes :

- RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>
- RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-Alexa700
- RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 aussi nommé RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-5119
- RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-porotémoin aussi nommé RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-5089

## 5 Cytométrie en flux

### 5.1 Evaluation du marquage des CSM

Deux semaines après la modification des CSM, afin d'évaluer l'efficacité et la stabilité du marquage,  $1 \times 10^6$  CSM sont lavées, trypsinées et reprises dans du PBS pour être analysées par cytométrie en flux (Aria Cell-Sorting System, BD Biosciences) afin d'évaluer la proportion de CSM marquées à la GFP.

### 5.2 Analyse de la caspase 3 active par cytométrie en flux

La caspase 3 est activée lors de la cascade cellulaire de l'apoptose. Ainsi, l'observation de son activation permet d'évaluer l'apoptose cellulaire. Ce marquage a été utilisé pour évaluer la propriété pro-apoptotique de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2. Nous utilisons le kit PE active caspase 3 apoptosis kit (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) qui permet de marquer la caspase 3 active grâce à un anticorps monoclonal couplé à la phycoérythrine (PE).

La veille,  $1,2 \times 10^5$  cellules sont ensemencées dans des puits de plaques 12 puits. Les cellules sont traitées pendant 24 heures avec la molécule PoroCombo en comparaison avec les molécules témoins.

Les cellules sont rincées au PBS, trypsinées puis fixées et perméabilisées avec 500µL de solution cytofix/cytoperm pendant 20 minutes sur la glace. Après deux lavages avec la solution Perm/Wash buffer 1x, les cellules sont marquées par l'anticorps anti-Caspase 3 active-PE (Ex : 495nm/Em : 595nm) avec 16µL d'anticorps dilués dans 100µL de Perm/Wash buffer pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Un lavage est réalisé puis les cellules sont reprises dans 200µL de Perm/Wash buffer et sont analysées par le cytomètre en flux Accuri-C6 (géré par le logiciel CFlow Plus) sur le filtre 2 (585/42nm) permettant de visualiser le marquage PE.

## 6 Evaluation de la viabilité cellulaire : Test MTT

Le test MTT a été utilisé pour évaluer l'impact de la molécule RAFT-c(RGD)<sub>4</sub>-poro2 sur la viabilité cellulaire.

Le test MTT (bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tétrazolium) permet d'évaluer la viabilité cellulaire en mesurant l'activité mitochondriale. La quantification de ce

test est relative et se fait par rapport à un témoin (les cellules non traitées). Le tétrazolium est réduit par les mitochondries des cellules métaboliquement actives pour former du formazan qui est un précipité violet. La solubilisation des cristaux de formazan permet de mesurer la densité optique et d'en déduire l'activité mitochondriale des cellules et donc leur viabilité.

Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits à raison de  $1,5 \times 10^4$  cellules/puits. Le lendemain elles sont traitées avec les molécules à tester à différentes concentrations ainsi qu'avec les molécules témoins.

Vingt-quatre heures après traitement, quand l'apoptose est suffisamment visible dans les témoins positifs, c'est-à-dire quand les cellules s'arrondissent et se concentrent au centre du puits et non plus en périphérie, le surnageant est retiré et 100 $\mu$ L de DMEM sans rouge de phénol et contenant 10% de MTT reconstitué à 12 $\mu$ M (Calbiochem®) sont ajoutés dans chaque puits.

Après 4 heures d'incubation à 37°C, le milieu avec MTT est retiré et 100 $\mu$ L de solution de solubilisation sont ajoutés avant de placer la plaque sur un agitateur pendant 1 heure.

La solution de solubilisation est composée de 12,5mL de Triton 100%, d'1,25mL d'HCl 10N et d'isopropanol anhydre qsp 125mL.

Enfin la densité optique de chaque puits est lue grâce à un spectrophotomètre de plaques (Beckman Coulter AD340).

$$DO_{\text{échantillon}} = DO_{570\text{nm}} - DO_{620\text{nm}}$$

## **7 Evaluation de l'apoptose cellulaire par marquage au Hoechst**

Le Hoechst est un intercalant de l'ADN fluorescent après excitation par UV. Les cellules vivantes présentent une chromatine homogène alors que les cellules apoptotiques ont une chromatine condensée et fragmentée.

Lors d'un marquage des cellules en plaques 96 puits, 4 $\mu$ L de Hoechst à 20mg/mL (Bis Benzimide H33342 trihydrochloride, Sigma Aldrich®) sont ajoutés à chaque puits et la plaque est placée 5 minutes à 37°C. Les cellules sont rincées au PBS puis trypsinées et reprises dans du milieu de culture contenant 10% de SVF. Les cellules sont centrifugées pendant 5min à 300g à température ambiante. Le surnageant est retiré de façon à laisser environ 20 $\mu$ L.

15 $\mu$ L de cellules sont mis sur une lame de microscopie simple (76mm x 26mm ép 1,1 mm iso 8037, RS France) et une lamelle 22x22mm est placée dessus (Esco 22x22 Erie Scientific Company).

Les cellules sont rapidement visualisées en fluorescence au microscope Olympus BX-41 (Hamburg, Allemagne). 300 noyaux cellulaires sont comptés sur différents champs en différenciant les cellules présentant des corps apoptotiques et celles n'en présentant pas. Le pourcentage de cellules apoptotiques est déterminé.

## **8 Evaluation *ex vivo* de la présence de CSM par Polymerase Chain Reaction**

Afin de réaliser une PCR, la première étape est de choisir des primers spécifiques de la séquence à amplifier. Ainsi, j'ai choisi de détecter la présence de la séquence du récepteur membranaire CD90 spécifique des cellules souches mésenchymateuses humaines. Les primers sont les suivants : primer sens : 5'CCAACCTTCACCAGCAAATACAA ; primer anti-sens : 5' ACTGTGACGTTCTGGGAGGA.

Les organes des souris sont broyés. L'ADN génomique est extrait grâce au minikit DNAg extraction (Invitrogen).

Un mélange contenant 100ng d'ADNg, 2,5 $\mu$ L de Taq buffer 10x (Biolabs), 0,5 $\mu$ L dNTP, 0,75 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5 $\mu$ L primer sens 10 $\mu$ M, 0,75 $\mu$ L primer anti-sens 10 $\mu$ M et de l'eau qsp 25 $\mu$ L est réalisé. Enfin, 0,2 $\mu$ L de Taq polymerase Biolabs est ajouté.

Les tubes sont placés dans un système PCR Thermocycler (Eppendorf, Le Pecq, France) où la séquence suivante est programmée : 5 min à 95°C pour dénaturer l'ADN puis 30 cycles avec des séquences de 30 secondes à 95°C, de 45 secondes à 60°C, de 45 sec à 72°C. Enfin une séquence de 10 minutes à 72°C est réalisée. La séquence est adaptée en fonction de la longueur de la séquence à amplifier, de la température d'hybridation des primers choisis et de la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon.

## **9 Evaluation par Western blot de l'impact du Cetuximab sur les voies de signalisation cellulaire**

J'ai utilisé la technique du Western blot pour identifier l'impact du Cetuximab, fixé ou non sur des nanoparticules, sur la phosphorylation des protéines EGFR, Akt et Erk (P42/44).

### **9.1 Préparation du lysat protéique et dosage**

Afin d'étudier l'expression cellulaire des protéines, une extraction protéique avec du RIPA est réalisée. Les cellules sont rincées et trypsinées puis le culot cellulaire est repris dans un tampon de lyse RIPA constitué de PBS, NP40 1%, SDS 0,1%, PMSF 10µg/mL, EDTA 5mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaPPi 5mM, NaF 10mM, aprotinine 0,5µl/mL auquel nous ajoutons des inhibiteurs des protéases et des phosphatases. Les échantillons sont homogénéisés puis placés pendant 45 minutes sur de la glace avant d'être centrifugés 20min à 13200 rpm à 4°C.

Les protéines des échantillons sont dosées par la méthode de Lowry en utilisant le kit Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Ivry-sur-Seine, France).

Enfin, 40µg de protéines sont repris dans de l'eau milliQ pour avoir un volume final de 10µL et 10µL de Læmmlie 2x sont ajoutés.

### **9.2 Electrophorèse et transfert sur membrane**

Les protéines étudiées ont un poids moléculaire entre 42KDa et 170KDa. J'ai donc choisi d'utiliser des gels d'acrylamide 10%. Pour cela, un mélange d'acrylamide/Bis acrylamide 10% (Sigma Aldrich®), TRIS 0,364µM (Euromedex), SDS 0,1% (Life Technologies®), d'APS 0,1% (Qbiogene) et de Temed 0,16% (Euromedex) repris dans de l'eau milliQ est réalisé et coulé entre deux plaques. De l'eau est ajoutée au dessus pour avoir une surface la plus plane possible.

Une fois le gel polymérisé, l'eau est retirée et le gel de concentration est coulé avec un peigne à 10 dents. Le gel de concentration est composé d'acrylamide/Bis acrylamide 5% (Qbiogene), TRIS 0,126µM (Euromedex), SDS 0,1% (Invitrogen), APS 0,1% (Qbiogene) et Temed 0,2% (Euromedex) repris dans l'eau milliQ.



Les gels sont placés dans les cuves de migration remplies de tampon de migration composé de Glycine 190mM (Euromedex), TRIS 24,76mM (Euromedex), SDS 0,05% (Life Technologies) repris dans de l'eau. Enfin, les échantillons sont déposés dans chaque puits. Le marqueur de poids moléculaire permet de regarder des protéines dont la taille est comprise entre 11 KDa et 250 KDa (Euromedex protein Ladder plus).

Les protéines sont dénaturées par chauffage pendant 5 minutes à 95°C et sont déposées sur les gels. Les protéines migrent pendant 1h30 à 150V.

L'opération de transfert est réalisée entre le gel et la membrane en les plaçant dans une cassette de transfert et en mettant du papier Whatman et des éponges de part et d'autre du gel et de la membrane. La membrane PVDF 0,45µm (GE Healthcare) est préalablement activée en la plongeant dans de l'éthanol. Le transfert est réalisé dans une cuve remplie de tampon de transfert (glycine 190mM, Tris 24,76mM, éthanol 10% repris dans de l'eau) pendant 1h15 à 90V.

### 9.3 Immuno-détection

Les membranes sont récupérées et colorées au rouge Ponceau (0,1% de poudre Ponceau dans une solution d'eau contenant 5% d'acide acétique glacial, Amresco) ce qui me permet de les découper en fonction des différentes protéines à observer. Elles sont mises à saturer dans du lait 5% TBST pendant 1 heure puis sont rincées par trois lavages au TBST.

Les anticorps primaires dilués au 1/1000 sont mis sur les membranes à 4°C sous agitation sur la nuit. Les anticorps utilisés sont les suivants :

- Phospho EGFR : Tyr 1068 XP rabbit dilué au 1/1000 dans BSA 5% /TBST Cell signaling 3777
- Phospho Akt : Ser 473 (D9E) XP rabbit dilué au 1/1000 dans BSA 5%/TBST Cell signaling
- Phospho Erk : P44/42 phospho MAPK (Erk1/2) Tyr 202/Tyr 204 mouse dilué au 1/1000 dans BSA 5%/TBST Cell signalling 9106
- EGFR: XP rabbit Cell signalling 4267 dilué au 1/1000 dans BSA 5% TBST
- Akt pan C67E7 rabbit Cell signalling 4691 dilué au 1/1000 dans BSA 5% TBST
- Erk : P44/42 MAPK Cell signalling 9102 rabbit 1/1000 dilué dans BSA 5% TBST
- Tubuline : clon B.5.1.2 Sr 23948 mouse dilué au 1/1000 dans BSA 5% TBST

Les membranes sont ensuite lavées au TBST et les anticorps secondaires (anti-rabbit IgG HRP-linked Cell signaling ou anti-mouse IgG HRP-linked Cell signaling chacun dilué au 1/2000 dans du lait 5%/TBST) sont ajoutés pendant 1 heure puis les membranes sont lavées. Enfin, les protéines sont révélées sur un film d'autoradiographie (Genesee Scientific) en utilisant de l'ECL (ThermoScientific) ou du Luminata forte (Millipore) et un système de révélateur/fixateur (GBX Kodak dilué au 1/5 dans de l'eau).

## 10 Analyses histologiques des tumeurs

### 10.1 Coupes histologiques

Dans le cas des coupes de tumeur cérébrale, les souris ont été sacrifiées par injection intracardiaque de PBS puis de PFA 4%. Les cerveaux prélevés sont placés pendant 24 heures dans une solution de sucrose 30% puis dans du PBS. Des coupes flottantes, de 10 $\mu$ m, des cerveaux de souris sont réalisées avec un cryomicrotome (2800 frigocut Reichert-Jung® à -20°C) en mettant les cerveaux dans de l'O.C.T compound TissuTek® (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq) et sont placées dans des puits de plaques 12 puits remplis de PBS. Les coupes sont ensuite montées sur des lames de microscope (7.6x2.6mm/3x1 inch, StarFrost®, Braunschweig) et sont observées avec un microscope de fluorescence, après une excitation laser à 457 nm pour visualiser la GFP, avec un objectif x20 ou x40. Les images sont traitées avec le logiciel de traitement d'image ImageJ (NIH, Etats-Unis).

Des coupes ont été réalisées sur les tumeurs sous-cutanées. Dès leur prélèvement, la moitié de la tumeur est placée dans une cupule de cryoconservation et est recouverte de Tissu-Tek® (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq). Les échantillons sont stockés à -80°C.

Des coupes de 7 $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées avec un cryomicrotome Leica CM3050S sur des lames Starfrost®.

Les lames sont stockées à -20°C.

### 10.2 Marquage histologique

#### 10.2.1 Marquage à l'hématoxyline/éosine

Le marquage à l'hématoxyline/éosine permet d'évaluer la densité cellulaire dans un tissu en marquant les noyaux cellulaires en violet et les cytoplasmes en rose.

Les lames sont mises pendant 2 minutes dans un bain d'hæmatoxyline (Sigma Aldrich) puis sont rincées à l'eau avant d'être mises dans un bain d'éosine (eosin Y solution aqueous Sigma Aldrich). Les lames sont rincées à l'eau puis sont plongées dans un bain d'éthanol absolu (Carlo Erba) pendant 6 minutes, puis 3 minutes dans un bain de xylène (Carbo Erba) avant d'être montées avec du Merckoglas® (Merck).

Les coupes sont conservées à température ambiante.

Les coupes sont visualisées avec le microscope Olympus BX41 (logiciel d'acquisition AnalySIS) équipé avec une caméra DP70 couleur.

### 10.2.2 *Marquage des vaisseaux sanguins : CD31*

Le marquage CD31 permet de marquer les cellules endothéliales sur une coupe histologique. Cela nous permettra d'évaluer l'impact d'un traitement sur la néo-angiogénèse tumorale.

Les coupes tumorales de 7µm d'épaisseur sont fixées avec de l'acétone pendant 10 minutes à température ambiante puis les peroxydases endogènes sont bloquées avec de l'eau oxygénée 1% diluée dans du méthanol. Les coupes sont saturées pendant 5 minutes avec du sérum rabbit 5% dilué dans du TBST puis sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire rabbit anti-CD31 (Abcam®) dilué au 1/500 puis, après lavage, pendant 1 heure à température ambiante dans l'anticorps secondaire anti rabbit IgG HRP (Trueblot). Les marquages sont révélés par ajout de DAB (Dako) pendant 20 minutes et les coupes sont rapidement colorées à l'hæmatoxyline. Les lames sont montées avec du Merckoglas® (Merck) puis les coupes sont visualisées avec le microscope Olympus BX41 (logiciel d'acquisition AnalySIS) avec une caméra DP70 couleur.

### 10.2.3 *Marquage de la prolifération : Ki67*

Le marquage de Ki67 permet de marquer sur des coupes histologiques les cellules en prolifération lors du prélèvement du tissu.

Les coupes tumorales de 7µm d'épaisseur sont fixées avec de l'acétone pendant 10 minutes à température ambiante puis les peroxydases endogènes sont bloquées avec de l'eau oxygénée 1% diluée dans du méthanol. Les coupes sont saturées pendant 5 minutes avec du sérum rabbit 5% dilué dans du TBST puis sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire rabbit anti-mouse Ki67 (DakoCytomation) dilué au 1/100 puis, après

lavage, pendant 1 heure à température ambiante dans la solution d'anticorps secondaire rabbit anti-rat HRP (DakoCytomation). Les marquages sont révélés par ajout de DAB (Dako) pendant 15 minutes et les coupes sont rapidement colorées à l'haematoxyline. Les lames sont montées avec du Merckoglas® (Merck) et les coupes sont visualisées avec le microscope Olympus BX41 (logiciel d'acquisition AnalySIS) avec une caméra DP70 couleur.

#### 10.2.4 Marquage de l'apoptose : Caspase 3 active

L'activation de la caspase 3 a lieu durant l'apoptose cellulaire. Ainsi, le marquage immunohistologique de la caspase 3 active permet de marquer les cellules en cours d'apoptose lors du prélèvement du tissu.

Les coupes tumorales de 7µm d'épaisseur sont fixées avec du ParaFormaldéhyde (PFA) 4% pendant 10 minutes à température ambiante puis sont perméabilisées pendant 20 minutes avec de l'eau oxygénée. Les coupes sont saturées pendant 5 minutes avec du sérum rabbit 5% dilué dans du TBS/Triton 5% puis sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire rabbit cleaved caspase 3 Asp 175 (Cell signaling) dilué au 1/800 puis, après lavage, pendant 1 heure à température ambiante dans l'anticorps secondaire anti-rabbit IgG HRP (Trueblot). Les marquages sont révélés par ajout de DAB (Dako) pendant 15 minutes et les coupes sont rapidement colorées à l'haematoxyline. Les lames sont montées avec du Merckoglas® (Merck) et les coupes sont visualisées avec le microscope Olympus BX41 (logiciel d'acquisition AnalySIS) avec une caméra DP70 couleur.

## 11 Les méthodes d'imagerie du petit animal

### 11.1 Imagerie de bioluminescence

La bioluminescence nous permet d'observer la lumière émise par les cellules modifiées pour exprimer la luciférase, suite à l'injection intrapéritonéale de luciférine.

La mesure de la bioluminescence est réalisée sur notre plateforme d'imagerie OPTIMAL sur les appareils Hamamatsu (Photonics), géré par le logiciel d'exploitation Wasabi, et IVIS kinetic (Xenogen), géré par le logiciel d'exploitation Living Image 4.0®.

Dans un premier temps, 300µL de luciférine (150mg/Kg de souris, Perkin-Elmer) sont injectés par voie intra-péritonéale à des souris éveillées. Cinq minutes après l'injection, les souris sont anesthésiées par de l'isoflurane (3% en induction puis 2% en maintien) afin de réaliser une image de la bioluminescence de la tumeur.

Les souris sont maintenues en position horizontale sur un tapis chauffé à 37°C, dans une chambre d'imagerie exempte de lumière, équipée d'une caméra CCD (Hamamatsu Photonics, Massy, France) qui permet la capture des photons issus de la réaction enzymatique luciférase/luciférine. La bioluminescence est quantifiée à l'aide du logiciel Wasabi (Hamamatsu Photonics); le bruit de fond est systématiquement soustrait.

## 11.2 Imagerie par Résonance Magnétique

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) a été pratiquée pour réaliser un suivi de la croissance tumorale sur les souris ayant reçu des cellules de glioblastome humain non marquées à la luciférase (U87). Ces expériences ont été réalisées avec une IRM 7T (Bruker Avance 3 console) en utilisant une antenne de volume pour l'excitation et une antenne de surface pour la détection. Les expériences de résonance magnétique sont réalisées sous anesthésie gazeuse (3% d'isoflurane pour l'induction puis 2% au cours de l'expérience). Les images anatomiques T2 ont été acquises grâce à une séquence IRM turbo-RARE (TR/TE = 3000/10.4ms, NA = 4, 19 coupes avec FOV = 16mm et une taille de voxel = 125x153x1000 $\mu\text{m}^3$ ).

Les volumes tumoraux ont été obtenus grâce au logiciel Image J, en délimitant les tumeurs sur les images des coupes adjacentes obtenues en T2 (chaque coupe a une épaisseur de 1mm), en additionnant la surface tumorale de chaque coupe.

## 11.3 La fluorescence

### 11.3.1 *Evaluation de l'intégrité des membranes mitochondriales in vitro par marquage au TMRM*

Le marquage au TMRM permet de suivre la polarisation de la membrane externe mitochondriale et par conséquent de détecter la formation de pores qui, après relargage du cytochrome-c, conduiront à l'apoptose cellulaire.

La mitochondrie possède une membrane interne et une membrane externe séparées par un espace intermembranaire chargé positivement alors que la membrane externe est chargée négativement. Un stress cellulaire entraîne la libération de protons dans l'espace intermembranaire et donc une augmentation de la charge négative de la membrane externe. A l'inverse, la formation de pores dans la membrane externe entraîne la libération des protons et une diminution de la charge négative de la membrane externe. Le TMRM est un marqueur

fluorescent chargé positivement se fixant donc sur la membrane mitochondriale externe. L'utilisation du TMRM permet de marquer les mitochondries de la cellule (Figure 37 A). Lors d'un suivi de la fluorescence des mitochondries, une augmentation de la fluorescence reflète un stress cellulaire alors qu'une diminution de la fluorescence met en évidence une dépoliarisation de la membrane mitochondriale.

Les cellules sontensemencées dans des Labtek ® 8 puits à fond mince. Le lendemain elles sont placées dans la chambre de culture à 37°C 5% CO<sub>2</sub> sur le microscope confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss). La fluorescence du TMRM est observée avec un réglage de la lumière blanche gain 700 offset -0,44 ; 543nm 0,2% et de la fluorescence gain 800 offset -0,008 ; 543nm 0,2% avec un pinhole 200 (inférieur 5,7µm).

Une séquence *TimeLapse* est démarrée à raison d'une image toutes les 30 secondes. Au bout de 2 minutes, 2µL de TMRM 5mg/mL (Tebu-Bio®, ex 485nm/Em 590nm, dilué dans du DMSO) sont ajoutés aux 400µL de milieu. 30 minutes plus tard, quand la fluorescence est stabilisée, la molécule est ajoutée à la concentration voulue. La séquence *TimeLapse* continue pendant au moins 1 heure.

La quantification de la fluorescence est réalisée sur le logiciel Zen 2010 (Carl Zeiss) avec un grossissement x20 en prenant tout le champ d'observation comme zone d'intérêt.

### 11.3.1 La fluorescence *in vivo* et *ex vivo*

L'étude de la fluorescence *in vivo* est réalisée sur un système 2D-FRI Hamamatsu (Photonics). Les souris sont illuminées par des diodes à 660nm équipées de filtres interférents. Les images de réflectance de fluorescence (FRI) ont été acquises avec une caméra CCD et un filtre high pass RG 9 (Melle Griot, Voisin le Bretonneux, France) en vue d'éliminer toute la lumière d'excitation. Les images de fluorescence sont superposées à l'image en noir et blanc pour une meilleure localisation du signal de fluorescence. Les données semi-quantitatives sont obtenues à partir des images de fluorescence en dessinant les régions d'intérêt. La fluorescence émise est quantifiée (le bruit de fond est systématiquement soustrait). Les résultats sont exprimés en RLU (Relative Light Unit)/pixel/100ms. L'acquisition, l'analyse et la quantification des images sont réalisées à l'aide du logiciel Wasabi (Hamamatsu Photonics).

La fluorescence 3D, utilisée pour évaluer la fixation de l'anticorps ou des nanoémulsions au niveau pulmonaire, a été réalisée sur un Tomographe-3D. Les souris sont maintenues endormies à l'isoflurane 2% et placées sur un lit constitué de deux plaques de plexiglass afin d'obtenir une épaisseur connue de l'animal et pouvoir reconstruire le signal de fluorescence en 3D grâce à l'utilisation d'un algorithme. Afin de visualiser le DiD, les acquisitions sont réalisées avec le filtre 2 (700 nm).

#### **11.4 Rayons X**

L'utilisation du scanner à rayons X permet d'évaluer la croissance et la position tumorale pulmonaire dans le cas de l'utilisation de cellules cancéreuses non bioluminescentes.

Les séquences de scanner à rayons X ont été réalisées sur un système vivaCT 40 Scanco Medical. Les souris sont endormies par de l'isoflurane 3% et sont maintenues anesthésiées par de l'isoflurane 2% tout au long de l'expérimentation. Les souris sont placées dans le lit bimodal (développé par notre groupe) adapté au Tomographe-3D et au scanner.

La séquence est réalisée à 45KeV, avec un temps de 200ms en une fois avec 250 projections/180°C.

La reconstruction de l'image permet de modéliser l'air présent dans les poumons. En considérant que les zones tumorales sont privées d'air, nous obtenons une modélisation des nodules tumoraux présents dans les poumons.

*Références*

*Bibliographiques*



## A

- Acuff, H. B., M. Sinnamon, et al. (2006). "Analysis of host- and tumor-derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer." *Cancer Res* **66**(16): 7968-7975.
- Al-Khalidi, A., N. Eliopoulos, et al. (2003). "Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo." *Gene Ther* **10**(8): 621-629.
- Avraamides, C. J., B. Garmy-Susini, et al. (2008). "Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis." *Nat Rev Cancer* **8**(8): 604-617.

## B

- Balyasnikova, I. V., S. D. Ferguson, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells modified with a single-chain antibody against EGFRvIII successfully inhibit the growth of human xenograft malignant glioma." *PLoS One* **5**(3): e9750.
- Beckermann, B. M., G. Kallifatidis, et al. (2008). "VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma." *Br J Cancer* **99**(4): 622-631.
- Birnbaum, T., J. Roider, et al. (2007). "Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines." *J Neurooncol* **83**(3): 241-247.
- Boddington, S. E., T. D. Henning, et al. (2010). "Labeling human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes with indocyanine green for noninvasive tracking with optical imaging: an FDA-compatible alternative to firefly luciferase." *Cell Transplant* **19**(1): 55-65.
- Boturyn, D., J. L. Coll, et al. (2004). "Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis." *J Am Chem Soc* **126**(18): 5730-5739.
- Bouchet Alain, C. J. (1971). *Livre d'anatomie*. Villeurbanes, France.
- Briat, A., C. H. Wenk, et al. (2012). "Reduction of renal uptake of <sup>111</sup>In-DOTA-labeled and A700-labeled RAFT-RGD during integrin alphavbeta3 targeting using single photon emission computed tomography and optical imaging." *Cancer Sci* **103**(6): 1105-1110.
- Busser, B., J. L. Coll, et al. (2009). "The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer." *Pathol Biol (Paris)* **57**(7-8): 511-512.
- Busser, B., L. Sancey, et al. (2010). "Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers." *Mol Ther* **18**(3): 528-535.
- Byzova, T. V., R. Rabbani, et al. (1998). "Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology." *Thromb Haemost* **80**(5): 726-734.

## C

- Cassidy, P. J. and G. K. Radda (2005). "Molecular imaging perspectives." *J R Soc Interface* **2**(3): 133-144.
- Charbord, P. (2010). "Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts." *Hum Gene Ther* **21**(9): 1045-1056.
- Choi, H. S., Y. Ashitate, et al. (2010). "Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body." *Nat Biotechnol* **28**(12): 1300-1303.
- Ciardiello, F. and G. Tortora (2008). "EGFR antagonists in cancer treatment." *N Engl J Med* **358**(11): 1160-1174.
- Coll, J. L., A. Negoescu, et al. (1998). "Antitumor activity of bax and p53 naked gene transfer in lung cancer: in vitro and in vivo analysis." *Hum Gene Ther* **9**(14): 2063-2074.
- Couffin AC, D. T. (march 2013). "vecteur lipidiques en tant que nanomédicaments." *Techniques de l'Ingénieur*.
- Cox, D., M. Brennan, et al. (2010). "Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities." *Nat Rev Drug Discov* **9**(10): 804-820.



- Danhier, F., A. Le Breton, et al. (2012). "RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis." Mol Pharm **9**(11): 2961-2973.
- De Luca, A., M. Gallo, et al. (2011). "Role of the EGFR ligand/receptor system in the secretion of angiogenic factors in mesenchymal stem cells." J Cell Physiol **226**(8): 2131-2138.
- Desgrosellier, J. S. and D. A. Cheresh (2010). "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." Nat Rev Cancer **10**(1): 9-22.
- Detante, O., A. Moisan, et al. (2009). "Intravenous administration of 99mTc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: in vivo imaging and biodistribution." Cell Transplant **18**(12): 1369-1379.
- Doki, Y., K. Murakami, et al. (1999). "Mediastinal lymph node metastasis model by orthotopic intrapulmonary implantation of Lewis lung carcinoma cells in mice." Br J Cancer **79**(7-8): 1121-1126.
- Dubrez, L., J. L. Coll, et al. (2001). "Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein." J Biol Chem **276**(42): 38980-38987.
- Dufort, S., M. J. Richard, et al. (2009). "Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues." Anal Biochem **391**(2): 166-168.
- Dufort, S., M. J. Richard, et al. (2011). "Pyrosequencing, a method approved to detect the two major EGFR mutations for anti EGFR therapy in NSCLC." J Exp Clin Cancer Res **30**: 57.
- Dufort, S., L. Sancey, et al. (2011). "Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors in vivo." J Drug Target **19**(7): 582-588.
- Dufort, S., L. Sancey, et al. (2010). "Optical small animal imaging in the drug discovery process." Biochim Biophys Acta **1798**(12): 2266-2273.
- Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." N Engl J Med **315**(26): 1650-1659.
- Dwyer, R. M., S. Khan, et al. (2010). "Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer." Stem Cell Res Ther **1**(3): 25.



- Faraji, A. H. and P. Wipf (2009). "Nanoparticles in cellular drug delivery." Bioorg Med Chem **17**(8): 2950-2962.
- Feng, B. and L. Chen (2009). "Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator?" Cancer Biother Radiopharm **24**(6): 717-721.
- Frangioni, J. V. (2003). "In vivo near-infrared fluorescence imaging." Curr Opin Chem Biol **7**(5): 626-634.



- Gabizon, A. A. (2001). "Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy." Cancer Invest **19**(4): 424-436.
- Garanger, E., D. Boturyn, et al. (2006). "Multivalent RGD synthetic peptides as potent alphaVbeta3 integrin ligands." Org Biomol Chem **4**(10): 1958-1965.
- Garanger, E., D. Boturyn, et al. (2005). "New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors." Mol Ther **12**(6): 1168-1175.
- Garcia de Palazzo, I. E., G. P. Adams, et al. (1993). "Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas." Cancer Res **53**(14): 3217-3220.
- Gerlag, D. M., E. Borges, et al. (2001). "Suppression of murine collagen-induced arthritis by targeted apoptosis of synovial neovasculature." Arthritis Res **3**(6): 357-361.

- Guillemin, Y., J. Lopez, et al. (2010). "Active fragments from pro- and antiapoptotic BCL-2 proteins have distinct membrane behavior reflecting their functional divergence." PLoS One **5**(2): e9066.
- Guo, W. and F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 816-826.



- Hamada, H., M. Kobune, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy." Cancer Sci **96**(3): 149-156.
- Haubner, R., H. J. Wester, et al. (2001). "Noninvasive imaging of alpha(v)beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography." Cancer Res **61**(5): 1781-1785.
- Heldin, C. H., K. Rubin, et al. (2004). "High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy." Nat Rev Cancer **4**(10): 806-813.
- Heurtault, B., P. Saulnier, et al. (2003). "The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution." European journal of pharmaceutical sciences **18**(1): 55-61.
- Hirsjarvi, S., S. Dufort, et al. (2013). "Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models." Nanomedicine **9**(3): 375-387.
- Holbro, T., G. Civenni, et al. (2003). "The ErbB receptors and their role in cancer progression." Exp Cell Res **284**(1): 99-110.
- Holbro, T. and N. E. Hynes (2004). "ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 195-217.
- Hu, Y. L., Y. H. Fu, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells: a promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy." J Control Release **147**(2): 154-162.
- Hurbin, A., J. L. Coll, et al. (2005). "Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells." J Biol Chem **280**(20): 19757-19767.
- Hurbin, A., M. Wislez, et al. (2011). "Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma." J Pathol **225**(1): 83-95.



- Iida, M., T. M. Brand, et al. (2013). "Targeting AKT with the allosteric AKT inhibitor MK-2206 in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to cetuximab." Cancer Biol Ther **14**(6): 481-491.
- Iyer, A. K., G. Khaled, et al. (2006). "Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting." Drug Discov Today **11**(17-18): 812-818.



- Jain, R. K. and L. E. Gerlowski (1986). "Extravascular transport in normal and tumor tissues." Crit Rev Oncol Hematol **5**(2): 115-170.
- Jeannot V, B. B., Brambilla E, Wislez M, Robin B, Cadranet J, Coll JL, Hurbin A (2013). "The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant KRAS lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism." International Journal of Cancer In press.
- Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
- Jin, Z. H., V. Jossierand, et al. (2007). "In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors." Mol Cancer **6**: 41.
- Jin, Z. H., V. Jossierand, et al. (2006). "Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK)-4." Mol Imaging **5**(3): 188-197.

Jin, Z. H., J. Razkin, et al. (2007). "In vivo noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD internalization using self-quenched Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)(4)." Mol Imaging **6**(1): 43-55.

### *K*

- Kabanov, A. V. and S. V. Vinogradov (2009). "Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities." Angew Chem Int Ed Engl **48**(30): 5418-5429.
- Kahn, J., P. J. Tofilon, et al. (2012). "Preclinical models in radiation oncology." Radiat Oncol **7**: 223.
- Kallifatidis, G., B. M. Beckermann, et al. (2008). "Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer." Cancer Gene Ther **15**(4): 231-240.
- Keramidas, M., F. de Fraipont, et al. (2013). "The dual effect of mscs on tumour growth and tumour angiogenesis." Stem Cell Res Ther **4**(2): 41.
- Keramidas, M., V. Josserand, et al. (2013). "Noninvasive and quantitative assessment of in vivo angiogenesis using RGD-based fluorescence imaging of subcutaneous sponges." Mol Imaging Biol **15**(3): 239-244.
- Keramidas, M., V. Josserand, et al. (2010). "Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model." Br J Surg **97**(5): 737-743.
- Kidd, S., L. Caldwell, et al. (2010). "Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment." Cytotherapy **12**(5): 615-625.
- Kidd, S., E. Spaeth, et al. (2009). "Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging." Stem Cells **27**(10): 2614-2623.
- Kinnaird, T., E. Stabile, et al. (2004). "Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms." Circ Res **94**(5): 678-685.
- Kircher, M. F. and J. K. Willmann (2012). "Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. Part II. Applications." Radiology **264**(2): 349-368.
- Koenig, A., L. Herve, et al. (2010). "Fluorescence diffuse optical tomography for free-space and multifluorophore studies." J Biomed Opt **15**(1): 016016.
- Kosztowski, T., H. A. Zaidi, et al. (2009). "Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas." Expert Rev Anticancer Ther **9**(5): 597-612.

### *L*

- Lalier, L., P. F. Cartron, et al. (2007). "Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis." Apoptosis **12**(5): 887-896.
- Li, B., A. Torossian, et al. (2011). "A novel bioluminescence orthotopic mouse model for advanced lung cancer." Radiat Res **176**(4): 486-493.
- Li, S., K. R. Schmitz, et al. (2005). "Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab." Cancer Cell **7**(4): 301-311.
- Lievre, A., J. B. Bachet, et al. (2006). "KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer." Cancer Res **66**(8): 3992-3995.
- Lilenbaum, R. C. (2006). "The evolving role of cetuximab in non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **12**(14 Pt 2): 4432s-4435s.
- Liu, Y., Z. P. Han, et al. (2011). "Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer." J Biol Chem **286**(28): 25007-25015.
- Loebinger, M. R., A. Eddaoudi, et al. (2009). "Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer." Cancer Res **69**(10): 4134-4142.

- Loebinger, M. R. and S. M. Janes (2010). "Stem cells as vectors for antitumour therapy." Thorax **65**(4): 362-369.
- Loebinger, M. R., P. G. Kyratatos, et al. (2009). "Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles." Cancer Res **69**(23): 8862-8867.
- Luo, B. H., C. V. Carman, et al. (2007). "Structural basis of integrin regulation and signaling." Annu Rev Immunol **25**: 619-647.



- Maeda, H. (2012). "Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond." J Control Release **164**(2): 138-144.
- Manzotti, C., R. A. Audisio, et al. (1993). "Importance of orthotopic implantation for human tumors as model systems: relevance to metastasis and invasion." Clin Exp Metastasis **11**(1): 5-14.
- Matsumura, Y. and H. Maeda (1986). "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs." Cancer Res **46**(12 Pt 1): 6387-6392.
- Matushansky, I., E. Hernando, et al. (2007). "Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway." J Clin Invest **117**(11): 3248-3257.
- Matuskova, M., K. Hlubinova, et al. (2010). "HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells." Cancer Lett **290**(1): 58-67.
- Menge, T., M. Gerber, et al. (2013). "Human mesenchymal stem cells inhibit endothelial proliferation and angiogenesis via cell-cell contact through modulation of the VE-Cadherin/beta-catenin signaling pathway." Stem Cells Dev **22**(1): 148-157.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2001). "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice." Pharmacol Rev **53**(2): 283-318.
- Mordant, P., Y. Lorient, et al. (2011). "Bioluminescent orthotopic mouse models of human localized non-small cell lung cancer: feasibility and identification of circulating tumour cells." PLoS One **6**(10): e26073.
- Moscatello, D. K., M. Holgado-Madruga, et al. (1995). "Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors." Cancer Res **55**(23): 5536-5539.
- Motaln, H., C. Schichor, et al. (2010). "Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies." Cancer **116**(11): 2519-2530.



- Nakadate, Y., Y. Kodera, et al. (2013). "KRAS mutation confers resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against human colorectal cancer cells." Int J Cancer.
- Nakamizo, A., F. Marini, et al. (2005). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas." Cancer Res **65**(8): 3307-3318.
- Nakamura, K., Y. Ito, et al. (2004). "Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model." Gene Ther **11**(14): 1155-1164.
- Nicholson, R. I., J. M. Gee, et al. (2001). "EGFR and cancer prognosis." Eur J Cancer **37 Suppl 4**: S9-15.
- Normanno, N., A. De Luca, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer." Gene **366**(1): 2-16.
- Ntziachristos, V., J. Ripoll, et al. (2005). "Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging." Nat Biotechnol **23**(3): 313-320.



- O'Reilly, M. S., T. Boehm, et al. (1997). "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." Cell **88**(2): 277-285.

- Onn, A., T. Isobe, et al. (2003). "Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice." Clin Cancer Res **9**(15): 5532-5539.
- Overholser, J. P., M. C. Prewett, et al. (2000). "Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice." Cancer **89**(1): 74-82.
- Ozawa, K., K. Sato, et al. (2008). "Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs)." J Autoimmun **30**(3): 121-127.
- Ozawa, T. and C. D. James (2010). "Establishing intracranial brain tumor xenografts with subsequent analysis of tumor growth and response to therapy using bioluminescence imaging." J Vis Exp(41).

*S*

- Pallis, A. G., L. Serfass, et al. (2009). "Targeted therapies in the treatment of advanced/metastatic NSCLC." Eur J Cancer **45**(14): 2473-2487.
- Parekkadan, B. and J. M. Milwid (2010). "Mesenchymal stem cells as therapeutics." Annu Rev Biomed Eng **12**: 87-117.
- Parveen, S., R. Misra, et al. (2012). "Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging." Nanomedicine **8**(2): 147-166.
- Perez-Soler, R., B. Kemp, et al. (2000). "Response and determinants of sensitivity to paclitaxel in human non-small cell lung cancer tumors heterotransplanted in nude mice." Clin Cancer Res **6**(12): 4932-4938.
- Pirker, R., J. R. Pereira, et al. (2009). "Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial." Lancet **373**(9674): 1525-1531.
- Pisters, K. M., W. K. Evans, et al. (2007). "Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non small-cell lung cancer guideline." J Clin Oncol **25**(34): 5506-5518.
- Plumas, J., L. Chaperot, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells." Leukemia **19**(9): 1597-1604.
- Porada, C. D. and G. Almeida-Porada (2010). "Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery." Adv Drug Deliv Rev **62**(12): 1156-1166.
- Prabhakar, U., H. Maeda, et al. (2013). "Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology." Cancer research **73**(8): 2412-2417.
- Pysz, M. A., S. S. Gambhir, et al. (2010). "Molecular imaging: current status and emerging strategies." Clin Radiol **65**(7): 500-516.

*T*

- Qiao, L., Z. Xu, et al. (2008). "Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model." Cell Res **18**(4): 500-507.

*R*

- Razkin, J., V. Jossierand, et al. (2006). "Activatable fluorescent probes for tumour-targeting imaging in live mice." ChemMedChem **1**(10): 1069-1072.
- Rebucci, M., P. Peixoto, et al. (2011). "Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: role of AKT inhibition in bypassing this resistance." Int J Oncol **38**(1): 189-200.
- Roger, M., A. Clavreul, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors." Biomaterials **31**(32): 8393-8401.

- Rosell, R., G. Robinet, et al. (2008). "Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer." Ann Oncol **19**(2): 362-369.
- Ruggeri, B. A. and F. Camp (2013). "Animal Models of Disease: Pre-clinical Animal Models of Cancer and Their Applications and Utility in Drug Discovery." Biochem Pharmacol.



- Salomon, D. S., R. Brandt, et al. (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." Crit Rev Oncol Hematol **19**(3): 183-232.
- Sancey, L., V. Ardisson, et al. (2007). "In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the alpha(v)beta (3) integrin-targeted tracer 99mTc-RAFT-RGD." Eur J Nucl Med Mol Imaging **34**(12): 2037-2047.
- Sancey, L., S. Dufort, et al. (2009). "Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging." Int J Pharm **379**(2): 309-316.
- Sancey, L., E. Garanger, et al. (2009). "Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide." Mol Ther **17**(5): 837-843.
- Sanz, L., P. Santos-Valle, et al. (2008). "Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels." Microvasc Res **75**(3): 308-314.
- Sasportas, L. S., R. Kasmieh, et al. (2009). "Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4822-4827.
- Sato, A., B. Klaunberg, et al. (2004). "In vivo bioluminescence imaging." Comp Med **54**(6): 631-634.
- Scartozzi, M., R. Giampieri, et al. (2012). "Phosphorylated AKT and MAPK expression in primary tumours and in corresponding metastases and clinical outcome in colorectal cancer patients receiving irinotecan-cetuximab." J Transl Med **10**: 71.
- Schreiber, A. B., I. Lax, et al. (1981). "Monoclonal antibodies against receptor for epidermal growth factor induce early and delayed effects of epidermal growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7535-7539.
- Scotté F, C. P., Andrieu JM Cancérologie.
- Sibilia, M. and E. F. Wagner (1995). "Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor." Science **269**(5221): 234-238.
- Sobrero, A. F., J. Maurel, et al. (2008). "EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **26**(14): 2311-2319.
- Soling, A. and N. G. Rainov (2003). "Bioluminescence imaging in vivo - application to cancer research." Expert Opin Biol Ther **3**(7): 1163-1172.
- Sun, B., S. Zhang, et al. (2005). "Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow." Stem Cells Dev **14**(3): 292-298.
- Suzuki, K., R. Sun, et al. (2011). "Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization." Mol Med **17**(7-8): 579-587.
- Svenson, S. (2013). "Theranostics: are we there yet?" Mol Pharm **10**(3): 848-856.



- Tada, H., H. Higuchi, et al. (2007). "In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice." Cancer Res **67**(3): 1138-1144.
- Takata, M., H. Chikumi, et al. (2012). "Lack of AKT activation in lung cancer cells with EGFR mutation is a novel marker of cetuximab sensitivity." Cancer Biol Ther **13**(6): 369-378.
- Talmadge, J. E., R. K. Singh, et al. (2007). "Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer." Am J Pathol **170**(3): 793-804.

- Tang, J., J. Wang, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells over-expressing SDF-1 promote angiogenesis and improve heart function in experimental myocardial infarction in rats." Eur J Cardiothorac Surg **36**(4): 644-650.
- Temming, K., R. M. Schiffelers, et al. (2005). "RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature." Drug Resist Updat **8**(6): 381-402.
- Tseng, C. L., I. L. Shih, et al. (2010). "Gadolinium hexanedione nanoparticles for stem cell labeling and tracking via magnetic resonance imaging." Biomaterials **31**(20): 5427-5435.
- Valero, J. G., L. Sancey, et al. (2011). "Bax-derived membrane-active peptides act as potent and direct inducers of apoptosis in cancer cells." J Cell Sci **124**(Pt 4): 556-564.
- Van Damme, A., L. Thorrez, et al. (2006). "Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells." Stem Cells **24**(4): 896-907.
- Wang, H., F. Cao, et al. (2009). "Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging." Stem Cells **27**(7): 1548-1558.
- Wang, X., Z. Zhang, et al. (2011). "Angiogenic activity of mesenchymal stem cells in multiple myeloma." Cancer Invest **29**(1): 37-41.
- Wang, Y., P. R. Crisostomo, et al. (2008). "TGF-alpha increases human mesenchymal stem cell-secreted VEGF by MEK- and PI3-K- but not JNK- or ERK-dependent mechanisms." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **295**(4): R1115-1123.
- Weissleder, R. (2001). "A clearer vision for in vivo imaging." Nat Biotechnol **19**(4): 316-317.
- Weissleder, R. and U. Mahmood (2001). "Molecular imaging." Radiology **219**(2): 316-333.
- Weissleder, R. and M. J. Pittet (2008). "Imaging in the era of molecular oncology." Nature **452**(7187): 580-589.
- Wenk, C. H., F. Ponce, et al. (2013). "Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti-alpha5beta1 integrin molecular probe." Cancer Lett **334**(2): 188-195.
- Wu, J. C., G. Sundaresan, et al. (2001). "Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice." Mol Ther **4**(4): 297-306.
- Wu, Y., L. Chen, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis." Stem Cells **25**(10): 2648-2659.
- Xu, X. P., D. Zhai, et al. (2013). "Three-dimensional structure of Bax-mediated pores in membrane bilayers." Cell Death Dis **4**: e683.
- Yamatodani, T., L. Ekblad, et al. (2009). "Epidermal growth factor receptor status and persistent activation of Akt and p44/42 MAPK pathways correlate with the effect of cetuximab in head and neck and colon cancer cell lines." J Cancer Res Clin Oncol **135**(3): 395-402.
- Yong, R. L., N. Shinojima, et al. (2009). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas." Cancer Res **69**(23): 8932-8940.
- Zhu, Y., Z. Sun, et al. (2009). "Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1." Leukemia **23**(5): 925-933.
- Zielske, S. P., D. L. Livant, et al. (2009). "Radiation increases invasion of gene-modified mesenchymal stem cells into tumors." Int J Radiat Oncol Biol Phys **75**(3): 843-853.



## DEVELOPPEMENT DE VECTEURS CIBLANTS POUR LA DETECTION ET LA THERAPIE DES TUMEURS

La bonne prise en charge des tumeurs repose sur un diagnostic précoce et une thérapie ciblée efficace. Nous étudions dans ce projet trois outils théranostiques, différents par leur origine et par leurs caractéristiques, afin de démontrer leur intérêt pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs.

Le premier est un outil biologique, les cellules souches mésenchymateuses humaines connues pour leur tropisme naturel pour les sites inflammatoires et/ou hypoxiques, qui devrait donc leur permettre d'atteindre les tumeurs.

Le deuxième outil consiste en des nanoparticules fonctionnalisées ou non avec un ligand ciblant les cellules tumorales, délivrées sous forme de spray dans les poumons. Cette méthode présente l'avantage de développer un outil peu invasif pouvant être administré chez un patient présentant un cancer du poumon disséminé.

Le dernier est un outil synthétique, bien défini structurellement, synthétisable de manière reproductible, de petite taille, qui, après une administration par voie systémique cible les cellules tumorales primaires ou métastasées.

Mes travaux permettent de mettre en évidence que, bien que les cellules souches mésenchymateuses ne soient pas de bons vecteurs pour le diagnostic et pour véhiculer un agent vers la tumeur, elles permettent de normaliser la vascularisation tumorale et de réorganiser les flux sanguins au sein de la tumeur. Ceci présente un éventuel intérêt thérapeutique, bien que complexe à mettre en application, qui pourrait ouvrir la porte à un pré-traitement « normalisateur » de la vascularisation tumorale.

L'étude sur les nanovecteurs aérosolisés montre qu'ils peuvent être utiles, non seulement pour le ciblage tumoral passif mais également pour le ciblage actif lorsqu'ils sont greffés avec un anticorps monoclonal spécifique des cellules tumorales puisqu'ils permettent de détecter des nodules tumoraux répartis dans les poumons. De plus, le Cetuximab utilisé ici comme agent de ciblage acquiert des propriétés nouvelles lorsqu'il est présenté sur des nanoparticules et permettrait de diminuer la résistance des cellules tumorales au traitement.

Enfin, la petite molécule synthétique PoroCombo que nous développons à partir de nos travaux antérieurs sur le vecteur RAFT-RGD semble être la plus appropriée des trois pour délivrer une drogue dans le cytoplasme des cellules après injection par voie systémique. De plus, cette molécule présente une triple activité anti-tumorale avec l'induction de la mort cellulaire ainsi qu'un effet anti-angiogénique et le possible déclenchement d'une réaction immunitaire anti-tumorale.

Les trois « biovecteurs » étudiés ouvrent la porte vers un grand nombre d'applications permettant d'améliorer la prise en charge des tumeurs.

**Mots clefs : tumeur, thérapie ciblée, imagerie *in vivo***

---

A good tumor treatment relies on an early diagnosis and an efficient targeted therapy.

Three theranostic tools are studied, each one having a different origin and different properties, in order to show their interest for tumor's imaging and therapy.

The first tool is a biologic one, human mesenchymal stem cells (MSC) having a natural tropism toward inflammatory and/or hypoxic sites, which should permit them to reach tumors.

The second one is nanoparticles, functionalized or not with an antibody targeting tumor cells, delivered by a lung spray. By this method we develop a non-invasive tool to treat patients with a disseminated lung tumor.

The last one is a synthetic small sized theranostic tool with a reproducible synthesis, which, after a systemic administration, targets primary and metastatic tumor cells.

By my work, I show that even if MSC are not good vectors for diagnosis and delivery of therapeutic agents to the tumors' sites, they normalize tumors' vessels, improving blood flow inside the tumor. This property presents a real therapeutic interest, by pre-treating tumors before using chemotherapy.

The study of aerosolized nanovectors reveals their interest for passive tumor targeting and for an active one when grafted with a specific monoclonal antibody as they permit the detection of tumor nodules disseminated in the lungs.

More, the targeting agent Cetuximab acquires new properties when grafted on nanoparticles permitting to decrease tumor cells resistance to the treatment.

Finally, the small synthetic molecule PoroCombo developed from our previous work on RAFT-RGD vectors, seems to be the most appropriated to deliver a molecule in the cell's cytoplasm after a systemic administration.

This molecule has three anti-tumor activities by inducing cell death, by inducing anti-angiogenic impact and by triggering anti-tumor immune reaction.

The three studied "biovectors" reveal large applications to improve tumors' treatment.

**Key words: tumor, targeted therapy, *in vivo* imaging**