



HAL
open science

Place des nanoparticules pour lutter contre la radio-résistance du cancer du sein : impact de l'hétérogénéité tumorale

Marie Hullo

► **To cite this version:**

Marie Hullo. Place des nanoparticules pour lutter contre la radio-résistance du cancer du sein : impact de l'hétérogénéité tumorale. Cancer. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL004 . tel-03540094

HAL Id: tel-03540094

<https://theses.hal.science/tel-03540094>

Submitted on 23 Jan 2022

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.

PLACE DES NANOPARTICULES POUR
LUTTER CONTRE LA RADIO-
RESISTANCE DU CANCER DU SEIN :
IMPACT DE L'HETEROGENEITE
TUMORALE

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 : oncologie : biologie - médecine - santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Unité de recherche : CEA, DRF, IBFJ, IRCM, Laboratoire de Cancérologie Expérimentale
Université Paris-Saclay, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France
Réfèrent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 22/01/2021, par

Marie HULLO

Composition du Jury

Pr. Sandrine LACOMBE, CNRS – Université Paris Saclay	Présidente du Jury
Pr. Chann LAGADEC, INSERM – Université de Lille	Rapporteur
Pr. Juliette THARIAT, CNRS – Normandie Université	Rapporteur
Dr. Antonin LEVY, IGR – Université Paris Saclay	Examineur
Dr. Fabrice NESSLANY, IPL – Université de Lille	Examineur
Dr. Sylvie CHEVILLARD, CEA – Université Paris Saclay	Directrice de thèse
Dr. Romain GRALL, CEA – Université Paris Saclay	Membre invité

*« En réalité, on sait seulement quand on sait peu.
Avec le savoir augmente le doute »*

– Johann Wolfgang Von Goethe –

Remerciements

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	17
PREAMBULE	19
ETAT DE L'ART	21
CANCERS ET HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE DU CANCER DU SEIN	21
1. ÉPIDEMIOLOGIE DU CANCER DU SEIN	23
2. CLASSIFICATION DU CANCER DU SEIN	24
2.1 Classification clinique	25
2.2 Classification histo-morphologique	26
2.3 Classification moléculaire	26
2.4 Classification génomique	28
3. PROPRIETES SINGULIERES DES CELLULES TUMORALES	29
4. TRAITEMENTS DU CANCER DU SEIN	33
5. MODELE DE PROGRESSION TUMORALE	36
5.1 Métastases	36
5.2 Cascade métastatique	37
5.3 Transition épithélio-mésenchymateuse	38
5.4 Autres propriétés des cellules mésenchymateuses	42
6. HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE DU CANCER DU SEIN	42
6.1 Modèle stochastique	43
6.2 Modèle hiérarchique	44
6.3 Cellules souches cancéreuses	45
6.4 Population CD44 ⁺ /CD24 ^{low/-}	47
RADIOTHERAPIE ET HETEROGENEITE FONCTIONNELLE DU CANCER DU SEIN	49
1. PRINCIPE DE LA RADIOTHERAPIE	51
1.1 Rayonnements ionisants	51
1.2 Interactions rayonnements/matière	52
2. EFFETS BIOLOGIQUES DE LA RADIOTHERAPIE	55
2.1 Effets ciblés de la radiothérapie	55
2.2 Effets non ciblés de la radiothérapie	60
2.3 Effets indésirables de la radiothérapie	63
3. RADIO-RESISTANCE	65
4. OPTIONS THERAPEUTIQUES	68
4.1 Améliorations technologiques et cliniques	68
4.2 Potentialisation des effets biologiques	72

NANOPARTICULES METALLIQUES POUR LA RADIO-SENSIBILISATION DU CANCER DU SEIN	77
1. INTRODUCTION AUX NANOPARTICULES	79
1.1 Historique et définitions des nanoparticules	79
1.2 Classification des nanoparticules	80
1.3 Spécificité d'échelle	81
1.4 Applications biomédicales des nanoparticules métalliques	84
2. NANOPARTICULES METALLIQUES EN ASSOCIATION AVEC LA RADIOTHERAPIE	87
2.1 Principe de la radiothérapie potentialisée par des nanoparticules	87
2.2 Nanoparticules métalliques en développement	91
OBJECTIFS GENERAUX	97
METHODOLOGIES	99
1. CARACTERISATION DES MODELES CELLULAIRES	99
2. TRAITEMENTS APPLIQUES AUX CELLULES EN CULTURE	103
3. ÉTUDES DE LA REPONSE CELLULAIRE <i>IN VITRO</i>	109
4. ÉTUDES DE LA REPONSE TUMORALE <i>IN VIVO</i>	113
RESULTATS	115
1. POTENTIEL RADIO-SENSIBILISANT DES NANOPARTICULES	115
1.1 Étude du potentiel-radio sensibilisant de nanoparticules de platine <i>in vitro</i> et <i>in silico</i>	115
1.2 Étude du potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules d'or <i>in vitro</i>	135
1.3 Étude du potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules d'or <i>in vivo</i>	149
2. DIFFERENTIEL D'INTERNALISATION DES NANOPARTICULES	155
2.1 Étude du différentiel d'entrée des nanoparticules selon la nature épithéliale ou mésoenchymateuse des cellules tumorales	155
2.2 Origines de l'internalisation différentielle des nanoparticules	160
2.3 Étude du rôle de la matrice extra-cellulaire dans l'internalisation des nanoparticules	168
DISCUSSION	177
1. CONTEXTE GENERAL DE L'HETEROGENEITE TUMORALE MAMMAIRE	177
2. INTERNALISATION DES NANOPARTICULES DANS LES CELLULES TUMORALES	181
3. COMPREHENSION DU DIFFERENTIEL D'ENTREE DES NANOPARTICULES	185
4. POTENTIEL RADIO-SENSIBILISANT DES NANOPARTICULES DE HAUT-Z	193
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	201
ANNEXES	205
Annexe I : Applications biomédicales des nanoparticules métalliques	205
Annexe II : Mise au point de la sp-ICP-MS pour la mesure de la distribution en taille et de la concentration intra-cellulaire en nanoparticules d'or (publication)	209
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	223

Liste des abréviations

¹³⁷Cs	Césium 137	G_dNP	Nanoparticules de gadolinium
3D-CRT	Radiothérapie conformationnelle en trois dimensions	GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages
A_{DN}	Acide désoxyribonucléique	GO	Ontologie des gènes
AH	Acide hyaluronique	GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
ALDH1	Aldéhyde deshydrogénase de type 1	GSH	Glutathion réduit
ARN	Acide ribonucléique	Gy	Gray
AuNP	Nanoparticule d'or	H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
C_D	Cluster de différenciation	HABP	<i>Hyaluronic acid binding protein</i>
CeO₂	Dioxyde de cérium	HAS2	Hyaluronan Synthase de type 2
CSC	Cellule souche cancéreuse	HER2	Récepteur de type 2 aufacteur de croissance épidermique humain
CT-Scan	Tomodensitométrie	HfO₂	Oxyde d'hafnium
CTC	Cellule tumorale circulante	HIF	Facteur induit par l'hypoxie
CTLA-4	Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques	HMLE	Cellules épithéliales mammaires immortalisées
Cy5	Cyanine 5	HO[•]	Radical hydroxyle
DAMP	Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires	ICP-MS	<i>Inductively Coupled Mass Spectrometry</i>
DC	Cellule dendritique	IG	Instabilité génomique
DEF	<i>Dose enhancement factor</i>	IHC	Immunohistochimie
DHE	Dihydroéthidium	IL	Interleukine
E/M	Epithélial/mésenchymateux	IRM	Imagerie par résonance magnétique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique humain 1	IT	Intra-tumoral
EI	Energie de liaison	IV	Intraveineux
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse	KDa	Kilo Dalton
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>	keV	Kilo électronvolt
ER	Récepteur à l'oestrogène	LINAC	Accélérateur linéaire
ESA	Antigène épithélial spécifique	LNE	Laboratoire national de métrologie et d'essais
F_C	Facteur de croissance	LNK	Lymphocyte cytotoxique naturel
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes	LT	Lymphocyte T
FT	Facteur de transcription		

M**A****T****H** *Mutant allele tumor heterogeneity*
MEC Matrice extracellulaire
MET Transition mésenchymato-épithéliale
MeV Méga électronvolt
MFI Intensité moyenne de fluorescence
miR MicroARN
MMP Métalloprotéases
MMTV *Mouse mammary tumor virus*
MOF *Metal-Organic Framework*

N**B****T****X****R****3** Nanoparticules d'oxyde d'hafnium (Nanobiotix)
NHEJ Jonction d'extrémités non homologues
NOD/SCID Souris immunodéficientes non obèse-diabétique
NP Nanoparticule

O**2**⁻ Anion superoxyde
OAR Organe à risque
ORL Oto-rhino-laryngologie

P**B****S** *Phosphate Saline Buffer*
PD-1 *Programmed Cell Death-1*
PD-L1 *Programmed Cell Death-1 Ligand*
PETScan Tomographie à émission de positons
pg Picrogramme
PR Récepteur à la progestérone
pRB Protéine du rétinoblastome
PtNP Nanoparticules de platine
PTT Thérapie photo-thermique
PyMT *Polyomavirus Middle T antigen*

R**C****M****I** Radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité
RH Recombinaison homologue
RI Rayonnement ionisant
ROS Espèces réactives de l'oxygène
RT Radiothérapie
RT-2D Radiothérapie en deux dimensions
RT-qPCR *Real Time Polymerase Chain Reaction*

S**A****R****R****P** *Small Animal Radiation Research Platform*
SF *Surviving Fraction*
SOD Superoxyde dismutase
SSC *Sidewards scatter*

T**E****P** Tomographie par émission de positions
TGF-β Facteur de croissance transformant β
TiO2 Dioxyde de titane
TLE Transfert linéique d'énergie
TNBC Cellules tumorales mammaires triple négative
TNF-α *Tumor necrosis factor α*

V**E****G****F** Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Z Numéro atomique

Liste des figures

FIGURE 1 : DISTRIBUTION EPIDEMIOLOGIQUE DES NOUVEAUX CAS DE CANCERS ET DE DECES FEMININS DANS LE MONDE EN 2018.	23
FIGURE 2 : HETEROGENEITE ET DISPARITE DU CANCER DU SEIN DANS LEURS CLASSIFICATIONS HISTOLOGIQUE, IMMUNO-HISTOCHEMIE ET MOLECULAIRE.	27
FIGURE 3 : PROPRIETES SPECIFIQUES DES CELLULES TUMORALES.	32
FIGURE 4 : DESCRIPTION DE LA CASCADE METASTATIQUE.	37
FIGURE 5 : DIFFERENTS CONTEXTES ET FONCTIONS DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.	38
FIGURE 6 : FACTEURS REGULANT LES PROGRAMMES DE TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE (EMT) ET MESENCHYMO-EPITHELIALE (MET).	39
FIGURE 7 : CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES ASSOCIES A LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.	41
FIGURE 8 : PROPRIETES ACQUISES AU COURS DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.	42
FIGURE 9 : ANALOGIE ENTRE LA PROGRESSION CLONALE ET L'ARBRE PHYLOGENETIQUE D'EVOLUTION RAMIFIEE.	44
FIGURE 10 : MODELE HIERARCHIQUE DE PROGRESSION TUMORALE.	45
FIGURE 11 : MARQUEURS MEMBRANAIRES LES PLUS COURAMMENT UTILISES POUR IDENTIFIER LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES CHEZ L'HOMME.	46
FIGURE 12 : DISTRIBUTION DU SCORE MATH SELON LE SOUS-TYPE TUMORAL MAMMAIRE.	48
FIGURE 13 : ILLUSTRATION DU DEPOT DE DOSE SELON LA NATURE DU RAYONNEMENT IONISANT ET LA PROFONDEUR DE TISSU.	52
FIGURE 14 : PRINCIPALES INTERACTIONS PHOTONIQUES CONTRIBUANT A UN DEPOT LOCAL D'ENERGIE.	53
FIGURE 15 : DIAGRAMME DE PREDOMINANCE DES EFFETS PHOTOELECTRIQUE, COMPTON ET DE MATERIALISATION SELON L'ENERGIE DES PHOTONS INCIDENTS ET LE NUMERO ATOMIQUE DE LA MATIERE TRAVERSEE.	54
FIGURE 16 : EFFETS DIRECTS ET INDIRECTS DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR L'ADN.	55
FIGURE 17 : PRODUCTION D'ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE EN REPOSE A L'IRRADIATION ET IMPLICATION DE LA SIGNALISATION p53 DANS LA BALANCE OXYDATIVE.	57
FIGURE 18 : PRINCIPAUX DOMMAGES A L'ADN ET LEURS VOIES DE REPARATION.	58
FIGURE 19 : SIGNALISATION DES CASSURES A L'ADN ET REPOSE CELLULAIRES ASSOCIEES.	59
FIGURE 20 : PRINCIPE DE L'ACTIVATION DE LA REPOSE IMMUNE ANTI-TUMORALE.	62
FIGURE 21 : INTENSITE DES EFFETS INDESIRABLES D'INCIDENCE ALEATOIRE OU OBLIGATOIRE SELON LA DOSE REÇUE.	64
FIGURE 22 : REPOSE TUMORALE HETEROGENE SELON LA NATURE ET LA SENSIBILITE DES CLONES.	67
FIGURE 23 : COMPARAISON DOSIMETRIQUE DES PLANS DE TRAITEMENT PAR RADIOTHERAPIE CONVENTIONNELLE EN DEUX DIMENSIONS (RT-2D) ET PAR RADIOTHERAPIE CONFORMATIONNELLE A MODULATION D'INTENSITE (RCMI).	69
FIGURE 24 : MECANISME IMMUNOSUPPRESSEUR DES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRES PD-1/PD-L1 ET CTLA4/B7 DANS UN CONTEXTE ANTI-TUMORAL.	74
FIGURE 25 : CLASSIFICATION DES NANOPARTICULES SELON LEUR NATURE CHIMIQUE.	81
FIGURE 26 : PROPORTION DES ATOMES EN SURFACE DES NANOPARTICULES EN FONCTION DE LEUR TAILLE.	82
FIGURE 27 : DIMENSIONS NANOMETRIQUES AU REGARD DU VIVANT.	83
FIGURE 28 : PRINCIPE DE L'ENHANCED PERMEABILITY AND RETENTION EFFECT (EPR).	85

Liste des figures.

FIGURE 29 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE MEMBRANE CELLULAIRE (A) SUR-EXPRIMANT DES RECEPTEURS POUVANT ETRE UTILISES COMME MARQUEURS DES CELLULES CANCEREUSES ET (B) D'UNE NANOPARTICULE D'OR FONCTIONNALISEE AVEC DES LIGANDS COURAMMENT UTILISES POUR CIBLER DES CELLULES CANCEREUSES.	86
FIGURE 30 : INTERACTIONS RAYONNEMENTS-MATIERE DES ATOMES DE HAUT NUMERO ATOMIQUE.	88
FIGURE 31 : COMPARAISON DE L'ABSORPTION MASSIQUE DE L'OR PAR RAPPORT AUX TISSUS MOUS.	89
FIGURE 32 : COMPARAISON DE L'EFFET RADIO-SENSIBILISANT DE NANOPARTICULES D'OR OBSERVE EXPERIMENTALEMENT AVEC LES VALEURS PREDITES EN MODELISATION.	90
FIGURE 33 : ÉTUDE PRINCEPS DE L'EFFICACITE DE RADIOTHERAPIE MEDIEE PAR DES NANOPARTICULES D'OR DE 1,9NM.	92
FIGURE 34 : RECONSTRUCTION 3D DE L'IRM CEREBRALE 3D 2 HEURES ET 7 JOURS APRES L'INJECTION INTRAVEINEUSE D'AGUIX.	93
FIGURE 35 : DONNEES PRECLINIQUES RELATIVES A NBTXR3.	94
FIGURE 36 : SCHEMA PRESENTANT LES PRINCIPAUX ENJEUX DE CES TRAVAUX DE THESE.	98
FIGURE 37 : PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE A FOND NOIR.	106
FIGURE 38 : COUPES SAGITTALE ET LONGITUDINALE DE LA REGION CERVICALE MURINE PRESENTANT LES COURBES D'ISODOSES ISSUES DE LA PLANIFICATION D'UN TRAITEMENT LOCALISE DE 10 Gy.	109
FIGURE 39 : ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'IMPEDANCE DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES T47D, MDA-MB-231, HMLE.E ET HMLE.M EN REPONSE A UNE EXPOSITION A DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DE AuNP@DTDTPA.	135
FIGURE 40 : SURVIE CLONOGENIQUE APRES EXPOSITION DES LIGNEES TUMORALES MAMMAIRES T47D ET MDA-MB-231 A DES DOSES CROISSANTES DE RAYONNEMENTS IONISANTS (SOURCE ¹³⁷ Cs).	136
FIGURE 41 : SURVIE CLONOGENIQUE DES LIGNEES TUMORALES MAMMAIRES HMLE.E ET HMLE.M EN REPONSE A UNE GAMME 0 A 160 µG/CM ² .	137
FIGURE 42 : STRESS OXYDATIF, MESURE PAR L'OXYDATION DE LA COUMARINE, APRES IRRADIATION GAMMA D'UNE SUSPENSION D'AuNP@DTDTPA A UNE DOSE DE 1132 Gy.	138
FIGURE 43 : STRESS OXYDATIF MESURE PAR L'OXYDATION DE LA SONDÉ DIHYDROETHIDIUM (DHE) EN SA FORME 7-OH DHE FLUORESCENTE DANS LES CELLULES T47D, MDA-MB-231, HMLE.E ET HMLE.M TRAITÉES 24 HEURES A UNE GAMME DE CONCENTRATION D'AuNP@DTDTPA PREALABLEMENT A UNE IRRADIATION DE 0, 2 OU 4 Gy.	139
FIGURE 44 : TEST D'INTERFERENCES DES AuNP@DTDTPA AVEC LA FORME OXYDEE DE LA SONDÉ DIHYDROETHIDIUM.	140
FIGURE 45 : COURBE DE SURVIE DES LIGNEES TUMORALES T47D ET MDA-MB-231 SUITE A UNE EXPOSITION A 50 µG/ML D'AuNP@PEG-NH ₂ ET A UNE IRRADIATION GAMMA DE 6 Gy.	142
FIGURE 46 : MESURE DE L'IMPEDANCE CELLULAIRE DES LIGNEES T47D ET MDA-MB-231 DANS LE TEMPS EN REPONSE AU TRAITEMENT PAR DES NANOPARTICULES D'OR DE 32 NM PEGYLEES AVEC UN GROUPE AMINE (NH ₂) OU CARBOXYLE (COOH) EN SURFACE ET/OU PAR DES RAYONNEMENTS GAMMA A LA DOSE DE 6 Gy.	143
FIGURE 47 : MORTALITE CELLULAIRE MESUREE PAR IODURE DE PROPIDIUM DES MDA-MB-231 IRRADIEES OU NON A 6 Gy SUITE AU TRAITEMENT PAR LES AuNP-PEG-NH ₂ A 50 µG/ML.	144
FIGURE 48 : REPARTITION DANS LE CYCLE CELLULAIRE DES MDA-MB-231 APRES LE TRAITEMENT PAR AuNP A 50 µG/ML ET/OU UNE IRRADIATION DE 6 Gy.	144
FIGURE 49 : DOSAGE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE L'OR INTERNALISE DANS LES CELLULES MDA-MB-231 ET T47D SUITE A LEUR EXPOSITION A DES NANOPARTICULES D'OR AuNP-NH ₂ A UNE CONCENTRATION DE 32µG /CM ² .	145

FIGURE 50 : DISTRIBUTION EN TAILLE DETERMINEE PAR SP-ICP-MS DES NANOPARTICULES D'OR EN SUSPENSION TELLES QUE SYNTHETISEES OU DANS LES LYSATS DES CELLULES T47D ET MDA-MB-231 APRES 24H D'EXPOSITION.	146
FIGURE 51 : (A) PHOTOGRAPHIE DE CULOTS CELLULAIRES DE MDA-MB-231 EXPOSEE OU NON AUX AUNP-NH ₂ A 32µG/CM ² PENDANT 120 HEURES. (B) DOSAGE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE L'OR INTERNALISE DANS LES LIGNEES T47D ET MDA-MB-231 SUITE A UNE EXPOSITION DE 6, 24 ET 120 HEURES.	147
FIGURE 52 : COURBES DE SURVIE ET DE MORTALITE CELLULAIRES DES LIGNEES T47D ET MDA-MB-231 EXPOSEES 120 HEURES AUX AUNP-NH ₂ A 32 µG/CM ² AVANT UNE IRRADIATION A 6 GY.	148
FIGURE 53 : PHOTOMICROGRAPHIES DES CELLULES T47D ET MDA-MB-231 9 JOURS APRES IRRADIATION A 6 GY SUITE A UN PRETRAITEMENT OU NON PAR AUNP-NH ₂ .	148
FIGURE 54 : VOLUME TUMORAL NORMALISE AU MOMENT DE L'IRRADIATION A 10 GY DES TUMEURS OBTENUES PAR XENOGREFE D'UN MILLION DE CELLULES MDA-MB-231 HUMAINES SUR DES SOURIS IMMUNO-DEFICIENTES.	150
FIGURE 55 : COUPES HISTOLOGIQUES D'UNE TUMEUR MMTV-PyMT 48 HEURES APRES L'INJECTION DE 75 µG D'AUNP COLOREES A L'HEMATOXYLINE-EOSINE ET OBSERVEES EN MICROSCOPIE OPTIQUE A FOND CLAIR ET EN MICROSCOPIE A FOND NOIR.	151
FIGURE 56 : COUPE HISTOLOGIQUE D'UNE TUMEUR MMTV-PyMT 15 JOURS APRES L'INJECTION DE 75 µG D'AUNP.	152
FIGURE 57 : TUMEURS MAMMAIRES CERVICALES QUINZE JOURS APRES LEUR TRAITEMENT PAR AUNP ET/OU LEUR IRRADIATION LOCALISEE A 10 GY AU SARRP.	153
FIGURE 58 : SUIVI DES VOLUMES TUMORAUX DES SOURIS CONTROLES, TRAITEES PAR IRRADIATION X A LA DOSE DE 10 GY ET/OU PAR INJECTION INTRA-TUMORALE D'AUNP.	153
FIGURE 59 : COUPE HISTOLOGIQUE DES TUMEURS MMTV-PyMT 15 JOURS APRES UN TRAITEMENT PAR 75 µG D'AUNP ET UNE IRRADIATION DE 10 GY.	154
FIGURE 60 : GAMME D'INTERNALISATION DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE NM100 PAR LES CELLULES T47D ET MDA-MB-231 APRES 24 HEURES D'EXPOSITION.	156
FIGURE 61 : MASSE D'OR INTERNALISEE PAR LES LIGNEES TUMORALES MAMMAIRES EPITHELIALES ET MESENCHYMATEUSES SUITE A LEUR EXPOSITION A DES AUNP-NH ₂ DE 32 NM A UNE CONCENTRATION DE 50 µG/ML.	156
FIGURE 62 : TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE INDUITE SUR LA LIGNEE EPITHELIALE MAMMAIRE HMLE.	157
FIGURE 63 : GAMME D'INTERNALISATION DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE NM100 PAR LES CELLULES HMLE.	158
FIGURE 64 : TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE INDUITE SUR LA LIGNEE EPITHELIALE MAMMAIRE MCF10-A.	159
FIGURE 65 : INTERNALISATION DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE SUITE A L'EXPOSITION DES CELLULES MCF10A-E ET MCF10A-M A 16 µG/CM ² DE NM100 ET NM103.	160
FIGURE 66 : SURFACE CELLULAIRE MOYENNE DES CELLULES EPITHELIALES (T47D ET HMLE.E) ET MESENCHYMATEUSES (MDA-MB-231 ET HMLE.M) SELON LEUR DEGRE DE CONFLUENCE EN CULTURE.	161
FIGURE 67 : INTERNALISATION DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE SUITE A L'EXPOSITION DES CELLULES HMLE.E ET HMLE.M, ENSEMENCEES A DIFFERENTS DEGRES DE CONFLUENCE, A UNE CONCENTRATION DE 16 µG/CM ² DE NM103.	161
FIGURE 68 : CINETIQUE D'INTERNALISATION DE 0 A 2 HEURES DES AUNP@DTDTPA-CYA5 PAR LES HMLE.E ET HMLE.M EN CONDITIONS METABOLIQUES OPTIMALES (37°C) OU REDUITES (7°C).	163
FIGURE 69 : EXPRESSION DES PROTEINES DE CLATHRINE ET DE LA CAVEOLINE DANS LES CELLULES TUMORALES T47D, MDA-MB-231, HMLE.E ET HMLE.M.	163
FIGURE 70 : PHOTOMICROGRAPHIE ELECTRONIQUE DE CELLULES MDA-MB-231 EXPOSEES AUX NANOPARTICULES DE PLATINE.	164

Liste des figures.

FIGURE 71 : MICROPHOTOGRAPHIES EN FLUORESCENCE DES LIGNEES T47D, MDA-MB-231, HMLE.E, HMLE.M EXPOSEES 24 HEURES AUX AUNP@DTDTPA-CyA5 A UNE CONCENTRATION EQUIVALENTE DE 25 µg/ML .	165
FIGURE 72 : MESURE QUANTITATIVE DES LYSOSOMES DANS LES LIGNEES T47D, MDA-MB-231, HMLE.E ET HMLE.M EXPOSEES OU NON 24 HEURES AUX NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE NM100 ET NM103 .	166
FIGURE 73 : CINETIQUE D'INTERNALISATION ET D'EFFLUX DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE NM103 DANS LES LIGNEES HMLE.E ET HMLE.M .	167
FIGURE 74 : CONCEPTION DE L'ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE.	168
FIGURE 75 : ANALYSE DE L'ENRICHISSEMENT DES ENSEMBLES DE GENES (GSEA) POUR LES CARACTERISTIQUES DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.	169
FIGURE 76 : HYPOTHESE D'UNE ENTREE OPPORTUNISTE DES NANOPARTICULES DANS LES CELLULES TUMORALES MESENCHYMATEUSES MAMMAIRES EN LIEN AVEC LEUR INTERACTION AVEC L'ACIDE HYALURONIQUE LIE A CD44 .	171
FIGURE 77 : EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES TRANSCRITS DE LA HYALURONANE SYNTHASE DE TYPE 2 PAR LES CELLULES HMLE .	172
FIGURE 78 : EXPRESSION DE L'ACIDE HYALURONIQUE : MICROPHOTOGRAPHIE EN FLUORESCENCE DES LIGNEES T47D, MDA-MB-23A, HMLE.E ET HMLE.M COLOREES AU HOECHST 33342 ET A L' HABP .	173
FIGURE 79 : PHENOTYPAGE MEMBRANAIRE DES LIGNEES TUMORALES EPITHELIALES ET MESENCHYMATEUSES MAMMAIRES.	174
FIGURE 80 : EXPRESSION RELATIVE DES TRANSCRITS DE CD44 TOTAL ET DE SON ISOFORME STANDARD CD44s PAR LES LIGNEES EPITHELIALES T47D, ZR75-1 ET LES LIGNEES MESENCHYMATEUSES HMLE.M, MDA-MB-231, MDA-MB-157 VIS-A-VIS DE L'EXPRESSION DE CES TRANSCRITS PAR HMLE.E EN RT-QPCR.	175
FIGURE 81 : RELATION ENTRE L'INTERNALISATION DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE NM100 ET NM103) ET L'EXPRESSION DE LA PROTEINE CD44 MESUREE PAR L'INTENSITE DE FLUORESCENCE EN CYTOMETRIE EN FLUX EN FONCTION DE LA NATURE DE NATURE EPITHELIALE ET MESENCHYMATEUSE.	175
FIGURE 82 : INTERNALISATION DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE NM100 ET NM103 PAR LES LIGNEES T4D, MDA-MB-231, HMLE.E ET HMLE.M PRETRAITEES OU NON A LA HYALURONIDASE.	176
FIGURE 83 : PRINCIPE DE LA RADIO-SENSIBILISATION AVEC DES NANOPARTICULES.	180
FIGURE 84 : PRINCIPALES VOIES D'ENDOCYTOSE DES NANOPARTICULES.	182
FIGURE 85 : METHODES D'ADMINISTRATION DES NANOPARTICULES IN VITRO.	184
FIGURE 86 : NIVEAU D'EXPRESSION ET D'ACTIVATION DE CD44 SELON LA NATURE DES TISSUS MAMMAIRES TUMORAUX OU NORMAUX ADJACENTS.	191
FIGURE 87 : SCHEMA RESUMANT L'ENTREE PREFERENTIELLE DES NANOPARTICULES DANS LES CELLULES TUMORALES MESENCHYMATEUSES.	192
FIGURE 88 : SCHEMA ILLUSTRANT LA NECESSITE DE LA PRISE EN COMPTE DE L'EQUILIBRE ELECTRONIQUE PREALABLE A LA MODELISATION DES INTERACTIONS DES RAYONNEMENTS GAMMA AVEC LES NANOPARTICULES POUR LA MESURE D'UNE DOSE ENHANCEMENT FACTOR (DEF) REALISTE.	195
FIGURE 89 : PREUVE DE CONCEPT SUR L'UTILISATION DE NANOPARTICULES D'OR POUR UNE DE DOSIMETRIE DE L'IRRADIATION IN-SITU.	203
FIGURE 90 : PRINCIPE DE L'IMAGERIE PHOTO ACOUSTIQUE.	206
FIGURE 91 : PRINCIPE D'UTILISATION DES PROPRIETES OPTIQUES DE NANOPARTICULES D'OR POUR DES APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES.	207

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : SCORES pTNM 8 ^{EME} EDITION ET STADES CLINIQUES ASSOCIES.	25
TABLEAU 2 : PRINCIPAUX MECANISMES D'ACTION CYTOTOXIQUES DES MOLECULES CHIMIO THERAPEUTIQUES.	34
TABLEAU 3 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES MODELES DE PROGRESSION TUMORALE STOCHASTIQUE ET HIERARCHIQUE.	43
TABLEAU 4 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE DES LIGNEES TUMORALES MAMMAIRES IN VITRO.	100
TABLEAU 5 : REFERENCE DES AMORCES UTILISEES EN RT-QPCR.	101
TABLEAU 6 : TABLEAUX DE CONVERSION POUR LE MAINTIEN D'UNE CONCENTRATION SURFACIQUE CONSTANTE QUEL QUE SOIT LE SUPPORT DE CULTURE CELLULAIRE.	104
TABLEAU 7 : METHODES UTILISEES POUR LA DETECTION DES NANOPARTICULES SELON LEUR PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.	105
TABLEAU 8: CARACTERISATION DE LA TAILLE DES NANOPARTICULES D'OR AuNP@PEG-NH ₂ PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE, DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE (DLS) ET ZETAMETRIE.	141
TABLEAU 9 : ANALYSE DE L'ENRICHISSEMENT DES ENSEMBLES DE GENES (GSEA).	170

Liste des tableaux.

Préambule

Le cancer est une pathologie caractérisée par la transformation de cellules qui acquièrent des propriétés nouvelles favorisant une prolifération anormale et anarchique.

Les tumeurs ne sont plus considérées comme des masses homogènes et la description de l'hétérogénéité tumorale a facilité la compréhension des mécanismes de progression tumorale, ainsi que le développement de stratégies thérapeutiques plus adaptées. Parmi les cancers solides, et particulièrement dans le cas du cancer du sein, l'hétérogénéité tumorale a non seulement une influence sur le développement phénotypique des tumeurs mammaires, mais également sur leurs réponses aux traitements par chimiothérapie et radiothérapie.

Afin de mieux comprendre les enjeux du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à lutter contre la résistance des tumeurs mammaires les plus hétérogènes, l'introduction de ce manuscrit est ponctuée de trois chapitres où seront successivement décrites :

- Les manifestations phénotypiques hétérogènes des tumeurs mammaires
- La réponse tumorale à la radiothérapie et l'émergence de radio-résistance
- L'utilisation de nanoparticules métalliques pour potentialiser les effets de la radiothérapie

Des résultats expérimentaux de recherches menées au sein du Laboratoire de Cancérologie Expérimentale du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies renouvelables seront ensuite présentés et discutés au regard des données de la littérature.

Chapitre 1

Cancers et hétérogénéité phénotypique du cancer du sein

CANCERS ET HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE DU CANCER DU SEIN 21

1.	ÉPIDEMIOLOGIE DU CANCER DU SEIN	23
2.	CLASSIFICATION DU CANCER DU SEIN	24
2.1	CLASSIFICATION CLINIQUE	25
2.2	CLASSIFICATION HISTO-MORPHOLOGIQUE	26
2.3	CLASSIFICATION MOLECULAIRE	26
2.4	CLASSIFICATION GENOMIQUE	28
3.	PROPRIETES SINGULIERES DES CELLULES TUMORALES	29
4.	TRAITEMENTS DU CANCER DU SEIN	33
5.	MODELE DE PROGRESSION TUMORALE	36
5.1	METASTASES	36
5.2	CASCADE METASTATIQUE	37
5.3	TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE	38
5.4	AUTRES PROPRIETES DES CELLULES MESENCHYMATEUSES	42
6.	HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE DU CANCER DU SEIN	42
6.1	MODELE STOCHASTIQUE	43
6.2	MODELE HIERARCHIQUE	44
6.3	CELLULES SOUCHES CANCEREUSES	45
6.4	POPULATION CD44 ⁺ /CD24 ^{LOW/-}	47

1. Épidémiologie du cancer du sein

Le **cancer** constitue l'une des principales barrières à l'augmentation de l'espérance de vie. C'est la première cause de décès avant 70 ans en Europe et en Amérique du Nord. En 2018, 18,1 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués dans le monde et 9,5 millions de décès y ont été associés (Bray et al., 2018).

Chez la femme, le cancer est la deuxième cause de mortalité mondiale. Il représente 8,6 millions de nouveaux cas et 4,2 millions de décès annuels. Les cancers colorectaux, pulmonaires et du col de l'utérus figurent parmi les plus récurrents et les plus mortels (Figure 1).

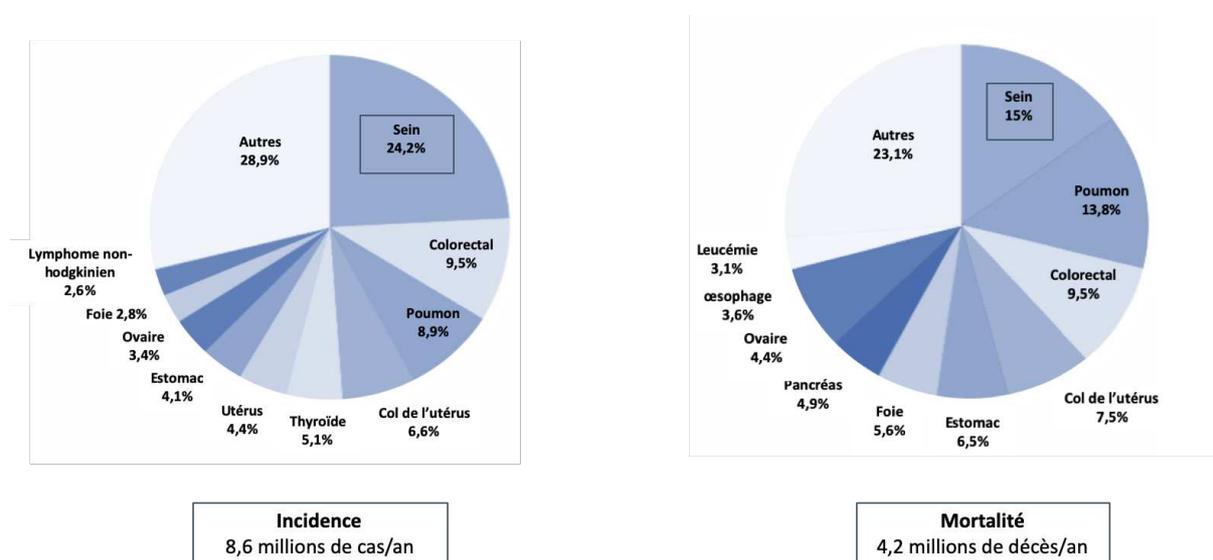


Figure 1 : Distribution épidémiologique des nouveaux cas de cancers et de décès féminins dans le monde en 2018. D'après Bray (Bray et al., 2018).

Le **cancer du sein** est à la fois le plus fréquent et le plus létal chez la femme. En effet, il représente un quart des cas de cancer (2,1 millions de nouveaux cas en 2018) et est associé à 15% de la mortalité par cancer (522 000 décès) dans le monde. En France, le cancer du sein a été à l'origine de 58 459 nouveaux cas et de 12 146 décès en 2018 (INCa, 2019).

Dans les pays développés, l'incidence du cancer du sein est stable depuis les années 2000 (+ 1,1% annuel en France) et la mortalité diminue. Cette évolution est le reflet des campagnes de dépistage qui permettent une prise en charge précoce des cancers, et dont les stades, moins avancés, augmentent les chances de succès thérapeutiques (Lindsey A. Torre et al., 2017).

Partout ailleurs, ces indicateurs se détériorent et les prédictions 2030 prévoient entre 2,4 et 3 millions de nouveaux cas annuels (Ginsburg et al., 2017). La constante évolution du nombre de nouveaux cas reflète la généralisation du dépistage mais également l'augmentation de la prévalence des facteurs de risque (L. A. Torre et al., 2016) et l'augmentation de l'espérance de vie.

En effet, au-delà des facteurs de risque intrinsèques (sexe, âge, gènes de prédisposition) qui ne sont pas évitables, des facteurs extrinsèques contribuent à la transformation cancéreuse. Ainsi des facteurs environnementaux physiques (radiations ionisantes), chimiques (médicaments, toxines, polluants) et biologiques (agents pathogènes) s'ajoutent à des facteurs comportementaux (tabac, alcool, obésité, manque d'activité physique) dont la nette augmentation, du fait de l'occidentalisation et de la mondialisation des comportements, permettrait d'expliquer la survenue de 20% des cancers du sein (Lindsey A. Torre et al., 2017). Parmi eux, les facteurs sociétaux liés à la vie reproductive sont d'une importance particulière dans la survenue de cancers du sein. En effet, l'exposition prolongée aux œstrogènes endogènes (puberté précoce, ménopause tardive, nulliparité) et exogènes (pilule contraceptive, hormonothérapie de substitution) favorisent le développement de tumeurs mammaires, alors que la grossesse et l'allaitement constitueraient des facteurs protecteurs (Bray et al., 2018).

Si la survie à 5 ans est satisfaisante dans les pays développés (85%), elle reste trop limitée dans les pays en voie de développement (60%), soulignant ainsi la nécessité des campagnes de sensibilisation et de dépistage (Lindsey A. Torre et al., 2017). Cependant, au-delà des coûts humains et des coûts liés à la prise en charge thérapeutique, le cancer du sein a également un impact socio-économique réel non négligeable sur la productivité puisqu'il cause des décès prématurés et constitue la première cause d'années vécues avec incapacités (Ginsburg et al., 2017).

2. Classification du cancer du sein

Le cancer du sein est une pathologie à la fois hétérogène et polygénique. Cette hétérogénéité s'exprime dans les variables cliniques inter-patients (âge, statut ménopausique et ganglionnaire), mais également dans l'expression spatio-temporelle différente de cellules tumorales chez un même patient. Dans ce contexte, l'existence d'une classification constitue à la fois une aide au diagnostic, au pronostic et au choix thérapeutique.

Dans le cancer du sein, plusieurs classifications sont proposées en se basant notamment sur des données cliniques, histo-morphologiques, protéomiques et génomiques (Mueller et al., 2018).

2.1 Classification clinique

La classification « **pTNM** » est basée sur une évaluation clinique macroscopique du cancer du sein au moment de sa découverte. Elle permet également d'évaluer régulièrement l'efficacité de la réponse aux traitements. Cette classification repose sur l'appréciation de trois critères majeurs :

- **T** : reflétant la taille de la tumeur primitive et sa nature infiltrante ou *in situ*
- **N** : décrivant la localisation et le degré d'envahissement ganglionnaire
- **M** : indiquant la présence ou l'absence de métastase à distance

Chaque critère est associé à un score propre, dont le détail est décrit dans le tableau 1. La combinaison de ces scores permet alors d'établir une gradation clinique de 0 à IV conditionnant la stratégie thérapeutique.

Tableau 1 : Scores pTNM 8^{ème} édition et stades cliniques associés. D'après Cottu et Delalogue (Cottu & Delalogue, 2019).

T	T0	Tumeur primitive non palpable
	T1	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
	T2	Tumeur 2 cm < T ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
	T2	Tumeur >5 cm dans sa plus grande dimension
	T4	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique et/ou à la peau
N	N0	Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
	N1	Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
	N2	Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
	N3	Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux
M	M0	Absence de métastase à distance
	M1	Présence de métastase(s) à distance

Stade	Tumeur	Ganglion	Métastase
0	T0	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	
IIB	T2	N0	M0
	T3	N1	
IIIA	T2	N2	M0
	T3	N2	
	T4	N1	
	T4	N2	
	T4	N2	
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	
	T4	N2	
IIIC	Tout T	N3	M0
IV	Tout T	Tout N	M1

2.2 Classification histo-morphologique

Cette classification est basée sur les données histo-pathologiques obtenues grâce aux observations microscopiques de coupes réalisées à partir de biopsies ou de pièces chirurgicales.

Dans un premier temps, l'analyse anatomo-pathologique permet de distinguer les cancers *in situ*, confinés dans le tissu d'origine, des cancers **infiltrants** s'étant propagés dans les tissus voisins.

Les **carcinomes canaux** sont les plus fréquents : les carcinomes canaux *in situ* (CCIS) et les carcinomes canaux invasifs (CCI) représentent respectivement 15-20% et 70% des cancers diagnostiqués. Les carcinomes peuvent survenir dans d'autres localisations (lobulaire) et sous d'autres aspects morphologiques, plus rares dans leur présentation (mucineux, tubuleux, papillaire, alvéolaire, apocrine, pléomorphes, etc.) (Mueller et al., 2018).

L'analyse histo-morphologique permet également de réaliser une gradation histologique sur la base de trois critères :

- Le degré de **différenciation cellulaire**
- Le **pléomorphisme nucléaire**
- Le **taux mitotique** mesuré par le marqueur de prolifération Ki-67

Au cours de la progression tumorale, les cellules normales se dé-différencient jusqu'à changer d'apparence, leur rapport nucléo-cytoplasmique augmente et leur noyau peut prendre des formes irrégulières. Ces modifications sont associées à la perte de leurs caractéristiques et de leurs fonctions d'origine. De manière générale, les tumeurs de bas grade sont peu agressives et les tumeurs de haut grade, associées à une prolifération et une dé-différenciation importantes, sont plus agressives. Ainsi, plus le grade histologique est élevé, plus le risque de métastase est grand (Tao et al., 2015).

2.3 Classification moléculaire

La classification moléculaire est la plus fréquente et peut être réalisée suite à l'analyse histo-morphologique par la détection de marqueurs moléculaires en immuno-histochimie (IHC). Cette analyse permet de différencier des tumeurs pathologiquement et moléculairement différentes (Banin Hirata et al., 2014). Historiquement, cette classification décrit quatre sous-types selon l'expression des récepteurs hormonaux à l'œstrogène (ER), à la progestérone (PR) et au facteur de croissance épidermique humain (ERB2 ou HER2) (Masood, 2016) :

- **Luminal A** : Positifs pour ER et PR, ils représentent entre 50 à 60% des cas
- **Luminal B** : Positifs pour ER et PR, les formes également positives HER2 représentent 6% des cas, les formes négatives pour HER2 entre 10 et 15 %
- **HER2** : Négatifs pour ER et PR, ils sur-expriment HER2 et représentent 10 à 15% des cas
- « **Basal-like** » : Négatifs pour ER, PR et HER2, ils représentent 10 à 20% des cas

Les récepteurs hormonaux sont des protéines exprimées à la surface des cellules épithéliales et stromales afin de permettre la fixation d'hormones circulantes et la signalisation cellulaire. Ils prédisent la sensibilité des tumeurs aux thérapies endocrines et sont donc associés à un meilleur pronostic (Cottu & Delalogue, 2019).

Le groupe des tumeurs triple-négatives (TNBC) est défini par défaut et présente donc une grande hétérogénéité. Le démembrement moléculaire de ce groupe permettrait de trouver des solutions thérapeutiques plus adaptées. Cette classification est donc en constante évolution avec notamment l'apparition récurrente du sous-groupe **claudine-low**. Ainsi, sur la base de critères morphologiques, histologiques et de prolifération, certains décrivent par exemple l'existence de 21 sous-groupes histologiques (Dieci et al., 2014). Toutefois, il n'existe pas de superposition parfaite des classifications anatomo-pathologiques et moléculaires (Figure 2).

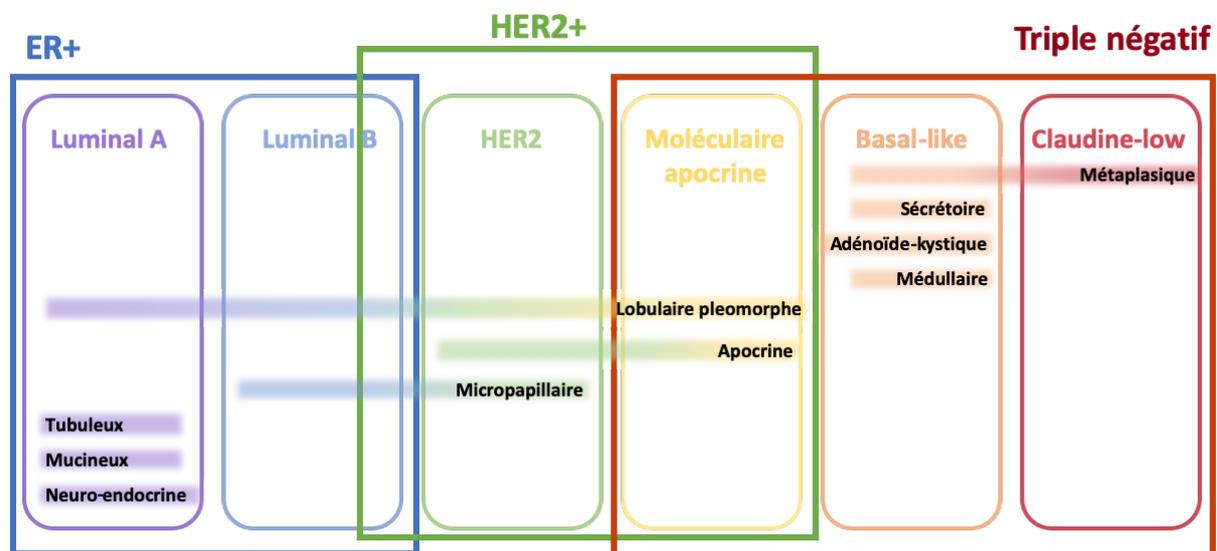


Figure 2 : Hétérogénéité et disparité du cancer du sein dans leurs classifications histologique, immuno-histochimique et moléculaire. D'après Dieci (Dieci et al., 2014).

Par ailleurs, si le statut ER, PR et HER2 est admis mondialement pour caractériser les tumeurs (analyse systématique pour tout cancer infiltrant et toute rechute), le choix d'autres marqueurs dépend de la

clinique et du clinicien. A titre d'exemple, bien que l'index mitotique soit un facteur pronostic très important dans le cancer du sein, l'utilisation du score Ki-67 fait débat. En effet, cette protéine nucléaire, exprimée dans les phases G1 tardives, S, G2 et M du cycle cellulaire mais pas dans les cellules quiescentes (G0), permet de donner un index de prolifération informatif. Néanmoins, si le seuil de positivité est fixé à 14% de cellules positives par champs en France, la mise en œuvre de ce test pose des problèmes analytiques et de standardisation qui rendent sa réalisation optionnelle (Cottu & Delaloge, 2019).

2.4 Classification génomique

En dehors de l'expression de marqueurs moléculaires, le cancer du sein présente des altérations génétiques emblématiques. Les tumeurs associées à ces altérations surviennent plus précocement (avant 45 ans) et présentent un phénotype plus agressif (Tao et al., 2015).

Les gènes de susceptibilité au cancer du sein **BRCA1** et **BRCA2** sont par exemple mutés dans 80% des formes familiales. Ces gènes suppresseurs de tumeurs, qui interviennent notamment dans la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, la régulation transcriptionnelle de la prolifération, et la différenciation, sont inactivés par méthylation et autres mécanismes épigénétiques (Delaloge & Marsiglia, 2005). La protéine suppresseur de tumeur **p53**, également impliquée dans de nombreuses voies de signalisation (cycle cellulaire, réparation de l'ADN, apoptose, sénescence) qui participent à l'homéostasie cellulaire et au maintien de l'intégrité du génome, peut être altérée par des modifications post-traductionnelles ou des mutations de son gène. Ainsi, on retrouve une altération du gène TP53 chez 30% des patientes atteintes de cancer du sein avec une prévalence hétérogène selon le sous-type moléculaire : 80% pour les « basal-like » et 15% pour les luminal A. La nature des mutations et leurs conséquences biologiques diffèrent également selon le sous-type moléculaire mais, le plus souvent, les mutations conduisent à une mauvaise conformation protéique qui prolonge la demi-vie de p53, provoquant son accumulation nucléaire et une prolifération active (Tao et al., 2015).

Hormis l'existence de facteurs génétiques prédisposant au développement des tumeurs mammaires, le cancer du sein est majoritairement une pathologie sporadique. La description des modes d'action permet d'identifier des biomarqueurs prédictifs de la progression tumorale et/ou de la résistance aux traitements. Les techniques génomiques à haut-débit permettent aujourd'hui à la fois d'identifier ces biomarqueurs mais aussi d'envisager le développement de thérapies ciblées. De ce fait, la prescription de thérapies ciblées est généralement conditionnée par la présence de biomarqueurs spécifiques. Les

puces à ADN apportent une caractérisation moléculaire dont la valeur pronostique (sur l'apparition de métastases ou la récurrence à 10 ans) doit être validée cliniquement (Duffy et al., 2017). Ces tests multi-géniques sont réalisés sur des populations spécifiques, le plus souvent ER positives, HER2 négatives et avec une atteinte ganglionnaire nulle ou faible. Ainsi plusieurs tests de diagnostic permettent d'identifier les populations à faible risque de récurrence et de leur éviter l'administration d'une chimiothérapie adjuvante (HAS, 2019) :

- Les tests de première génération : **OncotypeDX** (signature de 21 gènes) et **MammaPrint** (signature de 70 gènes) dont l'utilité a été approuvée cliniquement (essais MINDACT, TAILORx et RxPONDER)
- Les tests de seconde génération : **EndoPredict** (signature de 11 gènes) et **Prosigna - PAM50** (signature de 50 gènes) dont l'utilité est toujours en cours d'évaluation clinique

Il est alors intéressant de constater que la plupart des gènes identifiés dans ces signatures, notamment par MammaPrint, se rapportent aux propriétés spécifiques des cellules tumorales et aux modifications biologiques qui y sont associées (Tian et al., 2010).

3. Propriétés singulières des cellules tumorales

Le développement du cancer est lié à l'altération du génome de cellules saines. La plupart des mutations associées à la carcinogenèse impliquent l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur ayant pour effet de favoriser sa survie, sa prolifération et sa dissémination. D'un point de vue physio-pathologique, Hanahan et Weinberg ont décrit 6 altérations essentielles conduisant à l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques communes à la majorité des cancers, même si leurs mécanismes et leurs cinétiques d'apparition peuvent différer (Hanahan & Weinberg, 2000).

- **Auto-suffisance en facteurs de croissance**

Plusieurs mécanismes peuvent conduire à une indépendance vis-à-vis de signaux de croissance et ainsi mener les cellules d'un état quiescent à prolifératif. D'une part, les cellules tumorales induisent une stimulation des cellules stromales pour la production de facteurs de croissance (FC) en leur faveur, mais également augmentent leur propre production de FCs. D'autre part, l'expression de récepteurs (EGF-R), de protéines transduisant les signaux (protéine Ras mutée dans 25% des tumeurs), mais

également l'activation constitutive de voies de signalisation intra-cellulaire (voie Ras/MAPK) régulent la prolifération et la différenciation cellulaire.

En l'absence de dépendance à ces signaux, la communication au sein des tissus est perdue, l'homéostasie n'est plus possible au bénéfice d'une prolifération anarchique.

- **Échappement aux inhibiteurs croissance**

Des facteurs solubles et/ou retenus dans la matrice extra-cellulaire (MEC) maintiennent normalement les cellules dans un état de quiescence. En effet, en réponse à ces signaux anti-prolifératifs, les cellules sont bloquées en phase G₀, métaboliquement actives mais non proliférantes. La cible principale de ces signaux est la protéine du rétinoblastome (pRB), qui, sous sa forme hypo-phosphorylée, séquestre le facteur de transcription (FT) E2F nécessaire à l'expression du gène de la cycline E, ayant pour conséquence le passage de la phase G₁ en phase S. La libération constitutive de ce facteur conduit par exemple les cellules à cycler en continu. Une des conséquences de cette prolifération active est le déséquilibre de la balance prolifération/différenciation qui soutient une dé-différenciation progressive.

- **Résistance à la mort cellulaire**

L'homéostasie des tissus résulte d'une balance entre prolifération et mort cellulaire. L'apoptose, mort cellulaire programmée, est régulée pour répondre à des signaux de morts intrinsèques (hypoxie, libération mitochondriale du cytochrome c) et extrinsèques (TNF- α , FAS-L, perte d'interaction avec la MEC). La protéine p53 induit normalement l'activation de l'apoptose lorsque les dommages à l'ADN ne sont pas réparables, en libérant notamment la protéine BAX. Le gène codant pour la p53 étant muté dans plus de la moitié des tumeurs humaines, son inactivation empêche le contrôle de l'intégrité de l'ADN dont dépend la survie cellulaire.

- **Immortalité répllicative**

Le raccourcissement des télomères est un moyen de protection cellulaire limitant la prolifération. Du fait de l'incapacité des polymérases à compléter la réplication en extrémité 3' de l'ADN, les télomères à l'extrémité des chromosomes rétrécissent d'une centaine de paires de base à chaque division. Ainsi, limitées par la taille de leurs télomères, les cellules arrêtent spontanément de se diviser et entrent en sénescence après un nombre fini de mitoses. L'augmentation de l'expression de la télomérase, prévenant le raccourcissement des télomères en y ajoutant des nucléotides, concerne 85 à 90% des cancers humains.

Les propriétés ainsi illustrées sont plutôt représentatives des étapes d'initiation de la carcinogenèse alors que les deux suivantes sont associées à la progression tumorale. En effet, afin de pallier le manque de place et de nutriments au sein d'une tumeur primaire en expansion, les cellules tumorales augmentent leurs capacités d'invasion, de diffusion et activent une angiogenèse tumorale (Badve & Nakshatri, 2012).

- **Invasion tissulaire et diffusion métastatique**

L'invasion tissulaire est favorisée par l'expression de protéases extra-cellulaires et la perte d'expression de protéines d'adhérence à la surface des cellules tumorales. En effet, la dégradation de la matrice extra-cellulaire, consécutive à l'expression de métalloprotéases (MMPs) est un élément clé de remodelage vers une structure plus favorable à la migration des cellules tumorales. Par ailleurs, la diminution de l'expression de cadhérines et d'intégrines, qui sont nécessaires aux interactions cellule-cellule, renforce également un phénotype migratoire.

- **Néo-angiogenèse**

Afin de maintenir une oxygénation et une nutrition suffisantes, les cellules normales se trouvent à 0,1 mm d'un capillaire sanguin. Au cours de la tumorigenèse, les cellules tumorales sur-expriment des facteurs pro-angiogéniques (dont les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF et des fibroblastes FGF), favorisant alors le développement de néo-vaisseaux et le passage de la tumeur d'une phase dormante à une phase vasculaire.

En 2011, Hanahan et Weinberg ont réactualisé leur théorie sur les cellules cancéreuses en décrivant deux nouvelles propriétés singulières et deux mécanismes généraux impliqués dans leur développement (Figure 3).

- **Dérégulation du métabolisme énergétique**

En condition normoxique, les cellules utilisent principalement la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP dans leurs mitochondries. Limitées en oxygène, les cellules cancéreuses ajustent leur métabolisme énergétique, phénomène nommé effet Warburg, en favorisant la glycolyse aérobie au cours de laquelle la captation de glucose et sa fermentation en lactate sont augmentées (Liberti & Locasale, 2016). Le facteur induit par l'hypoxie (HIF), également sur-exprimé en réponse à l'activation des oncogènes Myc et Ras, renforce la dépendance locale en glucose, augmente l'expression de transporteurs membranaires (dont GLUT1) et la production d'enzymes de la glycolyse.

▪ Échappement aux signaux immunitaires

En théorie, la surveillance immunitaire reconnaît et élimine les cellules anormales, donc des cellules tumorales émergentes. Ainsi, les tumeurs présentant un infiltrat en lymphocytes T (LT) et en lymphocytes cytotoxiques naturels (LNK) ont un meilleur pronostic. *A contrario* l'immuno-déficience est associée à une augmentation de l'incidence tumorale. La sécrétion locale de signaux immuno-suppresseurs comme le TGF- β (facteur de croissance transformant β) par les cellules tumorales contribuerait à cet échappement.

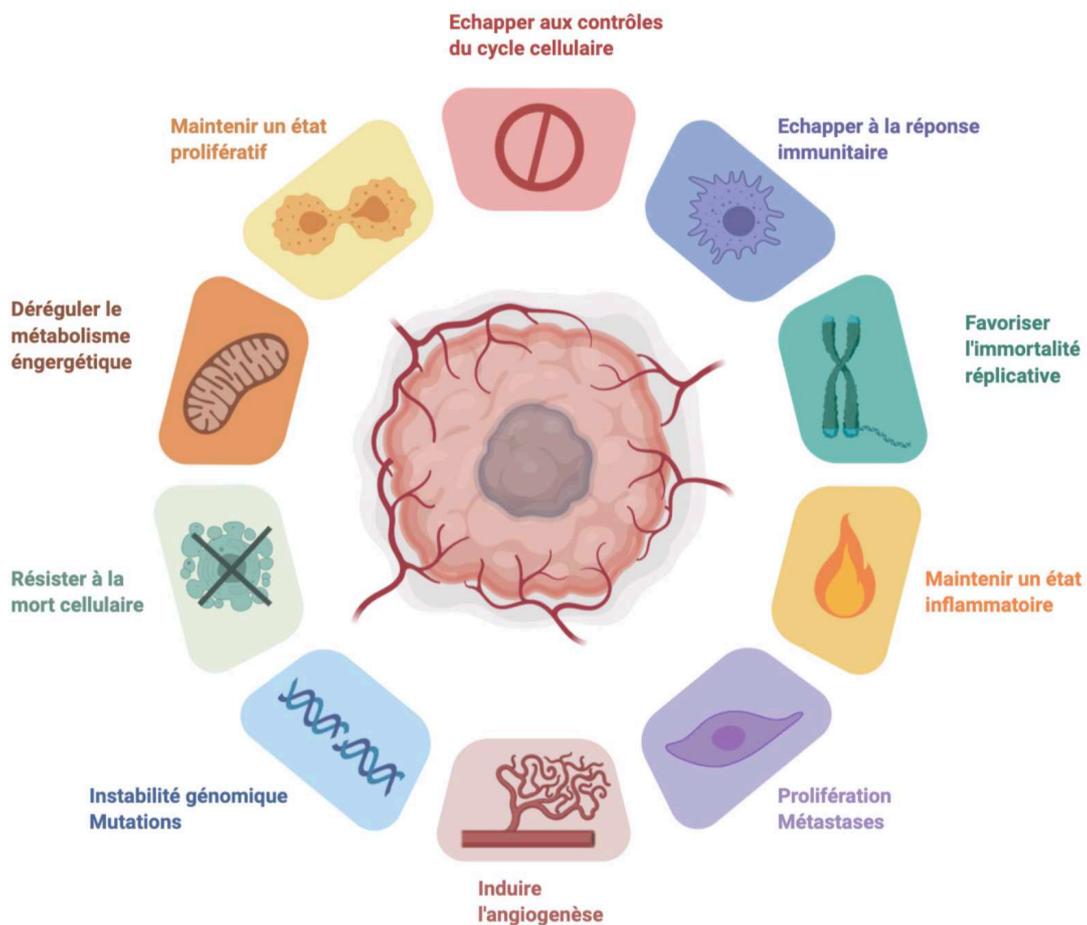


Figure 3 : **Propriétés spécifiques des cellules tumorales.** Adapté de Hanahan et Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011) et réalisé sur BioRender.

▪ Instabilité génomique

Des mutations sont à l'origine de l'acquisition de la plupart des propriétés tumorales sus-décrites. De façon générale, les mutations du génome sont des événements fréquents mais leur accumulation affectant spécifiquement ces propriétés cellulaires est très peu probable. En favorisant l'apparition de mutations aléatoires, l'instabilité génomique acquise par les cellules tumorales augmente la

probabilité d'occurrence de mutations présentant un avantage sélectif pour le développement de cancers.

- **Maintien d'un état inflammatoire**

L'inflammation contribue également à l'acquisition d'un phénotype tumoral d'une part en libérant de nombreux facteurs impliqués dans ses propriétés spécifiques : des facteurs de croissance et de survie, des facteurs pro-angiogéniques, des enzymes de dégradation de la matrice extra-cellulaire et d'autre part en générant un stress oxydatif potentiellement mutagénique. L'infiltration de cellules immunitaires innées et adaptatives au sein des tumeurs a donc un effet paradoxal, favorisant à la fois une réponse immune mais également la tumorigenèse

4. Traitements du cancer du sein

La description de ces spécificités tumorales aide à l'identification des cibles de traitement pour lesquelles les différences entre cellules normales et cellules tumorales offrent une fenêtre thérapeutique la plus large possible. L'offre de soins propose d'utiliser seuls ou en combinaison des traitements **locaux** (chirurgie, radiothérapie) ou **systémiques** adjuvants (chimiothérapie, hormonothérapie, thérapies ciblées).

- **Chirurgie**

L'ablation des tumeurs mammaires par chirurgie est indiquée pour toutes les formes localisées de cancer du sein. Cette mastectomie peut être partielle si la tumeur et les berges sont macroscopiquement saines. Il s'agit alors d'une tumorectomie à visée conservatrice. Pour les tumeurs multicentriques, présentant des micro-calcifications diffuses ou des marges insuffisantes, la mastectomie doit être totale. Si la tumeur est infiltrante, l'opération chirurgicale est également assortie d'un curage axillaire.

- **Radiothérapie**

La radiothérapie est un traitement loco-régional à visée curative, symptomatique ou palliative dont le principe et les modalités seront détaillés au chapitre 2. Elle est indiquée en traitement adjuvant à la chirurgie, systématiquement après une chirurgie conservatrice afin de limiter le risque de récurrence locale pour traiter des métastases à distance. Elle est généralement prescrite selon un protocole

fractionné conventionnel de 50 Gy administrés en 25 fractions de 2 Gy ou hypo-fractionné de 40 Gy administrés en 15 fractions (Cottu & Delaloge, 2019).

▪ **Chimiothérapie**

La chimiothérapie est un traitement systémique ciblant les cellules proliférantes en bloquant la division cellulaire. Elle est généralement administrée en 4 à 6 cures espacées de 3 semaines pour permettre aux cellules normales de récupérer. La chimiothérapie est dite néo-adjuvante lorsqu'elle est administrée préalablement à un traitement local pour en faciliter le déroulement. Cette modalité permet non seulement d'évaluer l'efficacité des molécules sur la tumeur primaire et de traiter les micro-métastases à distance, mais également d'augmenter les chances de conservation mammaire en réduisant la taille de la tumeur ou en assainissant ses berges. La chimiothérapie est adjuvante lorsqu'elle est administrée à la suite d'une chirurgie ou de la radiothérapie. Elle est dite intensive si les doses sont augmentées et dense si les cycles sont rapprochés.

Différents mécanismes produisent l'effet cytotoxique recherché en agissant principalement sur l'ADN ou sur le fuseau mitotique (Tableau 2). Les protocoles thérapeutiques reposent sur l'association de ces molécules afin de limiter le risque de sélection de clones résistants et d'ainsi améliorer la survie globale et la survie sans rechute (Cottu & Delaloge, 2019). Le choix des molécules dépend également du sous-groupe pronostique, de l'expression de marqueurs et de l'activation de voies de signalisation spécifiques.

Tableau 2 : Principaux mécanismes d'action cytotoxiques des molécules chimio thérapeutiques.

Famille	Cible	Mode d'action	Molécules
Agents alkylants	ADN	Liaison covalente à l'ADN	Cyclophosphamide Sels de platine (Cisplatine , Carboplatine, Oxaliplatine)
Antimétabolites	ADN	Inhibition de la synthèse	Antipyrimidiques (5-Fluoro-uracile, Capécitabine, Cytarabine) Antipuriques (Fludarabine) Antifoliques (Méthotrexate)
Inhibiteurs des topoisomérases	Topoisomérases 2	Insertion entre 2 bases adjacentes Cassures mono/bi caténaire	Etoposide Anthracyclines (Doxorubicine, Daunorubicine)
Agents tubulo-affins	Microtubules	Inhibition de la dépolymérisation Inhibition de la polymérisation	Taxanes (Paclitaxel, Docétaxel, Carbitaxel) Vinca-alkaloïdes (Vincristine, Vinorelbine)

▪ **Hormonothérapie**

L'hormonothérapie est indiquée pour les tumeurs hormono-sensibles, exprimant les récepteurs ER et PR. Elle permet de limiter la synthèse endogène d'hormones féminines et leur liaison aux récepteurs hormonaux tumoraux selon différents mécanismes (Duffy et al., 2017).

Les anti-œstrogènes limitent la stimulation œstrogénique tumorale en prévenant la liaison de l'œstradiol à son récepteur ER (fulvestrant) ou en altérant le changement conformationnel de ER nécessaire à son association avec des co-activateurs (tamoxifène). Ces molécules permettent la rémission des patientes ER-positives (Banin Hirata et al., 2014). Les anti-aromatases (exémestane, letrozole) sont indiquées chez les patientes ménopausée afin d'empêcher la transformation d'androgènes en œstrogène. Enfin, les analogues de la LH-RH (goséréline, leuproréline) agissent au niveau hypophysaire de la femme non ménopausée. En stimulant artificiellement cette voie, la synthèse endogène d'hormones stéroïdiennes féminines est inhibée (Cottu & Delalogue, 2019).

▪ **Thérapies ciblées**

Le développement de thérapies ciblées répond à l'identification de biomarqueurs tumoraux et à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques associés. La mise sur le marché d'anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre le domaine extra-cellulaire de HER2 (trastuzumab, pertuzumab) a largement contribué à l'amélioration du pronostic des patientes HER2 positives. En cas d'échec de cette option thérapeutique ciblant une partie extra-cellulaire du récepteur, un inhibiteur de tyrosine kinase (lapatinib) cible le domaine intracellulaire de HER2 et empêche la prolifération dépendante de l'activation de voies de signalisation Ras/MAPK.

La cible thérapeutique HER2, alors sur-exprimée à la surface de certaines cellules tumorales est également exploitée pour vectoriser des molécules cytotoxiques. Le trastuzumab emtansine (T-DM1) est le premier médicament développé dans cette indication. L'anticorps anti-HER2 apporte la sélectivité cellulaire et provoque l'internalisation de DM1, médiée par HER2. Une fois internalisé, DM1 est libéré intra cellulièrement où il agit en inhibant la prolifération des microtubules.

Néanmoins, malgré la multiplicité des cibles thérapeutiques, l'existence de redondances dans les voies de signalisation peut conduire à une adaptation des cellules tumorales, favorisant leur survie et n'offrant ainsi qu'une réponse transitoire aux traitements.

Les thérapies anti-cancéreuses, alors limitées par les résistances innées et l'émergence de résistances acquises aux traitements, peuvent alors ne pas suffire à empêcher la progression tumorale.

5. Modèle de progression tumorale

Plus de 90% de la mortalité associée aux cancers étant liée à la présence de métastases, comprendre et prévenir leur développement constitue un défi clinique majeur (Y. Zhang & Weinberg, 2018).

Si seuls 5 à 10% des patients présentent d'emblée des métastases au moment du diagnostic, environ 30% des patientes atteintes d'un cancer du sein sans invasion ganglionnaire finissent par développer des métastases. Cette proportion est encore plus élevée chez les patientes présentant un envahissement ganglionnaire initial (Kimbung et al., 2015).

5.1 Métastases

Une métastase est définie comme la présence de cellules tumorales à distance de la tumeur primaire. Au site métastatique, les cellules peuvent exister sous trois formes : des cellules isolées en phase quiescente, des micro-métastases (tumeurs dont la taille est maîtrisée par l'équilibre prolifération/apoptose) ou des macro-métastases actives.

L'établissement de métastases est régi par la théorie de la graine et du sol, définie en 1889 par Stephen Paget (Paget, 1889), et selon laquelle une cellule ne peut former une métastase que si elle se trouve dans des conditions environnementales favorables. L'implantation de cellules métastatiques n'est donc pas un phénomène aléatoire mais elle répond à des signaux favorisant à la fois leur auto-renouvellement et leur prolifération (facteurs de croissance, cytokines) (C. L. Chaffer & Weinberg, 2011). Ainsi, les cellules tumorales mammaires trouvent dans les os, les poumons, le cerveau et le foie, des environnements favorables pour leur implantation secondaire (Kimbung et al., 2015).

Par ailleurs, peu de cellules ont les capacités à s'implanter dans un nouvel environnement, des études précliniques estiment qu'environ seulement 0,02% des cellules tumorales circulantes sont capables de donner une métastase. En fait, la plupart des cellules entrent en apoptose dans les 24 heures qui suivent leur intravasation du fait du stress, des forces hémodynamiques, de la veille immunologique ou en anoïkose par leur manque de capacité d'adhésion (Valastyan & Weinberg, 2011).

5.2 Cascade métastatique

La cascade métastatique est un processus biologique multi-étapes complexe supporté par la plasticité des cellules cancéreuses. Constituée de sept étapes détaillées figure 4, la cascade métastatique peut être résumée à deux phases majeures : la dissémination des cellules tumorales depuis la tumeur primaire et l'adaptation de ces cellules dans un autre micro-environnement (Hanahan & Weinberg, 2011).

Plus précisément, le développement de métastases requiert successivement :

- L'**angiogenèse** soutenue par les cellules tumorales pour supporter leur croissance
- La **transition épithélio-mésenchymateuse** (EMT) dont les mécanismes détaillés ci-après conduisent à l'échappement cellulaire individuel ou collectif de la tumeur primaire, par la perte de l'expression de protéines d'adhérence et la sur-expression de protéases dégradant la matrice extra-cellulaire
- L'**intravasation** suite à l'invasion de la lame basale épithéliale, de la matrice extra-cellulaire et de la membrane endothéliale

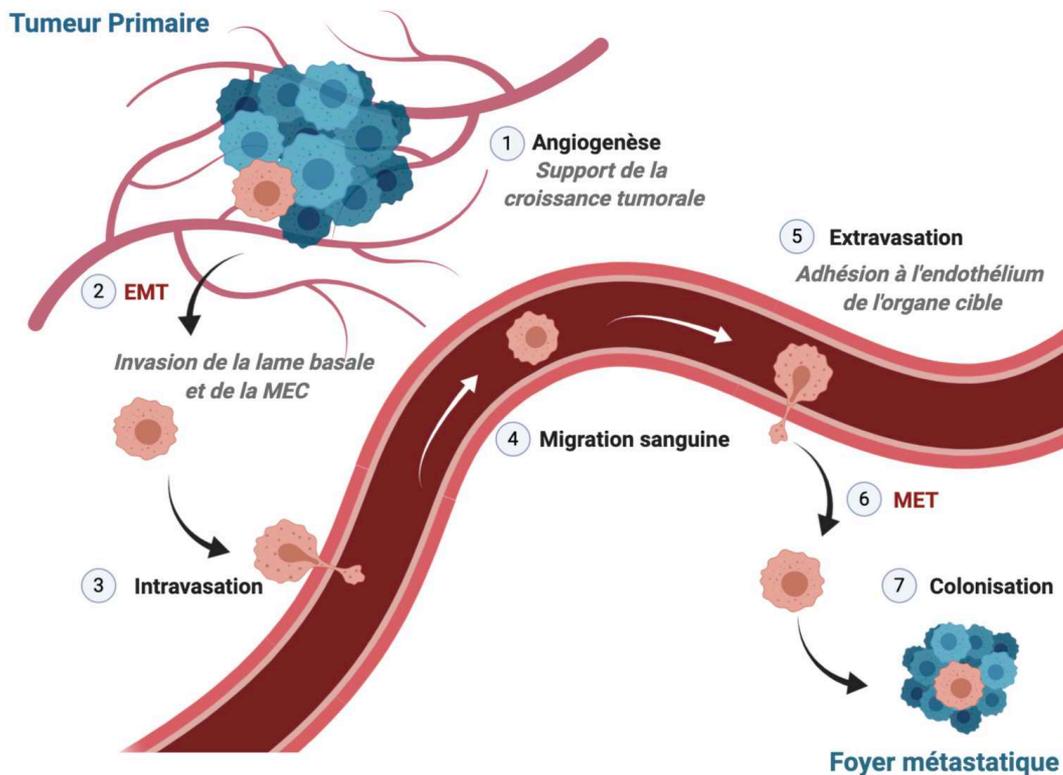


Figure 4 : Description de la cascade métastatique. Réalisé sur BioRender.

- La **migration sanguine ou lymphatique** et la survie dans ce compartiment circulant
- L'**extravasation** suite à l'adhésion à l'endothélium de l'organe cible en réponse à des signaux favorables
- La **transition mésenchymo-épithéliale** permettant l'adaptation des cellules tumorales à l'environnement local et la récupération des propriétés épithéliales
- La **colonisation** par la survie et la croissance d'un nouveau foyer (Shibue & Weinberg, 2017)

5.3 Transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est le phénomène qui permet à une cellule épithéliale polarisée, en contact avec une lame basale, l'acquisition des propriétés migratoires pour coloniser des tissus adjacents. Elle intervient dans des contextes biologiquement très différents pour générer un phénotype mésenchymateux à partir d'un épithélium (Figure 5).

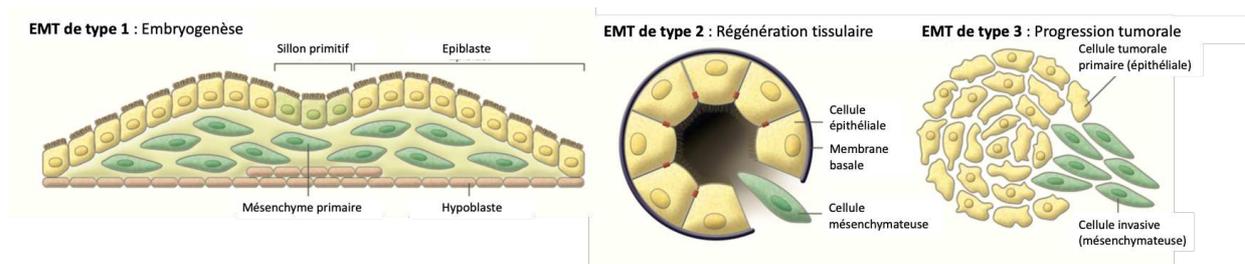


Figure 5 : **Différents contextes et fonctions de la transition épithélio-mésenchymateuse.** D'après Kalluri et Weinberg (Kalluri & Weinberg, 2009).

L'EMT de type 1 intervient dans un contexte physiologique normal de développement embryonnaire. Elle permet d'accomplir la morphogenèse afin de reproduire un organisme complet et différencié. L'EMT de type 2 est physiopathologique ; elle intervient dans la régénération et la fibrose tissulaire. Dans ce contexte, l'EMT génère des fibroblastes sécrétant en abondance de la matrice extra-cellulaire riche en collagène. Enfin, l'EMT de type 3 est associée à la progression tumorale ; elle est activée préférentiellement du fait de l'instabilité génétique caractéristique des cellules cancéreuses. Elle génère des cellules au potentiel tumorigène et métastatique augmenté (Ingthorsson et al., 2016).

L'EMT est une transformation complexe qui produit une grande diversité de cellules selon un spectre plus ou moins différencié. A l'exception de cas de dé-différenciation extrême, l'EMT est un programme cellulaire plastique et réversible qui fait passer les cellules d'un état épithélial à mésenchymateux et

inversement selon les signaux reçus. On parle alors de transition mésoenchymo-épithéliale (MET). En effet, de nombreux facteurs micro-environnementaux sont à l'origine de la régulation spatiotemporelle de ce programme. L'EMT n'est pas liée à des modifications génétiques mais épigénétiques (Figure 6), en faisant principalement intervenir la régulation de circuits transcriptionnels (Bill & Christofori, 2015). Ces circuits convergent autour des facteurs de transcriptions emblématiques de l'EMT (**Twist**, **ZEB-1/2**, **Snail**, **Slug**), cibles de voies de signalisation **TGF-β/Smad**, **Wnt/β-caténine** et **Wnt/Sonic hedgehog**, impliquées dans la tumorigénicité, la différenciation, la croissance, la mobilité ou encore les capacités d'auto-renouvellement cellulaire. Ils sont également régulés par l'expression d'ARN non codants dont miR-34 et la famille des miR-200. Par exemple, les miR-200 sont des répresseurs de ZEB-1 qui renforcent le phénotype épithélial. Leur expression est elle-même régulée par Snail et ZEB-1 et promeut la multi-potence et l'inhibition du phénotype épithélial (Moustakas & Heldin, 2014) (Smith & Bhowmick, 2016).

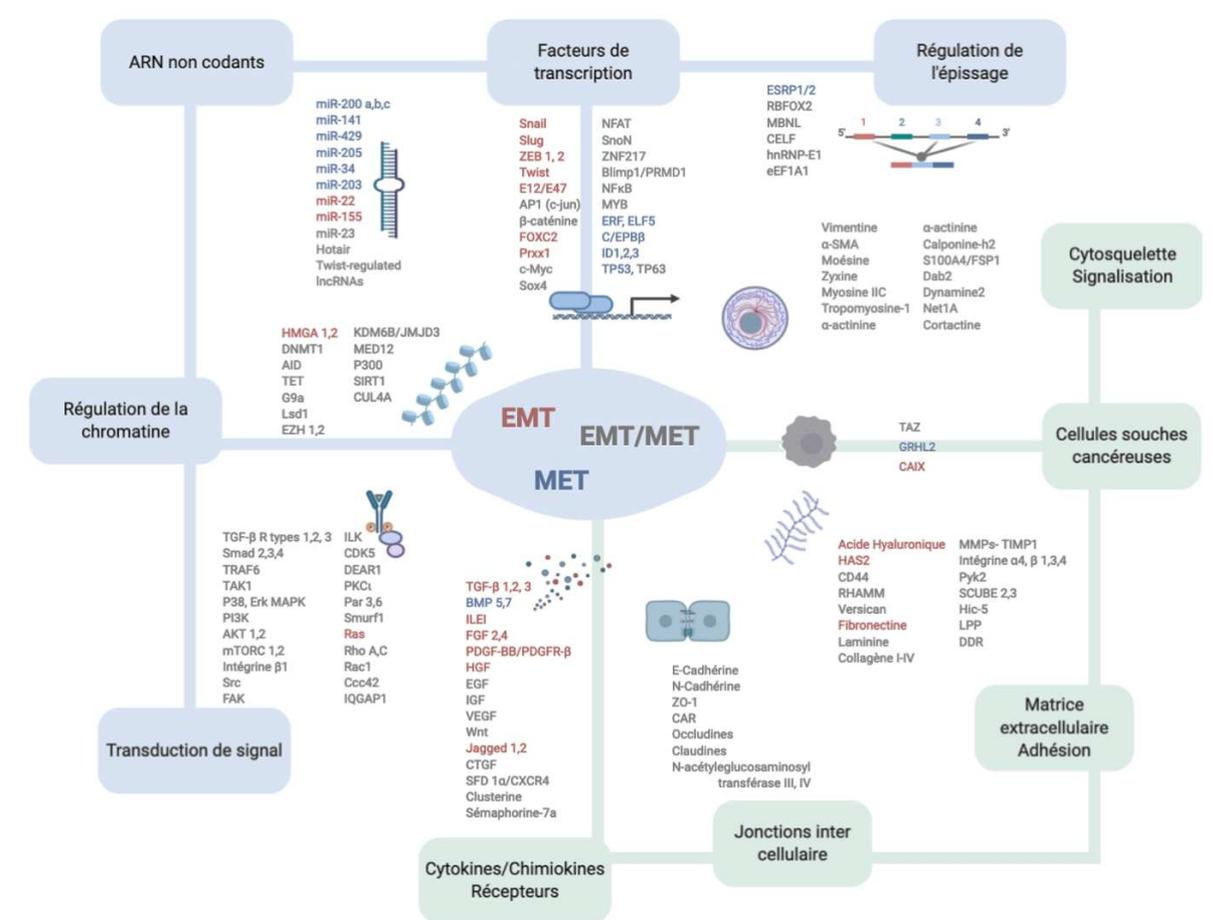


Figure 6 : Facteurs régulant les programmes de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et mésoenchymo-épithéliale (MET). Inspiré de Moustakas et Heldin (Moustakas & Heldin, 2014). Les facteurs promouvant la MET sont en bleu, l'EMT en rouge et ceux pouvant favoriser les deux programmes selon le contexte sont en gris.

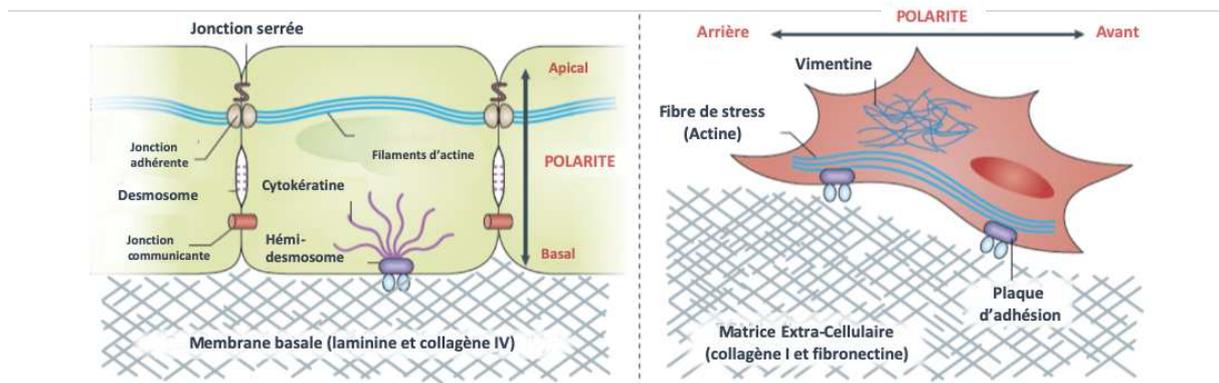
D'autres modules, présentés sur fond vert dans la figure 6, interviennent dans la régulation des programmes d'EMT et de MET. Il peut s'agir de molécules d'adhésion (intégrines, cadhérines, claudines), de structuration du cytosquelette (vimentine, moésine) et de la matrice extra-cellulaire (HAS2, acide hyaluronique), d'enzymes impliquées dans le remodelage de la MEC (MMPs), de cytokines (IL-1 β , IL6, TNF- α) et de marqueurs de cellules souches (Cai et al., 2018) .

Il est à noter qu'il existe une grande inter-relation entre ces paramètres et les facteurs de transcription (dont TP53). Les régulateurs d'épissage (dont ESRP1) agissent sur l'expression des modules fonctionnels caractérisant les phénotypes épithéliaux et mésenchymateux.

L'inter-relation de ces modules illustre les évolutions phénotypiques associées aux programmes d'EMT. Initialement, la fonction barrière des cellules épithéliales requiert une cohérence cellulaire et l'adhésion sur une lame basale. Celles-ci sont médiées par l'expression de nombreuses molécules d'adhésion qui participent aux jonctions cellule-cellule (serrées, adhérentes, communicantes, desmosomes), aux jonctions cellule-MEC (hémidesmosomes) et qui apportent des contraintes physiques fortes dictant la polarité baso-apicale caractéristique des cellules épithéliales (C. L. Chaffer & Weinberg, 2011).

Au cours de l'EMT, on observe un remodelage cellulaire résumé sur la figure 7 et qui implique (Ingthorsson et al., 2016; Shibue & Weinberg, 2017) :

- La **dissolution des jonctions inter-cellulaires** par la perte des jonctions adhérentes (cadhérine, intégrine) et des jonctions serrées (claudines, occludines)
- La **perte d'adhésion à la matrice extra-cellulaire** et de la **polarité baso-apicale**
- La **réorganisation de la MEC** pour une structure plus lâche **et sa dégradation** contribuant à l'invasion de la lame basale
- Un **réarrangement du cytosquelette** associé à la restructuration des filaments intermédiaires (kératine vers vimentine)
- Un **changement morphologique** passant d'une forme cuboïde à allongée
- Le gain **d'une polarité migratoire**



Jonctions serrées Jonctions adhérentes Desmosomes Jonctions communicantes	Jonction cellule-cellule	Minimale
Alignement des jonctions adhérentes par les filaments d'actine Filaments intermédiaires (kératines)	Cytosquelette	Fibres de stress (actine) Filaments intermédiaires (vimentine)
Hémidesmosomes liés à la cytokératine (intégrines $\alpha_6\beta_4$)	Interactions avec la matrice extra-cellulaire	Plaques d'adhésion liées aux fibres de stress (intégrine β_1 et β_3)
Polarité apicale-basale	Polarité	Polarité avant-arrière (front de migration)

Figure 7 : **Changements morphologiques associés à la transition épithélio-mésenchymateuse.** D'après Shibue et Weinberg (Shibue & Weinberg, 2017).

Tout au long de l'EMT, on observe une perte progressive des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, cytokératines) et un gain en marqueurs mésenchymateux (fibronectine, N-cadhérine, vimentine). A la fin de l'EMT, les cellules mésenchymateuses sont morphologiquement des fibroblastes. Néanmoins, le programme étant réversible, la plasticité cellulaire induit une dé-différenciation pour coloniser et proliférer dans un nouvel environnement. En effet, la progression métastatique nécessite la mise en œuvre de la MET pour la reprise de la prolifération et donc le maintien d'une flexibilité entre les différents phénotypes (Bill & Christofori, 2015).

5.4 Autres propriétés des cellules mésenchymateuses

Dans un contexte métastatique, les cellules tumorales utilisent la transition épithélio-mésenchymateuse pour se dissocier de la tumeur primaire et diffuser dans le sang. En plus de l'acquisition des propriétés de migration et d'invasion, l'EMT participe au renforcement d'autres propriétés cancéreuses (Lu & Kang, 2019). On retrouve ainsi des cellules mésenchymateuses avec des propriétés souches à haut potentiel initiatique de tumeurs et au métabolisme altéré. Celles-ci sont plus résistantes aux traitements, bloquent la sénescence et échappent au système immunitaire (Figure 8).

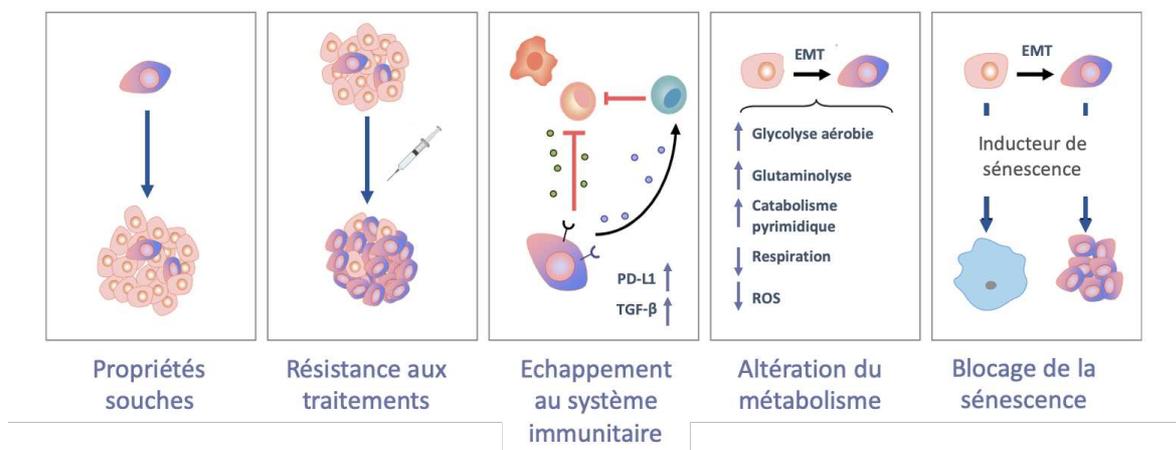


Figure 8 : **Propriétés acquises au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse.** D'après Lu et Kang (Lu & Kang, 2019).

Il arrive que ce phénotype mésenchymateux soit acquis en réponse à des signaux extra-cellulaires. Les cellules stromales participant à créer un micro-environnement tumoral riche en facteurs de croissance favorables à l'EMT (TGF-β, FGF, EGF), l'activation de l'EMT peut alors être localisée et graduelle selon le gradient de facteurs de croissance. Il coexiste alors un spectre des cellules tumorales présentant des phénotypes plus ou moins différenciés.

6. Hétérogénéité phénotypique du cancer du sein

Les tumeurs mammaires sont des masses hétérogènes composées de sous-populations phénotypiquement distinctes qui caractérisent l'hétérogénéité intra-tumorale (McGranahan & Swanton, 2017). Plusieurs modèles décrivent la progression tumorale et expliquent la coexistence de cellules phénotypiquement différentes. Ils sont principalement basés sur la nature des cellules dont

émergent les tumeurs : le **modèle stochastique** dérivant d'un clone, le **modèle hiérarchique** dérivant des cellules souches (Tableau 3) (Zardavas et al., 2015).

Tableau 3 : *Principales caractéristiques des modèles de progression tumorale stochastique et hiérarchique. D'après Zardavas (Zardavas et al., 2015).*

Caractéristiques	Modèle stochastique (clones)	Modèle hiérarchique (CSC)
Hiérarchie cellulaire	Non	Oui
Cellule d'origine	Toute nature	Toute nature
Cellule tumorigénique	Toute nature	CSC
Origines de l'hétérogénéité	Toute cellule cancéreuse (instabilité génomique et pression de sélection)	CSC (différenciations aberrantes)
Cellule à l'origine de la progression tumorale	Clone le plus adapté	CSC
Résistance aux traitements	Résistance innée et acquise (clone le plus adapté)	Résistance innée (CSC)
Hétérogénéité	Phénotypique Génétique Epigénétique	Phénotypique

6.1 Modèle stochastique

Historiquement, le modèle stochastique de la progression tumorale est inspiré de l'évolution darwinienne. Ce modèle repose sur le développement indépendant de clones consécutivement à l'apparition d'une mutation. Comme l'instabilité génomique est l'une des caractéristiques précoces du cancer qui augmente la probabilité d'établir et de fixer des mutations, elle apparaît être l'une des raisons marquées à l'hétérogénéité intra-tumorale (Venkatesan & Swanton, 2016).

Les expansions clonales sélectionnent progressivement les phénotypes les plus avantageux pour la survie et la prolifération cellulaire. En considérant les pressions de sélection successives, liées aux traitements et/ou au système immunitaire, on voit alors émerger les clones les plus résistants et donc les plus agressifs. Au contraire, certains sous-clones disparaissent naturellement selon des phénomènes de sélection négative (Zardavas et al., 2015).

En retraçant les mutations consécutives, il est alors possible de construire un arbre phylogénétique de l'histoire naturelle du cancer (Figure 9).

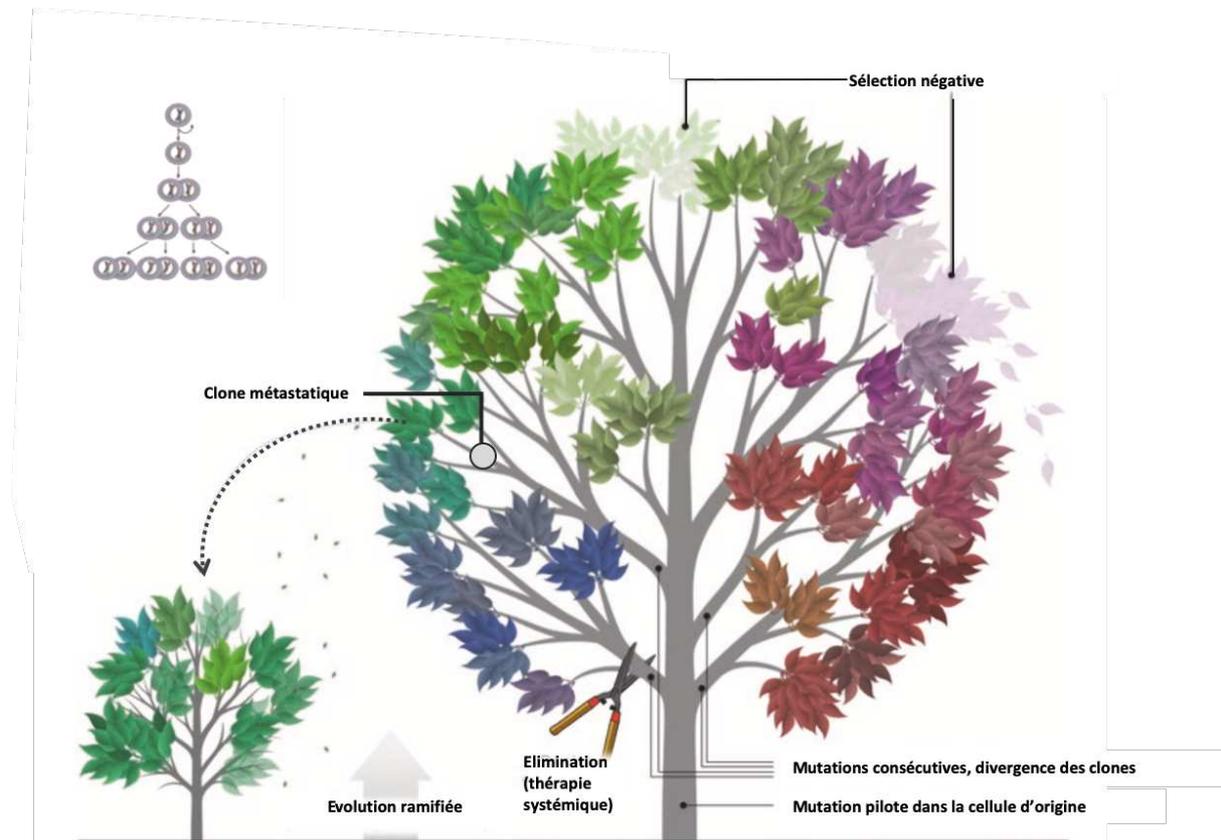


Figure 9 : **Analogie entre la progression clonale et l'arbre phylogénétique d'évolution ramifiée.** Chaque embranchement est représentatif de l'acquisition d'une nouvelle mutation à l'origine d'une divergence des clones. Plusieurs clones coexistent avec la présence de sous-clones mineurs issus d'altérations génétiques supplémentaires et associés à des phénotypes différents. L'évolution clonale est intermittente avec des étapes de sélections négatives et de sélection active en réponse à des stratégies thérapeutiques. D'après Kalinowski (Kalinowski et al., 2019).

Néanmoins, si l'histoire naturelle du cancer permet d'expliquer la coexistence de plusieurs clones au sein de la tumeur, ce modèle ne tient pas compte des variations épigénétiques et de la plasticité cellulaire.

6.2 Modèle hiérarchique

Le modèle hiérarchique de la progression tumorale est inspiré du développement des tissus sains avec une évolution autonome de la tumeur comme un organe dont les cellules se différencient progressivement à partir d'une cellule souche. Il suppose l'existence d'une rare sous-population cellulaire aux propriétés tumorigéniques : les cellules dites souches cancéreuses (CSCs).

Ces cellules, au sommet de la hiérarchie cellulaire, sont capables de s'auto-renouveler grâce à une division asymétrique, mais également de donner une descendance de progéniteurs moins

tumorigènes. Ces derniers se différencient alors en groupes hétérogènes de cellules tumorales (Figure 10) (Zardavas et al., 2015). Dans ce modèle, le génotype initial est le même mais l'expression du phénotype diffère au fil des différenciations. Initialement ce modèle ne tient pas compte de possibles avantages prolifératifs.

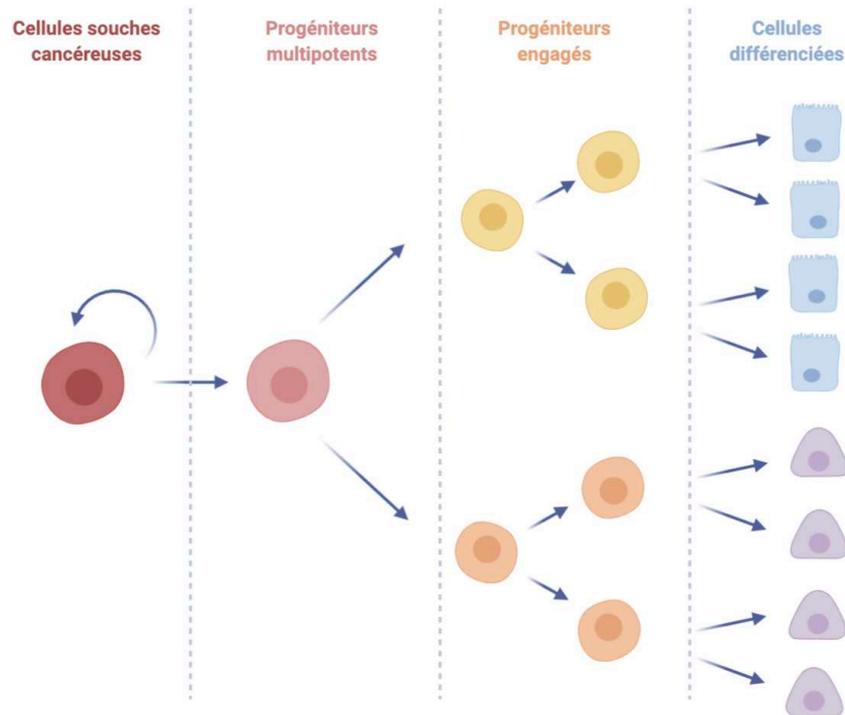


Figure 10 : **Modèle hiérarchique de progression tumorale.** Les cellules souches cancéreuses s'auto-renouvellent pour le maintien d'un pool mais peuvent également se différencier en progéniteurs multipotents. Les progéniteurs engagés dans une voie de différenciation peuvent ensuite se différencier en cellules spécialisées. L'ensemble de ces sous-populations coexistent au sein de la tumeur et reflètent l'hétérogénéité tumorale. Réalisé sur BioRender.

Les théories stochastique et hiérarchique ne sont pas exclusives et il existe probablement une évolution clonale ponctuelle. On parle aujourd'hui de **modèle hiérarchique d'évolution clonale** qui prend en compte le micro-environnement tumoral et la plasticité cellulaire comme déterminants de l'hétérogénéité tumorale. En effet, le micro-environnement participe à l'activation des programmes d'EMT et MET induisant des différenciations et dé-différenciations successives (Ginestier, 2017).

6.3 Cellules souches cancéreuses

Si la notion de CSC est débattue du fait de leur terminologie, leur isolement est parfois réalisé sur la base de leurs propriétés souches d'**auto-renouvellement** et de **différenciation**. En effet, la

démonstration de l'existence des CSC repose sur leur pouvoir d'initiation des tumeurs et de développement dans leur hétérogénéité. Ainsi les populations cellulaires enrichies en CSC ont une plus grande propension à former des sphères en suspension *in vitro* et à générer des tumeurs chez les souris xénotreffées *in vivo* (Shibue & Weinberg, 2017).

Les CSC sont présentes dans la plupart des cancers solides mais leur origine est peu claire. Elles pourraient provenir d'une cellule souche adulte ou d'un progéniteur muté dont la dé-différenciation augmenterait ses capacités d'auto-renouvellement (Lin et al., 2016). La régulation des CSC est à la fois génétique (avec l'activation des facteurs de transcription Snail, ZEB1, Twist qui confèrent des propriétés souches), épigénétique (méthylation de l'ADN, modification des histones, miR-200) et métabolique (enzymes de détoxification) (Lee et al., 2017).

L'identification des CSC repose généralement sur trois types de marqueurs emblématiques dont l'expression ou l'activation confèrent des propriétés souches (Lee et al., 2017) :

- Des facteurs de transcriptions dont Oct4, Sox2, Nanog, cMyc
- Des voies de signalisation dont les voies de TGF- β , Wnt, Hedgehog, Notch
- Des marqueurs surfaciques dont CD24, CD44 et CD133 (Figure 11)

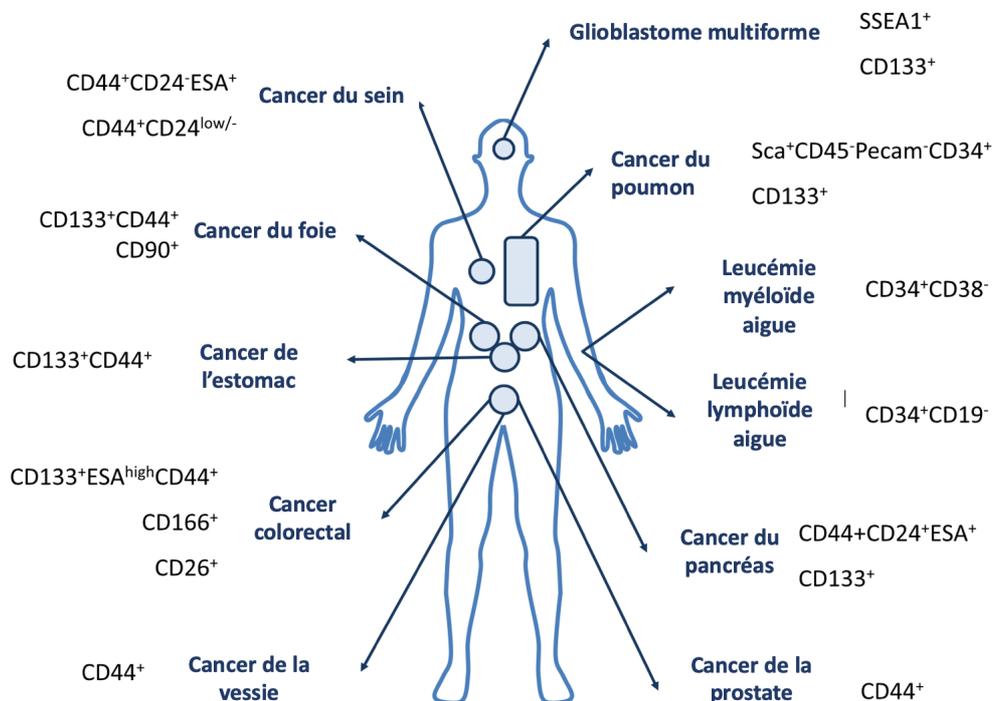


Figure 11 : Marqueurs membranaires les plus couramment utilisés pour identifier les cellules souches cancéreuses chez l'Homme. D'après Franco (Franco et al., 2016).

Les marqueurs membranaires sont les plus fréquemment utilisés pour identifier les CSC ; cependant leurs expressions ne leur sont pas exclusives et donc des combinaisons avec d'autres marqueurs sont nécessaires pour identifier les cellules souches (Peitzsch et al., 2019). Par exemple, dans le cancer du sein, les sous-populations souches sont associées à l'expression du cluster de différenciation CD44, à l'absence du CD24 et à l'activation de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH1). Ces marqueurs sont conservés tout au long de la cascade métastatique (dans la tumeur primaire, dans les CTC et aux sites métastatiques), parfois associés à différentes fonctions. Par exemple les populations ALDH1⁺ sont plus proliférantes et tumorigéniques que les CD44⁺/CD24^{low/-} qui ont une plus grande propension à migrer et à métastaser (Ginestier, 2017). L'implication particulière des CD44⁺/CD24⁻ a été démontrée *in vivo* suite à l'injection clonale d'une centaine de cellules dans les coussins adipeux mammaires de souris NOD/SCID. Contrairement aux cellules CD24⁺, les cellules CD44⁺/CD24⁻ sont capables de régénérer une tumeur différenciée (Al-Hajj et al., 2003).

6.4 Population CD44⁺/CD24^{low/-}

Dans le cancer du sein, la population CD44⁺/CD24^{low/-} est particulièrement intéressante puisqu'elle serait à la fois caractéristique des CSC et des cellules mésenchymateuses. En effet, l'EMT induite *in vitro* par l'exposition exogène au TGF-β1 de cellules épithéliales mammaires immortalisées (HMLE) est associée à l'enrichissement en cellules CD44⁺/CD24^{low/-} et à une capacité accrue à former des mammosphères (Mani et al., 2008). Isolée suite à l'EMT induite *in vitro*, cette population qui peut induire une tumeur chez les souris immuno-déficientes exprime donc des propriétés souches (Morel et al., 2008).

La motilité et l'invasivité acquises au cours de l'EMT permettent de faire le lien entre cellules mésenchymateuses et cellules souches. En effet, les programmes d'EMT et de MET sont essentiels à la dissémination et à la métastase de cellules tumorales mammaires. L'activation de la MET au site métastatique à partir de cellules mésenchymateuses, qui permet de redonner une tumeur différenciée, peut s'apparenter à la différenciation des CSCs en progéniteurs non souches. Inversement, la différence entre cellules souches et non souches est souvent attribuée au programme d'EMT qui activerait cette conversion souche (Shibue & Weinberg, 2017). Cette interrelation trouverait son origine dans l'activation parallèle des mêmes voies de signalisation dont Wnt/β-caténine, Notch, Hedgehog (Nieto et al., 2016).

Le lien entre EMT et CSC reste à nuancer. En effet, si l'EMT permet d'amener les cellules cancéreuses à un stade quasi souche, la dé-différenciation totale des cellules mésenchymateuses est un état stable

empêchant la plasticité. Elles sont parfois à l'origine de micro-métastases, mais leur potentiel tumorigène est limité. Les propriétés souches des cellules cancéreuses sont alors associées aux phénotypes intermédiaires, plus plastiques et sensibles aux signaux micro-environnementaux, alors capables de redonner des tumeurs dans leur hétérogénéité (Christine L. Chaffer et al., 2016).

La présence de CSCs mammaires et la plasticité des cellules cancéreuses sont donc en partie responsables de l'hétérogénéité tumorale primaire et secondaire à la dissémination métastatique.

L'équipe de Shao a réalisé un algorithme MATH (*mutant allele tumor heterogeneity*) à partir de l'exome de 916 tumeurs mammaires permettant de corréler l'hétérogénéité génétique (mutations, enrichissement, nombre de copies) aux signes cliniques et aux sous-types histologiques et moléculaires (D. Ma et al., 2017). Ils observent ainsi que les tumeurs lumorales ER positives, généralement de bon pronostic, sont associées à un score MATH d'hétérogénéité faible. A l'inverse, les tumeurs basales triples négatives sont particulièrement représentées par des scores MATH élevés (Figure 12).

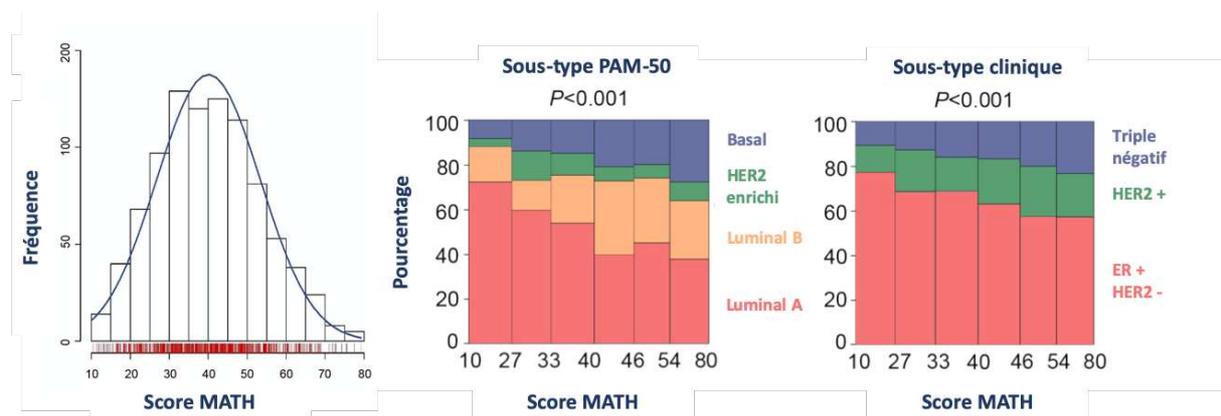


Figure 12 : Distribution du score MATH (*mutant allele tumor heterogeneity*) selon le sous-type tumoral mammaire. D'après Ma (N. Ma et al., 2017).

L'enrichissement en CSCs dans les tumeurs mammaires est donc associé au développement de formes cliniques de mauvais pronostic. L'issue thérapeutique de ces formes cliniques étant moins favorable à la survie des patients, la compréhension de la réponse aux traitements des cellules souches cancéreuses et des tumeurs mammaires dans leur hétérogénéité est donc essentielle.

Ainsi, je développerai dans le chapitre deux, l'hétérogénéité fonctionnelle de la réponse tumorale mammaire à la radiothérapie.

Chapitre 2

Radiothérapie et hétérogénéité fonctionnelle du cancer du sein

RADIOTHERAPIE ET HETEROGENEITE FONCTIONNELLE DU CANCER DU SEIN 49

1.	PRINCIPE DE LA RADIOTHERAPIE	51	
1.1	RAYONNEMENTS IONISANTS		51
1.2	INTERACTIONS RAYONNEMENTS/MATIERE		52
2.	EFFETS BIOLOGIQUES DE LA RADIOTHERAPIE	55	
2.1	EFFETS CIBLES DE LA RADIOTHERAPIE		55
a.	Effets ciblés directs		55
b.	Effets ciblés indirects		56
c.	Conséquences biologiques des effet ciblés		57
2.2	EFFETS NON CIBLES DE LA RADIOTHERAPIE		60
a.	Effet <i>bystander</i>		60
b.	Instabilité génomique trans-générationnelle		61
c.	Effet abscopal		61
2.3	EFFETS INDESIRABLES DE LA RADIOTHERAPIE		63
3.	RADIO-RESISTANCE	65	
4.	OPTIONS THERAPEUTIQUES	68	
4.1	AMELIORATIONS TECHNOLOGIQUES ET CLINIQUES		68
a.	Améliorations balistiques		68
b.	Nouvelles modalités d'irradiation		69
c.	Nouvelles sources d'irradiation		71
4.2	POTENTIALISATION DES EFFETS BIOLOGIQUES		72
a.	Modifications biologiques	72	
b.	Modifications physiques	75	

1. Principe de la radiothérapie

La radiothérapie (RT) est un traitement locorégional à visée curative, palliative et symptomatique ayant pour objectif de contrôler la tumeur tout en épargnant les tissus sains. Elle utilise des rayonnements ionisants (RI) afin de générer des dommages à l'ADN qui ralentiront ou annihilent la prolifération cellulaire.

1.1 Rayonnements ionisants

Un rayonnement est ionisant lorsqu'il transmet suffisamment d'énergie aux atomes du milieu traversé pour provoquer leur ionisation. Ces rayonnements sont directement ou indirectement ionisants selon leur nature **particulaire** ou **électromagnétique**.

Les rayonnements particulaires sont constitués de particules atomiques, chargées (électrons, protons, ions, alpha) ou non (neutrons), qui possèdent une masse ainsi qu'une énergie cinétique. Composées de 2 neutrons et 2 protons, les **particules alpha** (α) sont identiques à un noyau d'hélium. Ces particules sont lourdes, lentes et très peu pénétrantes. De ce fait, elles sont arrêtées par une couche de 5 cm d'air ou une simple feuille de papier. Les **particules bêta** (β) sont chargées positivement (protons β^+) ou négativement (électrons β^-) et sont plus légères et plus rapides que les particules α . Les électrons sont de faible énergie et ont un pouvoir de pénétration limitée : ils sont arrêtés par une feuille d'aluminium. En comparaison, les protons ont une pénétration tissulaire plus importante et génèrent un dépôt d'énergie local plus précis du fait de l'existence du pic de Bragg (Figure 13). Les flux de neutrons constituent également un rayonnement particulaire, mais ces particules non chargées n'interagissent pas directement avec les atomes de la matière traversée selon les lois coulombiennes. Ils sont néanmoins susceptibles d'interagir avec les noyaux atomiques dont la déstabilisation génère des rayonnements électromagnétiques, indirectement ionisants.

Les rayonnements électromagnétiques correspondent à des flux de photons de haute énergie et de grande pénétration tissulaire, nécessitant une plaque de plomb ou 1 mètre de béton pour s'assurer de leur arrêt complet. Si les rayonnements X et γ ont des propriétés biologiques égales pour des énergies égales, leurs origines diffèrent. Les **rayonnements γ** sont issus de la désintégration d'atomes radioactifs tels que le Cobalt 60, le Césium 137 ou l'Iridium 192. Les **rayonnements X** sont produits artificiellement par l'interaction d'un faisceau d'électrons accélérés sur une cible en métal lourd. Ce sont des rayonnements de freinage émis lors de la réorganisation du cortège électronique qui

permettent le retour des atomes à leur état fondamental. Ils sont très pénétrants et sont utilisés à la fois en radiographie et en thérapie.

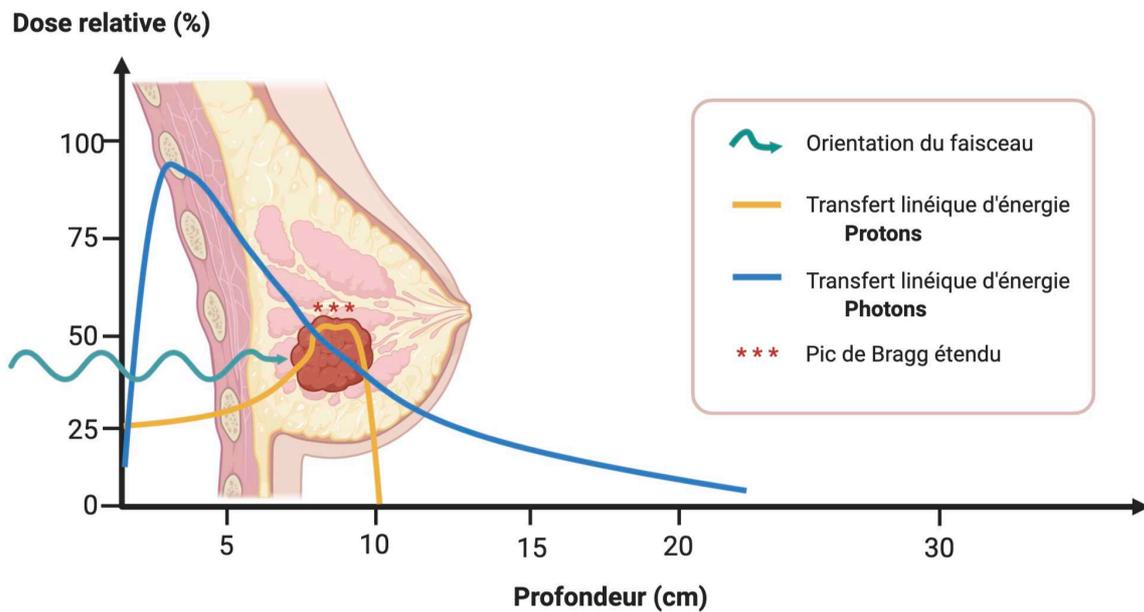


Figure 13 : Illustration du dépôt de dose selon la nature du rayonnement ionisant et la profondeur de tissu traversé. Inspiré de Benveniste (Benveniste et al., 2019) et réalisé sur BioRender.

Les énergies portées par les différents RI et leurs parcours dans la matière ne sont pas comparables. Leurs applications et les moyens de protection individuelle associés doivent donc être choisis en regard de la nature et des propriétés des RI. Ainsi, les RI électromagnétiques atteignant des tumeurs situées en profondeur sont les plus utilisés en clinique. Le dépôt d'énergie au cours de leur parcours dans la matière est mesuré en Gray (1 Gray = 1 joule/kilogramme) et lié à différents types d'interactions.

1.2 Interactions rayonnements/matière

Les rayonnements électromagnétiques X et γ ont le même comportement vis-à-vis de la matière. Ils interagissent aléatoirement selon différents mécanismes.

La **diffusion Rayleigh** décrit une diffusion élastique au cours de laquelle la collision d'un photon incident avec des électrons fortement liés à leur noyau ne provoque pas de perte d'énergie cinétique. L'ensemble de l'atome absorbe alors le recul de la collision, provoquant l'oscillation collective des électrons puis la réémission d'un photon à la même énergie que le photon incident, mais selon une

trajectoire déviée. Ce type d'interaction est d'autant plus probable que le numéro atomique (Z) du matériau traversé est élevé et que l'énergie du photon incident est faible.

La **diffusion Compton** décrit une diffusion inélastique au cours de laquelle la collision d'un photon incident avec un électron libre ou faiblement lié provoque son éjection des couches électroniques les plus superficielles. L'énergie globale étant conservée dans le système, l'électron éjecté et le photon diffusé partagent l'énergie du photon initial.

L'**effet photoélectrique** décrit un phénomène d'absorption au cours duquel l'énergie d'un photon incident est intégralement transférée à un électron du cortège électronique de l'atome rencontré. Si l'énergie du photon incident est supérieure à l'énergie de liaison (EI) de cet atome, l'absorption est totale et un photoélectron est éjecté avec une énergie équivalente à celle du photon incident minorée de son énergie de liaison (Figure 14).

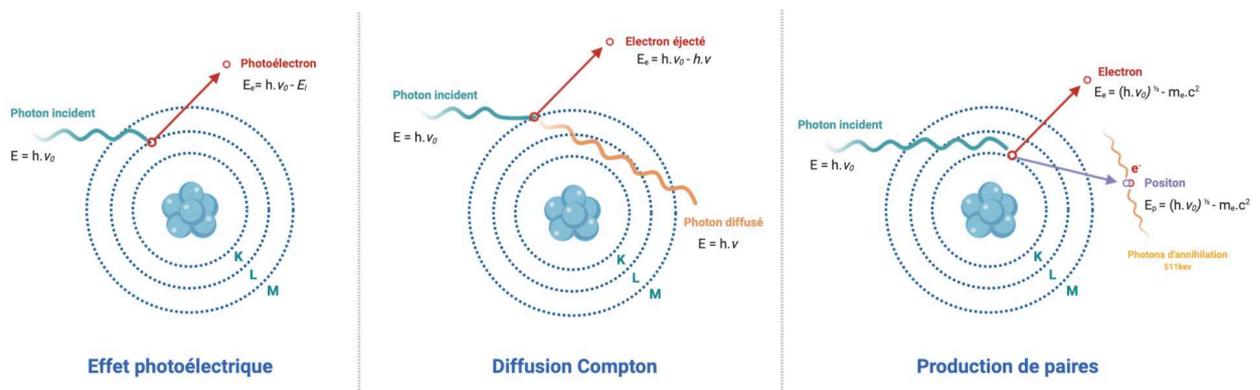


Figure 14 : Principales interactions photoniques contribuant à un dépôt local d'énergie. Réalisé sur BioRender.

La **création de paires** correspond à la matérialisation d'une paire d'électron-positon suite à la disparition d'un photon incident dans le champ coulombien du noyau. Le positon est alors rapidement annihilé avec un électron libre du milieu, ce qui provoque l'émission de deux photons des 511 keV dans des directions diamétralement opposées. Ce type d'interaction n'est donc possible qu'au-delà d'un seuil énergétique de 1,022 MeV.

Si l'occurrence de ces interactions est aléatoire, leur importance relative dépend en partie de l'énergie du photon incident, mais également du numéro atomique du milieu rencontré (Figure 15).

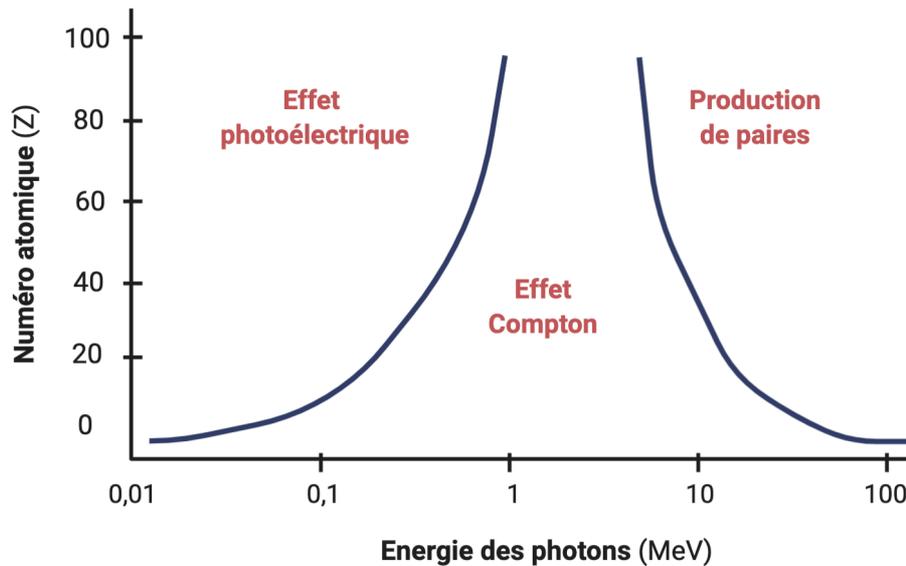


Figure 15 : Diagramme de prédominance des effets photoélectrique, Compton et de matérialisation selon l'énergie des photons incidents et le numéro atomique de la matière traversée. D'après Evans et Beiser (Evans & Beiser, 1955).

L'effet photoélectrique prédomine pour les photons de faible énergie et des matériaux de haut-Z. La probabilité d'effet photoélectrique augmentant avec le coefficient d'absorption massique, elle est donc proportionnelle au cube du numéro atomique. L'effet Compton prédomine pour des photons d'énergie moyenne et des matériaux de Z moyens. Enfin, la production de paires étant conditionnée à un seuil énergétique élevé, elle intervient majoritairement dans les interactions de photons d'énergies élevées (supérieures à 1,022 MeV) avec des atomes lourds.

Par ailleurs, il est à noter que si l'absorption des RI provoque l'excitation d'un atome, une étape de relaxation est nécessaire afin de le ramener à son état fondamental. De même, toute ionisation nécessite un réarrangement du cortège électronique visant à combler la vacance consécutive à l'éjection d'un électron. Ce réarrangement conduit soit à l'émission d'un photon X (dit **photon de fluorescence**) soit à l'émission d'un électron (dit **électron Auger**) par l'intermédiaire d'un photon virtuel. Ces deux processus sont en compétition et la probabilité de relaxation Auger des couches internes diminue lorsque le numéro atomique du matériau considéré augmente (Barthés-Labrousse, 1995). Dans le cas des atomes lourds, l'effet Auger peut se propager par les transitions électroniques successives qui permettent le comblement progressif des couches électroniques internes. On parle alors de **cascade Auger**.

Les photons étant indirectement ionisants, ce sont les particules émises secondairement aux interactions sus-décrites qui sont à l'origine du dépôt de dose local et des lésions des systèmes biologiques.

2. Effets biologiques de la radiothérapie

Une séance de radiothérapie conventionnelle consiste en l'accélération de particules pour l'émission d'un faisceau de photons dirigé vers la tumeur. Ce traitement locorégional est non sélectif des cellules cancéreuses : il peut être à l'origine d'effets ciblés et non ciblés, mais également d'effets indésirables.

2.1 Effets ciblés de la radiothérapie

Le transfert d'énergie des photons incidents à la matière, les RI provoquent l'éjection d'électrons énergétiques susceptibles d'occasionner de nombreuses lésions moléculaires (Lara et al., 2015). Ces lésions sont provoquées directement par les électrons et/ou indirectement par l'intermédiaire d'espèces oxydantes (Figure 16).

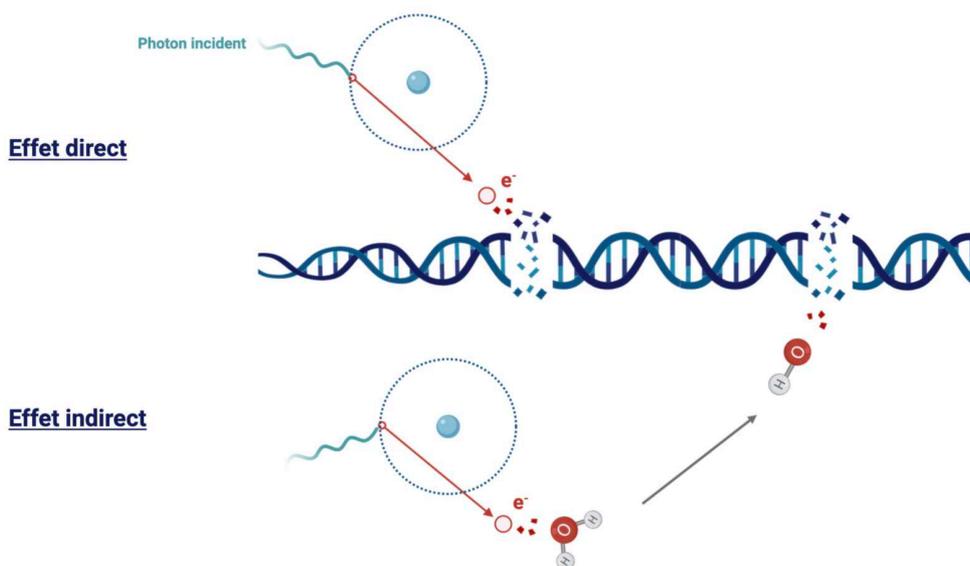


Figure 16 : Effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur l'ADN. Réalisé sur BioRender.

a. Effets ciblés directs

L'ADN est la cible principale de rayonnements ionisants. En effet, les particules secondaires émises lors des interactions avec la matière sont à l'origine de la déstabilisation de sa structure moléculaire qui génère des lésions de différentes sévérités : la création de sites abasiques, l'oxydation de bases, les cassures simple- et double-brin (Kim et al., 2019). L'occurrence de ces lésions est dépendante de la

dose et on estime que 500 à 1000 cassures simple brin et 40 cassures double-brin sont produites par Gray. La sévérité des lésions est non seulement associée à leur taille mais également à leur réparabilité. Si les lésions double-brins sont moins fréquentes que les cassures simple-brin, il est plus probable qu'elles soient mal réparées et sont donc les plus impliquées dans l'apparition de lésions chromosomiques et dans la mortalité cellulaire.

En dehors des effets mécaniques et directs des RI sur l'ADN, deux tiers des cassures double-brin seraient dépendantes des propriétés cellulaires : phase dans le cycle cellulaire et condensation de la chromatine, profil prolifératif ou différencié, niveau de défenses anti-oxydantes (Lara et al., 2015).

b. Effets ciblés indirects

L'eau étant le composant majeur des milieux biologiques, la probabilité d'interaction des RI avec les molécules d'eau est forte. La radiolyse de l'eau produit alors du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des radicaux libres (l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle HO^{\bullet}) à l'origine d'un **stress oxydatif**. Ces radicaux possèdent des électrons célibataires non appariés à un électron de spin opposé, ce qui les rend très instables et réactifs. Leur demi-vie est extrêmement courte (de l'ordre de 10^{-6} seconde) ce qui favorise leur interaction avec les atomes proches. Les espèces réactives de l'oxygène sont donc produites de façon localisée dans le temps et dans l'espace (Kim et al., 2019).

En plus de la radiolyse de l'eau, les RI peuvent être à l'origine d'une altération des voies métaboliques dont résulte également la production d'espèces réactives de l'oxygène. En effet, l'altération de la perméabilité mitochondriale perturbe son activité et peut générer un stress oxydatif supplémentaire, retardé ou persistant jusqu'à plusieurs jours. Dès lors, si les systèmes anti-oxydants sont dépassés, ce stress oxydatif est à l'origine de lésions intra-cellulaires (Lee et al., 2017). Le niveau de stress oxydatif est régulé par la balance pro-/anti-oxydante dans laquelle intervient la protéine p53. En réponse à un stress oxydatif modéré, p53 favorise l'activation des réponses anti-oxydantes, avec notamment la synthèse de molécules réductrices (dont le glutathion sous forme réduite GSH) et d'enzymes de détoxification, dont la catalase. A l'inverse, l'activation de p53 en réponse à un stress oxydatif plus important renforce l'effet pro-oxydant responsable de l'atteinte mitochondriale et des différentes lésions intracellulaires : peroxydation lipidique, mauvaise configuration protéique et cassure double-brin (Figure 17).

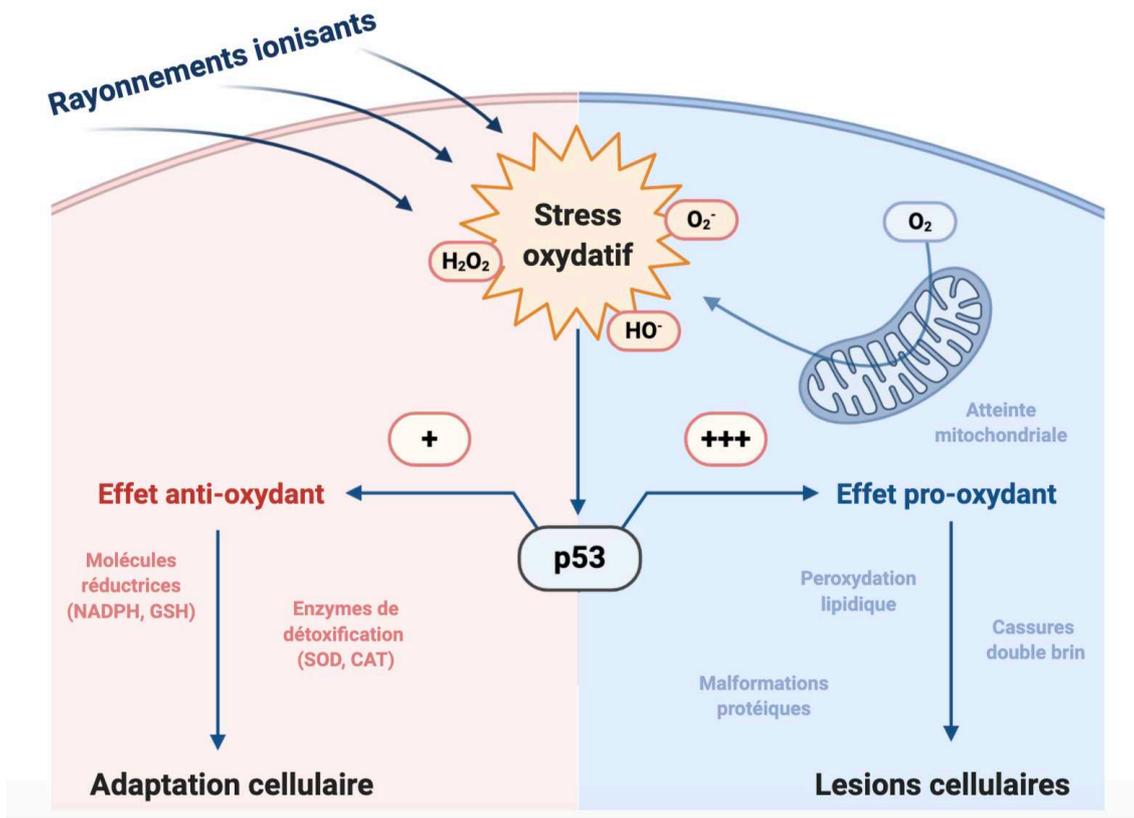


Figure 17 : Production d'espèces réactives de l'oxygène en réponse à l'irradiation et implication de la signalisation p53 dans la balance oxydative. D'après Kim (Kim et al., 2019). Réalisé sur BioRender.

c. Conséquences biologiques des effet ciblés

Théoriquement la réponse à l'irradiation est décrite selon trois phases intervenant à différentes échelles biologique et temporelle : les phases physique et chimique dont les principes viennent d'être détaillés, et la phase biologique qui répond aux lésions cellulaires produites directement et indirectement en réponse à l'irradiation.

La **phase physique** intervient à l'échelle atomique et consiste au dépôt d'énergie ainsi qu'au transfert localisé de charges. Si l'énergie est suffisante pour ioniser la matière, la réorganisation du cortège électronique des atomes donne alors lieu à l'émission d'espèces secondaires radiatives (photons de fluorescence) et particulaire dans un délai de 10^{-15} seconde suivant l'irradiation.

La **phase chimique** intervient à l'échelle moléculaire dans un délai de 10^{-6} seconde suivant l'irradiation. Les radicaux libres produits lors de la radiolyse de l'eau et les électrons solvatés issus de la phase physique provoquent des lésions des composants cellulaires.

Outre la radiolyse de l'eau et les atteintes à l'ADN, l'irradiation induit des lésions dans tous les compartiments cellulaires (membrane plasmique, réticulum endoplasmique, mitochondrie) (Kim et al., 2019).

La **phase biologique** intervient à l'échelle cellulaire en réponse au stress oxydatif, aux lésions moléculaires et en particulier aux dommages à l'ADN. En réponse à l'irradiation, l'ADN peut être altéré (formation d'adduits, mésappariement) ou cassé (cassure simple brin, cassure double brin). Selon la nature du dommage, des voies de réparation sont spécifiquement activées (figure 18).

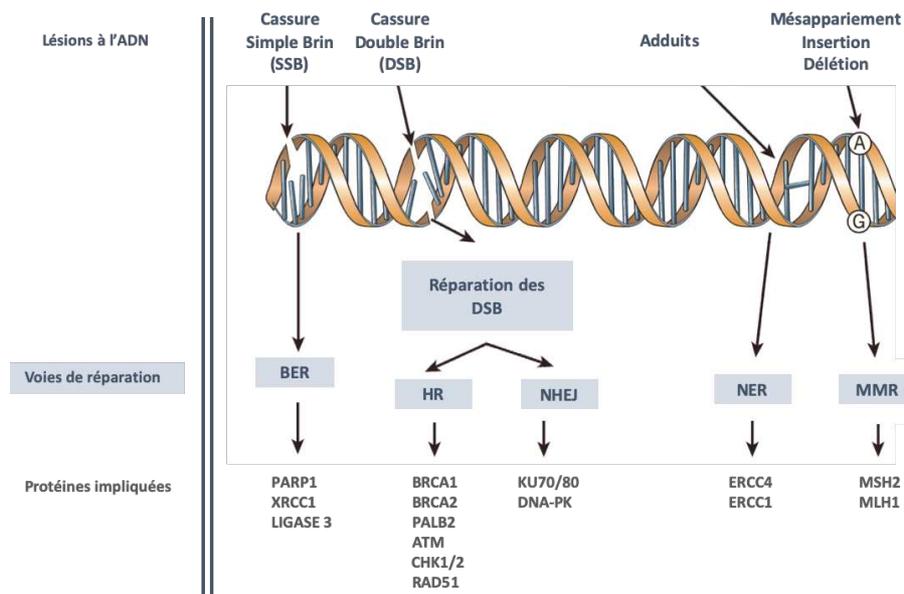


Figure 18 : Principaux dommages à l'ADN et leurs voies de réparation. D'après Lord et Ashworth (Lord & Ashworth, 2012). BER = réparation par excision de bases, HR = recombinaison homologue, NHEJ = jonction des extrémités non homologues, NER = réparation par excision de Nucléotides, MMR = réparation des mésappariements.

Ainsi, la phase biologique génère une cascade de réponses cellulaires faisant intervenir les systèmes de détection des lésions, de réparation de l'ADN et les voies de mort cellulaire.

En effet, l'intégrité du génome étant en permanence surveillée, les cassures de l'ADN sont rapidement détectées et conduisent au recrutement des protéines ATM et ATR dont l'autophosphorylation conduit à la phosphorylation de l'histone H2AX. Cette signalisation des cassures permet ensuite le recrutement et la phosphorylation de substrats (53BP1, BRCA1, Chk1, Chk2) qui participent à l'activation des points de contrôle et à l'arrêt du cycle cellulaire. La progression dans le cycle cellulaire et la prolifération sont alors arrêtées le temps nécessaire à la réparation (Arnold et al., 2020). La voie de réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) est principalement impliquée dans la réparation de ces lésions radio-induites puisque, contrairement à la réparation homologue (HR) qui n'intervient qu'en phase G2/M, elle est activée tout au long du cycle cellulaire (Figure 19).

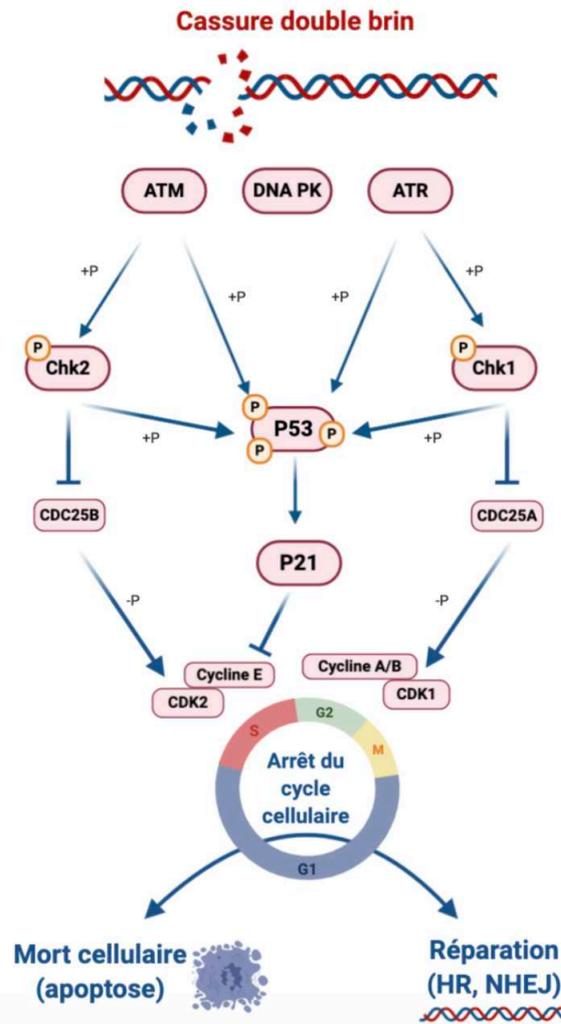


Figure 19 : **Signalisation des cassures à l'ADN et réponse cellulaires associées.** En réponse à une cassure double-brin, la signalisation cellulaire conduit à l'arrêt du cycle cellulaire par la désactivation des points de contrôle du cycle cellulaire associés aux cyclines A/B/E et aux kinases dépendantes des cyclines CDK1/2. Selon les capacités de réparation cellulaires, la lésion est réparée ou la cellule meurt. Réalisé sur BioRender.

Les systèmes de réparation sont sollicités quotidiennement en réponse à la production du stress oxydatif endogène lié à la respiration cellulaire. Ils participent ainsi à la réparation des 10^4 à 10^6 lésions génomiques produites quotidiennement par cellule. Si la plupart des lésions peuvent être réparées fidèlement, les capacités de réparation peuvent être dépassées en réponse à un stress exogène. Une réparation fautive peut alors conduire à la fixation de mutations qui favorisent la carcinogenèse (Lara et al., 2015) et la persistance de lésions à l'activation de différentes voies de mort :

- L'**apoptose** décrit le processus de mort cellulaire programmée. En réponse à des dommages à l'ADN trop importants, p53 participe à la perméabilisation de la membrane mitochondriale qui favorise alors la libération de molécules pro-apoptotiques, dont le cytochrome c. L'activation de la voie apoptotique intrinsèque conduit alors à la condensation du cytoplasme, à la fragmentation de l'ADN ainsi qu'à l'invagination des

membranes nucléaires et plasmiques. En conséquence, l'apoptose conduit à la production de nombreux corps apoptotiques sans libération du contenu cellulaire.

- La **nécrose** décrit une mort cellulaire non programmée répondant à des dommages trop importants. Elle consiste en la dilatation des organites intracellulaires jusqu'à rupture de la membrane plasmique. La libération du contenu cellulaire est alors à l'origine d'une inflammation et de l'activation de cellules immunitaires.
- La **catastrophe mitotique** intervient dans le cas de lésions à l'ADN de cellules en phase de mitose. Dans ce cas, la mitose est suspendue et un glissement mitotique permet aux cellules de revenir en phase G1. Néanmoins, à l'issue de cette mitose aberrante, les cellules présentent des micro- ou multi-nucléations dont la persistance occasionne l'apoptose ou la sénescence.
- La **sénescence** correspond à un état stable et irréversible de cellules hors du cycle cellulaire (phase G0). Inertes, elles n'initient plus la réplication de leur ADN et stoppent leur prolifération mais restent néanmoins métaboliquement actives.

2.2 Effets non ciblés de la radiothérapie

Les effets non ciblés des rayonnements ionisants surviennent sur des cellules qui n'ont pas été irradiées. Historiquement, les effets non spécifiques les plus décrits sont l'effet à distance (*bystander*) et l'instabilité génomique, mais leurs mécanismes sont si peu compris qu'il n'est pas possible d'en prédire la fréquence, ni l'intensité (Bright & Kadhim, 2018).

a. Effet *bystander*

Les effets *bystander* décrivent les effets de l'irradiation sur des cellules non irradiées, ces effets induisant des réponses identiques à celles des cellules directement irradiées. Il peut s'agir d'instabilité génomique, de mutations, d'aberrations chromosomiques ou de mort cellulaire. Ces effets de proximité interviennent à distance physique des cellules irradiées et résultent de leur communication avec des cellules non irradiées (Bright & Kadhim, 2018). Cette communication peut être directe par la transmission d'espèces réactives de l'oxygène à travers les pores des jonctions communicantes ou indirecte par la libération de facteurs solubles comme des cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL8, TNF- α , TGF- β) et des signaux de morts (Fas, TRAIL) dans le micro-environnement (Sun et al., 2014). Des vésicules extra-cellulaires de taille nanométrique (30-120 nm) peuvent également participer à cette communication intercellulaire. En effet, l'excrétion d'exosomes participe à la transmission de signaux

biologiques et au partage de composants cellulaires (lipides, protéines, miRNA) des cellules irradiées vers les cellules voisines qui les endocyteraient (Jabbari et al., 2019).

La caractérisation de cet effet peut être faite *in vitro* par des expériences de transfert de surnageant de cellules irradiées (milieux conditionnés) sur d'autres cellules en culture. Ces études permettent également de mettre en évidence l'hétérogénéité de ces effets en regard du type cellulaire, du type de rayonnement et de la dose d'irradiation. Ainsi, les effets bystander sont d'autant plus faciles à identifier que la dose et le transfert linéique d'énergie des rayonnements sont faibles et que le type cellulaire étudié y est sensible (Sun et al., 2014).

b. Instabilité génomique trans-générationnelle

L'instabilité génomique (IG) induite dans les cellules directement irradiées peut être observée dans la descendance des cellules irradiées, survenant donc à distance temporelle de l'irradiation. L'infidélité ou l'absence de réparation ne permettent pas la survie cellulaire mais la persistance de stress oxydatif et d'une inflammation chronique peut être transmise dans la descendance des cellules irradiées. Celle-ci participerait alors au maintien de l'IG à l'acquisition progressive de mutations caractéristiques d'une carcinogenèse radio-induite.

L'instabilité génomique se manifeste alors sous la forme de mutations, de réarrangements chromosomiques, de micronoyaux ou d'une modification de la ploïdie. En plus de ces modifications génétiques, l'instabilité génomique peut se transmettre par des événements épigénétiques affectant la méthylation de l'ADN, le remodelage de la chromatine ou l'expression de miRNA (Bright & Kadhim, 2018).

c. Effet abscopal

Étymologiquement l'effet abscopal décrit un effet survenant loin de sa cible. Dans un contexte de radiothérapie, il décrit la réponse anti-tumorale de tissus situés à distance du volume irradié, hors de la portée des effets bystander à proximité immédiate des cellules irradiées. Il s'agit le plus souvent de réduction de métastases chez des patients traités par radiothérapie localement, proche de leur tumeur primaire. L'effet abscopal est alors caractérisé lorsque la réduction de la plus grande métastase dépasse 30% du volume initial (R. Wang et al., 2018).

L'effet abscopal est un phénomène systémique qui est en partie médié par l'activation locale du système immunitaire adaptatif. En effet, en réponse à l'irradiation, la mort des cellules du système immunitaire conduit au relargage de signaux danger (DAMP pour motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires) dont l'ATP, HMGB1 ou la calréticuline ainsi qu'à la libération cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL6, TNF- α) (Asna et al., 2018).

L'irradiation provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire et une inflammation locale. Ces signaux sont à l'origine du recrutement de macrophages et de cellules dendritiques (DC), dont l'activation augmente l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Les DCs activées peuvent ensuite présenter les néo-antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8+ au niveau d'un ganglion lymphatique à proximité. Ainsi sensibilisés, les lymphocytes T rejoignent la circulation systémique et infiltrent tumeurs et métastases où ils peuvent exercer leur effet cytotoxique (Figure 20).

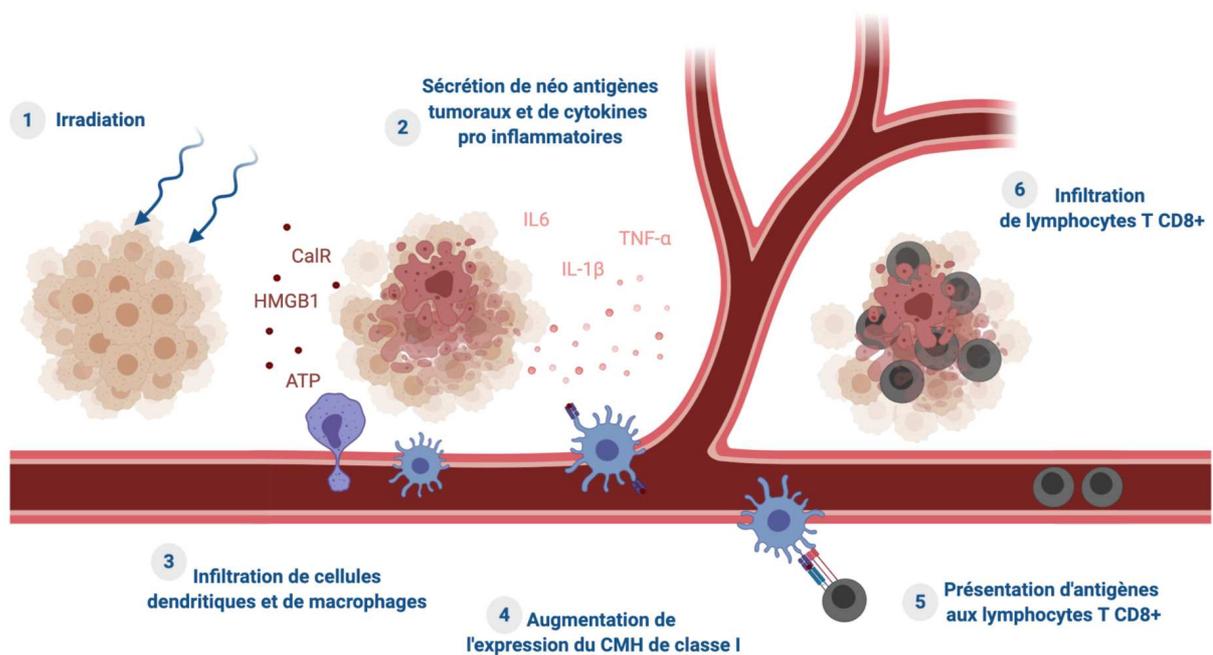


Figure 20 : **Principe de l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale.** La libération de la calréticuline (CalR), de l'HMGB1 (High mobility group Box 1) et de l'adénosine triphosphate (ATP) en réponse à l'irradiation constitue un signal de danger participant à l'activation des cellules dendritiques qui participe au développement d'une réponse adaptative médiée par les lymphocytes T CD8+. Réalisé sur BioRender.

Potentialiser les effets abscopaux serait alors un moyen plus subtil d'utiliser la radiothérapie. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'activation de l'immunité anti-tumorale a conduit au

développement de stratégies thérapeutiques combinant radiothérapie et immunothérapie (Bright & Kadhim, 2018).

La preuve de concept est donnée en 2015 par l'équipe de Formenti qui a associé des injections de GM-CSF, facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages qui active les DC, à un protocole de radiothérapie fractionnée. Parmi les 41 patients présentant des tumeurs solides métastatiques traitées par l'association GM-CSF/RT, 27% ont montré un effet abscopal sur leurs métastases après 8 semaines alors qu'un traitement au GM-CSF seul n'induisait aucun effet (Golden et al., 2015). Malgré une stimulation du système immunitaire, les effets abscopaux ne sont donc pas systématiques et les potentialiser nécessite une excellente maîtrise de la balance immunoactivation/immunosuppression.

2.3 Effets indésirables de la radiothérapie

En clinique, la radiothérapie est à l'origine d'événements localisés et systémiques mais dont les effets ne sont pas limités aux cellules tumorales. La radiothérapie provoque ainsi des effets indésirables généraux comme l'asthénie et l'amaigrissement, mais aussi des lésions dans les tissus se trouvant dans le champ d'irradiation (Sun et al., 2014).

En effet, les rayonnements ionisants ne sont pas sélectifs des cellules tumorales. Les photons, qui déposent progressivement de l'énergie à mesure qu'ils interagissent avec la matière, occasionnent des lésions dans les tissus sains situés en amont et en aval du volume irradié. Le dépôt initial d'énergie est élevé et s'atténue avec la profondeur et la densité des milieux traversés (Figure 13). Les effets indésirables occasionnés par ce dépôt de dose peuvent être à incidence aléatoire (effets stochastiques) ou obligatoire (effets déterministes) en fonction de la dose et de la sensibilité du tissu.

Les **effets indésirables stochastiques** ont une incidence aléatoire, mais leur probabilité d'apparition est proportionnelle à la dose reçue. Ils sont la conséquence à long terme d'une instabilité génomique et des mutations génétiques acquises en réponse à l'irradiation. Les effets stochastiques regroupent les risques héréditaires et le risque de développer un cancer. Le risque héréditaire n'a jamais été montré chez l'homme. Par contre, les études épidémiologiques montrent une augmentation du risque de développer un cancer pour des doses de RI entre 50 mGy et 2-3 Gy (débit de dose aigu). Les effets stochastiques sont liés à l'acquisition de mutations et sont principalement associés à la transformation cellulaire. Ces effets peuvent ainsi survenir après une longue période de latence, jusqu'à quelques décennies, sans que leur gravité soit conditionnée par la dose reçue et donc sans effet de seuil (Figure

21). Le développement d'un cancer après exposition aux RI est probabiliste : plus la dose est élevée plus le risque est élevé et il existe une grande variabilité interindividuelle.

Les **effets indésirables déterministes** ont une incidence obligatoire : au-delà d'une dose seuil, ils se manifestent de manière précoce (heures, semaines) ou tardive (mois, années) chez tous les sujets. La toxicité aigüe de la radiothérapie est liée aux phénomènes d'inflammation et de mort cellulaire au niveau des tissus sains et concerne principalement les organes à renouvellement rapide comme la moelle épinière, les muqueuses buccales et intestinales, et l'épiderme. Les érythèmes, les œdèmes et les douleurs ainsi provoqués sont le plus souvent réversibles (Barnett et al., 2009). L'inflammation peut également être responsable d'une toxicité chronique et de l'apparition de séquelles irréversibles, conséquences de fibroses sous-cutanées, pulmonaires ou cardiaques, et de nécroses ostéo-costales. Ainsi, le traitement de tumeurs mammaires par radiothérapie serait à l'origine i) d'une toxicité pulmonaire ayant pour forme des dyspnées, toux, ou encore pneumonies, ii) d'une toxicité cardiaque directe avec une atteinte des artères coronarienne ou du myocarde, ou indirecte avec pour effet une hypertension artérielle pulmonaire consécutive à la fibrose pulmonaire (Benveniste et al., 2019).

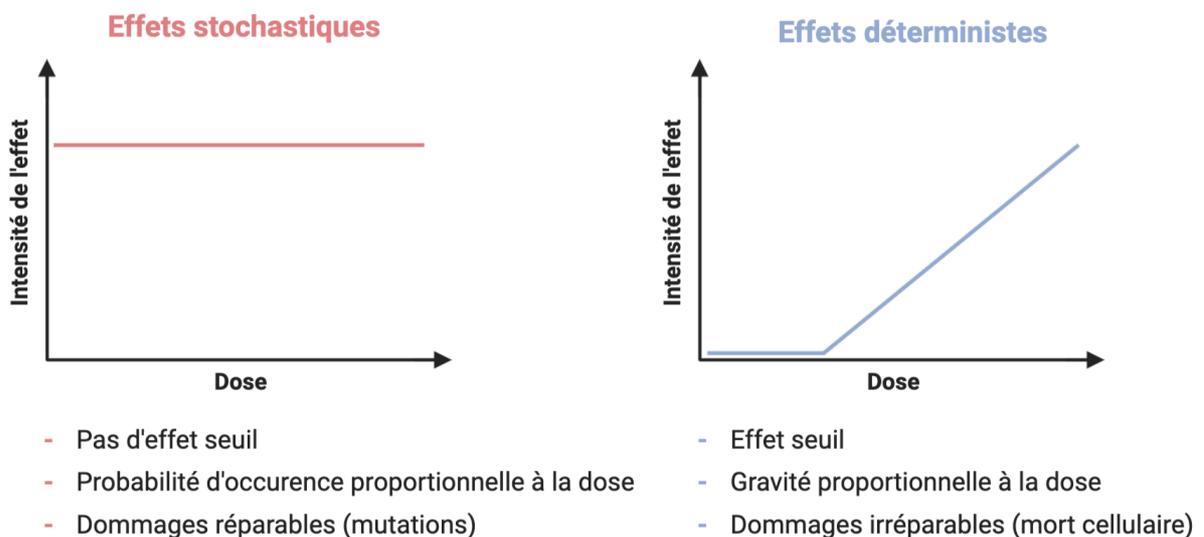


Figure 21 : Intensité des effets indésirables d'incidence aléatoire ou obligatoire selon la dose reçue.

La gravité des effets déterministes dépend à la fois de la dose reçue, mais également de la radiosensibilité des tissus sains irradiés. La relation entre la dose reçue et l'intensité de ces effets est une fonction affine dont le coefficient directeur reflète la sensibilité tissulaire. Plus celui-ci est élevé, plus les conséquences d'une variation de la dose se traduira par un surcroît de toxicité.

L'existence d'une radiosensibilité tissus spécifique a des conséquences cliniques sur la prescription de schémas radio-thérapeutiques. En effet, si toutes les cellules cancéreuses devraient être détruites par des rayonnements ionisants, il est nécessaire de prendre en compte les atteintes possibles aux tissus sains et particulièrement aux organes à risques (OAR) dans le champ d'irradiation. Le principal défi de la radiothérapie est alors de délivrer une dose suffisamment létale aux cellules tumorales tout en préservant les tissus sains. La notion de toxicité acceptable limite alors l'escalade de dose dans le respect d'une balance bénéfice/risque (Arnold et al., 2020).

3. Radio-résistance

Le dépôt d'une dose insuffisante pour éradiquer la tumeur expose à un risque d'échec thérapeutique. Ce risque est renforcé par l'inhomogénéité de la réponse cellulaire au sein de la masse tumorale. En effet, des cellules issues de clones différents, qui présentent des mutations et des propriétés spécifiques différentes, n'auront pas la même réponse anti-tumorale vis-à-vis de la radiothérapie. On parle alors de radiosensibilités différentes (Arnold et al., 2020).

En comparant la survie clonogénique de 36 lignées cellulaires tumorales en réponse à une gamme d'irradiation de 0 à 8 Gy, Fertil et Malaise ont mis en évidence l'existence d'une radiosensibilité cellulaire intrinsèque (Fertil & Malaise, 1981). La radiosensibilité des cellules dépendant de leur capacité à contrôler leur cycle cellulaire, à réparer leur ADN et à activer des voies de mort (Delalogue & Marsiglia, 2005), les mutations affectant ces voies peuvent conférer un avantage significatif qui favorise l'émergence de clones radio-résistants (Aleskandarany et al., 2018). Dans ce contexte, les CSCs, qui ont intrinsèquement des capacités de protection de leur ADN, présentent une radio-résistance accrue. En effet, leur système de réparation est plus efficace (activation des points de contrôle du cycle cellulaire, réparation plus fidèle), leur capacité anti-oxydante est plus élevée (Rycaj & Tang, 2014) et les voies de survie (autophagie, inhibition de l'apoptose) y sont favorisées (Lee et al., 2017). Par ailleurs, les CSC étant quiescentes, elles sont moins sensibles aux thérapies ciblant la prolifération et l'ADN. La probabilité d'éradiquer la tumeur dépend donc de l'atteinte des CSCs et un traitement n'affectant que les clones tumoraux majoritaires ne sera pas suffisant (Figure 22).

Les CSC présentant une radio-résistance innée, la quantité initiale de CSCs est prédictive de la réponse à l'irradiation (Peitzsch et al., 2019). Dans ce contexte, l'irradiation exerce une pression de sélection favorisant l'émergence, la persistance et le développement des clones résistants et agressifs (Arnold et al., 2020). Au-delà de la sélection darwinienne des clones les plus radio-résistants au sein d'une

tumeur hétérogène, la plasticité des cellules tumorales apporte une réponse adaptative aux traitements ce qui leur confère un avantage prolifératif significatif (Santamaría et al., 2019).

Ainsi, l'équipe de J. Lebeau dans notre laboratoire a montré que la transition épithélio-mésenchymateuse induite *in vitro* par l'exposition de cellules mammaires immortalisées (HMLE) au TGF- β exogène générait des cellules plus radio-résistantes. En effet, la population mésenchymateuse (CD44⁺/CD24⁻) résultant de cette EMT a une meilleure survie clonogénique que la population épithéliale (CD44⁻/CD24⁺). L'amélioration de la survie est à la fois le résultat d'un stress oxydatif et de dommages de l'ADN moindres, ainsi que d'une plus grande résistance à l'apoptose (Konge et al., 2018).

La plasticité cellulaire permet l'adaptation rapide des cellules en réponse à des signaux intra- et extra-cellulaires de stress, et la radiothérapie agit sur la reprogrammation cellulaire en activant la transition épithélio-mésenchymateuse. L'irradiation de la lignée cellulaire MCF-7 (épithéliale de phénotype CD44⁻/CD24⁺) à 6 Gy provoque une augmentation de l'expression du TGF- β et de ses récepteurs, de la vimentine mais également un renforcement de l'expression de la E-cadhérine et des occludines. Dans les mêmes conditions, les cellules MDA-MB-231 (mésenchymateuses de phénotype CD44⁺/CD24⁻) irradiées expriment les marqueurs épithéliaux E-cadhérine et occludine sans variation du niveau d'expression de la vimentine. Les cellules irradiées prennent un phénotype épithélial/mésenchymateux (E/M) intermédiaire, enrichi en cellules CD44⁺/CD24⁻. Celles-ci ré-expriment aussi les facteurs de transcription associés aux cellules souches (Sox2, Oct4, Nanog) et ont une plus grande capacité clonogénique (Yadav & Shankar, 2019). L'irradiation répétée des mêmes lignées cellulaires (2 Gy initial puis 0,5 Gy hebdomadaire) génère également un phénotype hybride E/M associé à un aspect morphologique plus fusiforme, à l'expression de la vimentine, à l'augmentation du potentiel d'invasion des cellules épithéliales et de leur survie clonogénique (Gray et al., 2019).

Par ailleurs, le micro-environnement tumoral joue également un rôle dans la radio-résistance. En effet, un développement anormal de la matrice extra-cellulaire limite la diffusion de l'oxygène et conduit à une hypoxie localisée qui restreint la production de stress oxydatif.

La radio-résistance médiée par un micro-environnement hypoxique résulte en partie de l'activation des facteurs induits par l'hypoxie (HIF) qui maintiennent les cellules dans un état de quiescence et d'indifférenciation caractéristique des CSCs. La stabilisation d'HIF-1 favorisant l'autodigestion d'organelles cellulaires dans les lysosomes (autophagie), ce recyclage métabolique permet de récupérer des unités moléculaires primaires et de l'énergie. L'autophagie supporte alors une plus

grande adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie et une meilleure survie cellulaire (Kim et al., 2019).

Enfin, comme illustré figure 17, si un stress oxydatif majeur cause des lésions aux protéines, lipides et aux acides nucléiques, un stress oxydatif modéré est à l'origine d'une adaptation cellulaire *via* l'expression de molécules réductrices et d'enzymes de détoxification. Les cellules situées dans un micro-environnement hypoxique ont donc une capacité accrue à neutraliser des radicaux libres et sont donc moins sensibles aux dommages cellulaires médiées par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et donc à l'irradiation (Arnold et al., 2020).

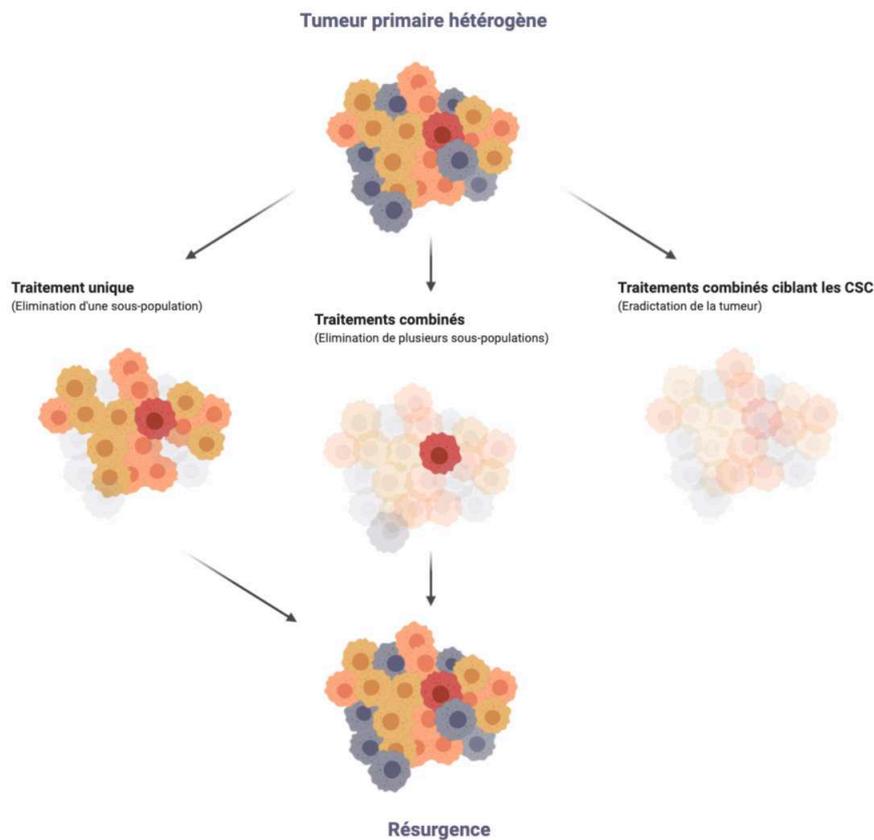


Figure 22 : **Réponse tumorale hétérogène selon la nature et la sensibilité des clones.** Une approche combinée permet d'atteindre plusieurs sous-clones séquentiellement ou simultanément mais la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) résiduelles après traitement expose au risque de résurgence tumorale. Réalisé sur BioRender.

Qu'elle soit liée à l'hétérogénéité tumorale, acquise en réponse à l'irradiation grâce à la plasticité cellulaire ou conditionnée par un micro-environnement tumoral hypoxique, la radio-résistance expose à un risque de métastase et de rechute. L'enrichissement en cellules aux propriétés souches et au phénotype hybride épithélial/mésenchymateux renforce ce risque et la diminution globale de la masse tumorale n'est pas suffisante pour prédire une rémission complète. L'éradication des cellules au potentiel d'initiation de tumeurs devient alors un prérequis pour améliorer le pronostic des patientes.

4. Options thérapeutiques

La plasticité des cellules tumorales favorise l'émergence d'une résistance secondaire aux traitements, ce qui rend les traitements anticancéreux plus complexes et la dose d'irradiation nécessaire à l'éradication de ces tumeurs plus forte (Olivares-Urbano et al., 2020). L'amélioration de la précision du dépôt de dose par des progrès technologiques et l'augmentation de la radiosensibilité des cellules tumorales sont deux approches thérapeutiques développées afin d'élargir l'index thérapeutique et d'optimiser l'efficacité de la radiothérapie.

4.1 Améliorations technologiques et cliniques

Les évolutions technologiques et cliniques ont toutes pour but d'améliorer et d'optimiser la dose reçue dans le tissu tumoral en regard du tissu sain. Il peut s'agir d'améliorations balistique, de nouvelles modalités d'irradiation et/ou de nouvelles sources d'irradiation.

a. Améliorations balistiques

Historiquement, la radiothérapie était réalisée en deux dimensions ce qui provoquait un dépôt irrégulier de la dose dans un volume cible très large (Benveniste et al., 2019) A présent, la **radiothérapie conformationnelle en trois dimensions** (3D-CRT) est la modalité d'irradiation externe la plus utilisée (INCA). La 3D-CRT est couplée à une imagerie par résonance magnétique (IRM) ou à la tomographie par émission de positons (TEP) pour définir au mieux les volumes à irradier et y faire converger les multiples faisceaux. Des contrôleurs multi-lames ajustent ensuite la collimation pour s'adapter aux volumes complexes et préserver les organes à risque.

Dans le traitement de tumeurs de formes irrégulières ou à proximité d'organes sensibles (sphère ORL, moelle épinière), l'intensité des faisceaux est également modulée dans le temps pour délivrer plus précisément la dose prescrite. La **radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité** (RCMI) nécessite l'immobilisation du patient et est réalisée selon une planification inversée : un champ optimal d'irradiation est d'abord défini puis le trajet des faisceaux est simulé pour éviter les organes à risque (Figure 23). En améliorant la précision du dépôt, la dose délivrée au tissu sain et les risques de comorbidités associés sont réduits ce qui facilite l'escalade de dose à la tumeur (Cheung, 2006).

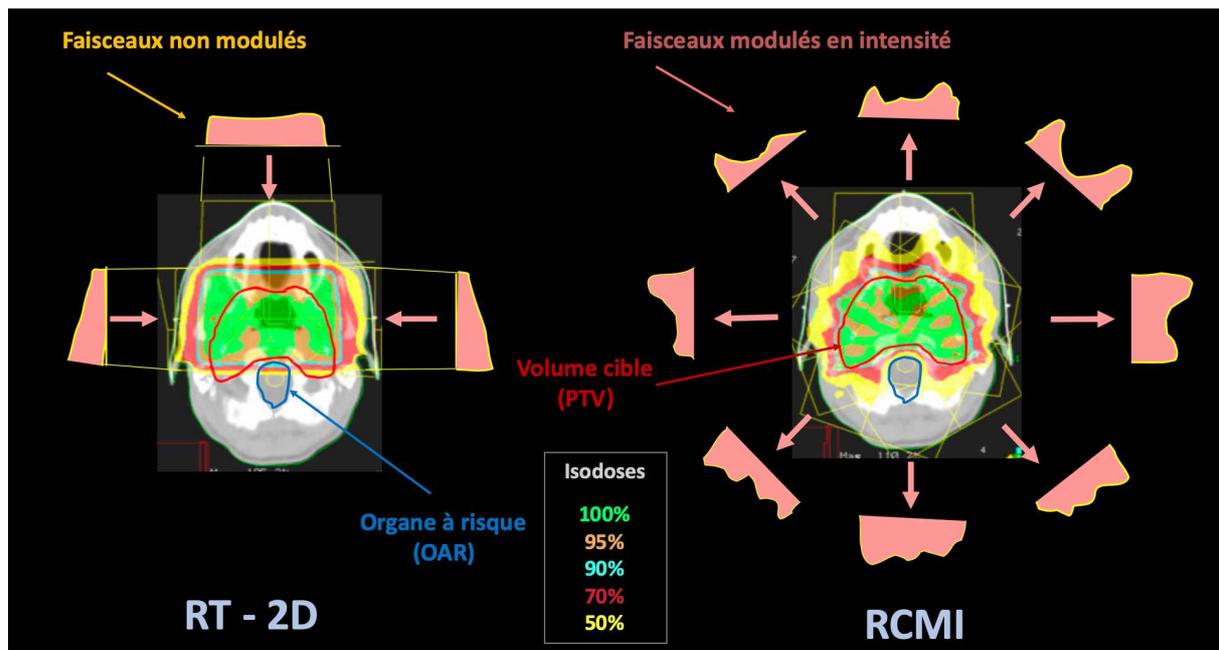


Figure 23 : Comparaison dosimétrique des plans de traitement par radiothérapie conventionnelle en deux dimensions (RT-2D) et par radiothérapie conformationnelle à modulation d'intensité (RCMI). D'après Cheung (Cheung, 2006).

Pour les tumeurs dont la localisation n'est pas compatible avec une radiothérapie conformationnelle, la **radiothérapie stéréotaxique (SRT)** est une modalité d'irradiation de haute précision et de résolution submillimétrique. Aussi appelée radio-chirurgie, elle consiste en l'administration de doses plus élevées avec des marges plus étroites. Un accélérateur à particules est monté sur un bras robotique afin d'émettre de nombreux faisceaux de photons, non coplanaires et convergents à la tumeur. Cette modalité nécessite donc un couplage avec une imagerie en temps réel et une immobilisation parfaite du patient.

b. Nouvelles modalités d'irradiation

La **radiothérapie guidée par l'image** tient compte du mouvement des organes internes et offre la perspective d'une adaptation de l'intensité des faisceaux en temps réel. L'image est passive lorsqu'elle est acquise et reconstruite au cours de la planification de traitements et active lorsqu'elle est acquise en temps réel dans les situations stéréotaxiques de traitement de petites tumeurs ou de métastases. Néanmoins, l'utilisation de la tomographie à émission de positrons conduit à un dépôt de dose supplémentaire qui n'est pas souhaitable. Les systèmes d'accélérateurs linéaires (LINAC) sont alors de plus en plus couplés à des IRM qui fournissent un meilleur contraste et une meilleure résolution sans augmentation du dépôt de dose (Chandarana et al., 2018).

Si l'imagerie aide à la modulation du volume cible et de l'intensité du faisceau au cours du temps pour réduire le dépôt de dose aux tissus sains, l'adaptation des protocoles de fractionnement favorise leur régénération.

Les protocoles de radiothérapie sont prescrits selon le type, la taille, le grade et la localisation des tumeurs. Ils indiquent la dose totale reçue, le débit de dose ainsi que les modalités de fractionnement. Le **fractionnement** est caractérisé par le nombre de fractions, la dose reçue par fraction, la fréquence et l'étalement des séances. Il exploite la réponse différentielle entre les tissus sains non proliférants et les tissus tumoraux à renouvellement rapide. De surcroît, cinq principes influencent la réponse tumorale à une radiothérapie fractionnée. Ils sont historiquement décrits sous la « règle des 5R » (Steel et al., 1989) :

- **Radio-sensibilité** : La sensibilité intrinsèque peut expliquer une différence de réponse à la radiothérapie non seulement entre cellules tumorales et cellules saine mais aussi au sein de la masse tumorale.

Ce paramètre peut être déterminé *a priori* mais les suivants sont évalués en réponse au traitement.

- **Ré-oxygénation** : Les cellules hypoxiques sont plus radio-résistantes, car l'oxygénation est indispensable aux effets des rayonnements ionisants. Les cellules en périphérie de la masse tumorale sont mieux oxygénées et plus donc sensibles à l'action des RI. Un protocole fractionné qui stérilise progressivement la masse tumorale favorise alors la ré-oxygénation graduelle de la tumeur et la radio-sensibilisation qui y est associée.
- **Redistribution** : Les cellules en phase de réplication (phase S) sont plus radio-résistantes que celles en phase de mitose (phase M) ou celles se préparant la division cellulaire (phase G2). En réponse à l'irradiation, les cellules survivantes progressent dans le cycle cellulaire vers des phases plus radio-sensibles. Cette progression s'observe particulièrement chez les cellules cyclant rapidement et/ou pour lesquelles les points de contrôle du cycle cellulaires sont dérégulés. L'accumulation des cellules en phase G2 rend alors les cellules plus sensibles à la fraction suivante.
- **Réparation** : La radio-sensibilité est associée aux capacités de réparation des lésions causées par l'irradiation. Les cellules tumorales sont plus radio-résistantes du fait de la moindre atteinte de leur ADN grâce à leurs défenses anti-oxydantes, mais également de leur capacité à réparer plus rapidement les lésions de leur ADN. En effet, les voies de survie et de prolifération sont préférentiellement activées dans les cellules tumorales au détriment d'une réparation fidèle. En réponse à l'irradiation, l'arrêt dans leur cycle cellulaire est moins prolongé. De ce fait, la pression lésionnelle occasionnée par un

protocole fractionné est en faveur de l'accumulation de dommages létaux contrairement aux cellules normales qui maintiennent l'intégrité de leur patrimoine génétique.

- **Repopulation** : Les cellules tumorales ayant un renouvellement rapide sont susceptibles de poursuivre leur prolifération au cours du traitement. Un étalement trop long des séances de radiothérapie serait alors défavorable au contrôle tumoral.

La redistribution dans les phases plus sensibles du cycle cellulaire et la ré-oxygénation de la masse tumorale sont en faveur d'une sensibilisation progressive de la tumeur au cours d'un protocole fractionné. Néanmoins, la réparation différentielle et la repopulation des cellules tumorales entre les différentes fractions peuvent limiter l'efficacité d'un tel traitement (Olivares-Urbano et al., 2020).

Le protocole classique de fractionnement dans le traitement du cancer du sein est de 2 Gy par fraction, et de 5 fractions par semaine pendant 5 à 8 semaines (Cottu & Delalogue, 2019). Pour pallier une repopulation tumorale trop importante au cours d'un étalement prolongé, le protocole de fractionnement peut être réduit dans la durée et adapté avec des protocoles hypo- ou hyper-fractionnés. L'hypo-fractionnement correspond à l'administration de doses plus élevées et est compatible avec la radiothérapie stéréotaxique. L'hyper-fractionnement consiste en l'administration de plusieurs fractions quotidiennes pour une diminution de la durée totale du traitement et un meilleur contrôle tumoral.

c. Nouvelles sources d'irradiation

L'utilisation de nouvelles sources d'irradiation contribue à l'amélioration de la distribution dosimétrique. En effet, les propriétés des rayonnements particuliers diffèrent de celles des rayonnements électromagnétiques. Possédant une masse et une charge, les particules ont un mode de transfert d'énergie et un pouvoir d'ionisation différents. Leur transfert d'énergie linéique étant élevé, les espèces chargées traversent rapidement la matière et déposent massivement leur énergie en fin de parcours. On parle alors de trace linéaire avec un dépôt d'énergie localisé à une profondeur spécifique du pic de Bragg.

Dans ce contexte, l'**hadronthérapie** qui exploite des faisceaux d'ions accélérés au sein de cyclotrons ou de synchrotrons est une nouvelle forme de radiothérapie. Les particules accélérées sont des protons dans le cadre de la protonthérapie ou des ions carbonés dans le cadre de la carbonethérapie. La précision du dépôt de dose liée à l'existence du pic de Bragg réduit la dose déposée en amont et annihile la dose déposée en aval de la tumeur (Figure 13). La profondeur et la largeur du pic de Bragg

peuvent être modulées afin de s'adapter à la cible anatomique. L'indication principale de la protonthérapie concerne les cancers oculaires, mais elle est également indiquée pour les cancers radio-résistants, inopérables du fait de leur proximité avec des organes vitaux (cœur, rachis, système nerveux central) et/ou pédiatriques. La protonthérapie est pratiquée en France sur le centre d'Orsay (Institut Curie), de Nice (Centre Antoine Lacassagne), de Caen (Centre Cyclhad) et un centre de carbonothérapie est en cours d'installation à Caen.

4.2 Potentialisation des effets biologiques

Les progrès portés par les évolutions cliniques et technologiques, afin d'améliorer la précision du dépôt de la dose aux tumeurs, peuvent ne pas être suffisants pour outrepasser leur radio-résistance.

La radio-protection des tissus sains et la radio-sensibilisation des tissus tumoraux sont les alternatives possibles afin d'améliorer l'index thérapeutique. En effet, pour la même réponse anti-tumorale, la sensibilisation des cellules cancéreuses offrirait la potentialité de diminuer la dose totale délivrée aux tissus sains. Inversement, la protection des cellules saines vis-à-vis des rayonnements ionisants augmenterait leur tolérance et faciliterait l'escalade de dose à la tumeur. Les démarches de radio-sensibilisation visent donc à augmenter la sensibilité des cellules tumorales vis-vis des rayonnements ionisants et de leurs principaux effets biologiques sur le stress oxydatif et l'intégrité du génome.

a. Modifications biologiques

L'**hypoxie** étant un facteur de radio-résistance, plusieurs démarches visant à ré-oxygéner les tumeurs ont été exploitées. Historiquement, l'utilisation de caissons d'oxygène hyperbare pour augmenter les taux sanguins d'oxygène et l'injection intra tumorale d' H_2O_2 n'ont pas démontré d'efficacité clinique. L'intérêt clinique d'agents bio-réducteurs en conditions hypoxiques (HAP pour *Hypoxia activated prodrug*) a ensuite été exploré afin de mimer localement les effets de l'oxygène. Néanmoins, si les résultats précliniques sont encourageants, leur validation clinique est limitée par leur manque de spécificité, de diffusion mais également par le manque de stratification dans le choix des patients (Spiegelberg et al., 2019). A l'inverse, l'utilisation d'anti-oxydants pour des approches de radio-sensibilisation et de radio-protection est également à l'étude. La mélatonine, hormone naturelle aux effets anti-inflammatoires et anti-oxydants, favoriserait la neutralisation du stress oxydatif produit par l'irradiation *via* un effet direct en capturant les espèces réactives de l'oxygène ou indirect en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante (glutathion réduit ou GSH, catalase, superoxyde dismutase ou SOD) (Farhood et al., 2019).

D'autres modifications biologiques affectant principalement les propriétés spécifiques des cellules tumorales peuvent favoriser l'action de la radiothérapie. Ainsi, des stratégies thérapeutiques combinant **chimiothérapie** et radiothérapie sont à l'étude. Par exemple :

- Les taxanes provoquent un blocage des cellules en phase G2/M plus radio-sensible en inhibant la formation des microtubules
- Les agents alkylants bloquent les mécanismes de réparation de l'ADN en limitant l'accessibilité aux protéines de réparations
- Les anti-métabolites limitent la repopulation des cellules tumorales entre deux fractions

Néanmoins, si la modulation de ces paramètres biologiques peut avoir un intérêt synergique sur les effets attendus de l'irradiation, ils peuvent également potentialiser les effets indésirables (Reda et al., 2020).

Par ailleurs, l'existence des sous populations tumorales particulièrement résistantes aux traitements renforce la nécessité d'identifier et de cibler les clones à l'origine de pronostics défavorables (Zardavas et al., 2015). La recherche de voies de signalisation impliquées dans la radio-résistance a permis d'identifier des **cibles moléculaires** dont l'atteinte potentialiserait les effets de l'irradiation. Ainsi les tumeurs triple-négatives mammaires pour lesquelles les récepteurs à l'EGF, au VEGF et au PDGF sont sur-exprimés en surface peuvent être ciblées par des anticorps monoclonaux pour limiter la repopulation cellulaire entre deux fractions (Reda et al., 2020). L'inactivation des voies de signalisation en aval de ces récepteurs par des inhibiteurs de kinases génère également un effet radio-sensibilisant. C'est le cas du regarofenib, inhibiteur multi-kinases qui réduit par exemple la survie clonogénique des cellules tumorales mammaires mésenchymateuses MDA-MB-231 et SUM159 en combinaison avec une irradiation *in vitro* (Mehta et al., 2020).

Au-delà des conséquences biologiques directes de l'irradiation, liées aux interactions rayonnement-matière et au stress oxydatif, la radiothérapie est à l'origine d'une inflammation locale et de l'afflux de cellules immunes à la tumeur (Hu et al., 2017). En effet, la mort immunogénique des cellules irradiées provoque la libération d'antigènes tumoraux mais également de signaux de dangers. Ceux-ci sont nécessaires à l'activation des cellules présentatrices d'antigène pour la présentation d'antigènes tumoraux aux lymphocytes T. Ainsi activés, les lymphocytes T cytotoxiques participent à la réponse anti-tumorale.

La qualité, la quantité et la durée de la réponse immunitaire sont régulées par les principaux points de contrôles immunitaires PD-1, PD-L1, CTLA-4. L'engagement du récepteur **PD-1** (*Programmed Cell Death-1*) exprimé à la surface des lymphocytes T, B, NK et des cellules dendritiques avec son ligand

PD-L1 transmet un signal inhibiteur de l'activation, de la prolifération et de la survie des lymphocytes. L'antigène 4 associé aux lymphocytes cytotoxiques **CTLA-4** exprimé à la surface des lymphocytes T inhibe l'activation des cellules présentatrices d'antigène (Figure 24).

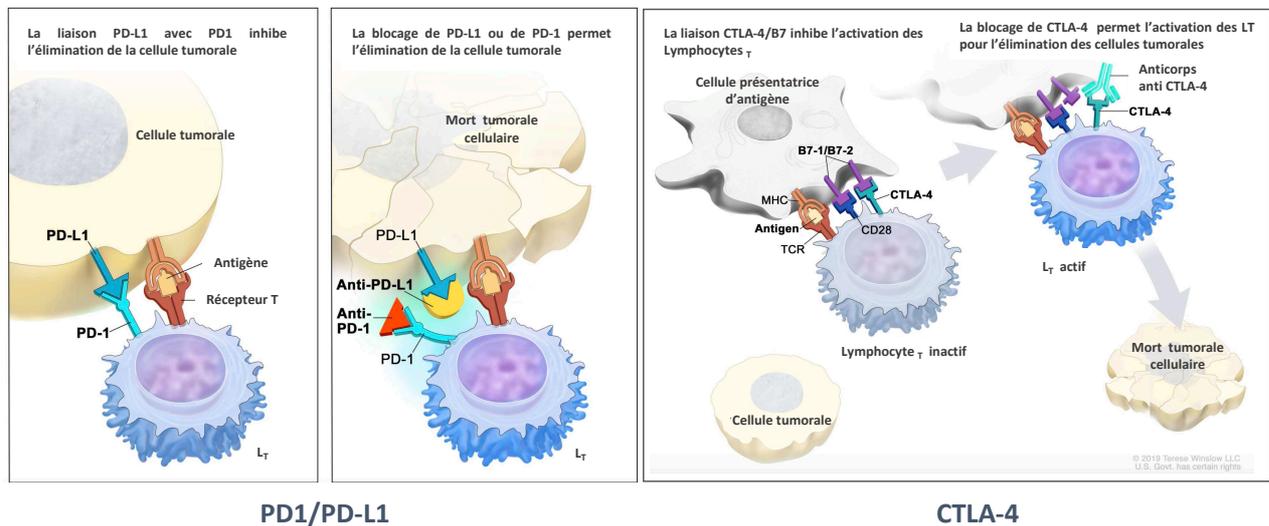


Figure 24 : Mécanisme immunosuppresseur des points de contrôle immunitaires PD-1/PD-L1 et CTLA4/B7 dans un contexte anti-tumoral. D'après National Cancer Institute © Therese Winslow LLC, 2015 et 2019

La stimulation de ces points de contrôle favorise la tolérance immune, et leur sur-expression est un mécanisme de résistance qui contribue au maintien d'un micro-environnement tumoral immunosuppresseur. Par ailleurs, le cancer du sein est peu immunogénique et l'augmentation de l'infiltrat tumoral en lymphocytes T est associé à un meilleur pronostic en terme de survie globale (He et al., 2020). Ces observations ainsi que la découverte de l'importance de la réponse abscopale dans la réponse anti-tumorale justifient l'énergie déployée dans la recherche pour la régulation et l'inhibition des points de contrôle immunitaires.

L'utilisation d'immunothérapies antagonisant ces signaux trouve ainsi un rationnel pour potentialiser les effets de la radiothérapie (Boustani et al., 2019). On parle alors d'immuno-radiothérapie : la stimulation des points de contrôle immunitaires favorise (1) la présentation de l'antigène, (2) l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et (3) leur infiltration tumorale pour action anti-tumorale à la fois locale et systémique (Ye & Formenti, 2018). Des essais cliniques validant l'action d'anticorps monoclonaux dirigés contre PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) et/ou contre CTLA-4 (tremelimumab) sont en cours pour démontrer l'efficacité de la combinaison avec différentes modalités de radiothérapie (Hu et al., 2017).

La réponse aux traitements étant hétérogène, il est nécessaire de définir des biomarqueurs prédictifs de la réponse pour mieux cibler les patients à inclure. En effet, le traitement par immunothérapie seule peut conduire à une hyper-progression chez certains patients (Han et al., 2020) et la radiothérapie peut induire un environnement immuno-modulateur par la sécrétion de cytokines telles que le TGF- β ce qui limite l'intérêt d'un tel double-traitement. Par ailleurs si l'association des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires avec la radiothérapie est prometteuse pour augmenter la réponse anti-tumorale locale et à distance sur les métastases, elle est également susceptible d'en augmenter les effets délétères (Ngwa et al., 2018). L'immuno-radiothérapie nécessite donc de nombreuses optimisations en termes de choix de la molécule, de séquence de traitement, de modalités et de doses d'irradiation (Mondini et al., 2020).

b. Modifications physiques

Un agent est radio-sensibilisant lorsqu'il augmente l'occurrence des effets létaux produits par l'irradiation alors qu'il n'a aucun effet s'il est administré seul. En plus des approches chimiques et biologiques, des approches de modifications physiques sont développées pour potentialiser les effets de l'irradiation. Les nanoparticules de haut numéro atomique (haut-Z) peuvent être utilisées comme agent radio-sensibilisant : inactives en l'absence d'irradiation, leur utilisation permettrait localement d'augmenter les effets de la radiothérapie (Reda et al., 2020).

Il s'agit d'une approche prometteuse dont le principe sera explicité dans le chapitre 3.

Chapitre 3

Nanoparticules métalliques pour la radio-sensibilisation du cancer du sein

NANOPARTICULES METALLIQUES POUR LA RADIO-SENSIBILISATION DU CANCER DU SEIN 77

1.	INTRODUCTION AUX NANOPARTICULES	79
1.1	HISTORIQUE ET DEFINITIONS DES NANOPARTICULES	79
1.2	CLASSIFICATION DES NANOPARTICULES	80
1.3	SPECIFICITE D'ECHELLE	81
a.	Effets de surface	81
b.	Échelle du vivant	82
c.	Effets quantiques	83
1.4	APPLICATIONS BIOMEDICALES DES NANOPARTICULES METALLIQUES	84
2.	NANOPARTICULES METALLIQUES EN ASSOCIATION AVEC LA RADIOTHERAPIE	87
2.1	PRINCIPE DE LA RADIOTHERAPIE POTENTIALISEE PAR DES NANOPARTICULES	87
a.	Effets physiques	87
b.	Effets chimiques	89
c.	Effets biologiques	90
2.2	NANOPARTICULES METALLIQUES EN DEVELOPPEMENT	91
a.	Nanoparticules d'or	91
b.	Nanoparticules à base de gadolinium	93
c.	Nanoparticules à base d'hafnium	94

1. Introduction aux nanoparticules

1.1 Historique et définitions des nanoparticules

Le préfixe nano provient du grec et signifie « nain ». Dans le système international d'unités, le nanomètre (nm) correspond à un milliardième de mètre (10^{-9}) et d'un point de vue biologique, l'échelle nanométrique rencontre donc nombreux éléments : l'atome ($\sim 0,1$ nm), les molécules d'ADN (2 nm) et autres macro-molécules jusqu'aux virus (100 nm).

Le terme « nanotechnologie » est employé pour la première fois en 1974 par le scientifique japonais Norio Taniguchi. Cette appellation lui permet de désigner la conception, la fabrication et l'utilisation de structures à l'échelle nanométrique, alors nécessaires à la mise en place des dispositifs semi-conducteurs qu'il développe. Mais c'est par la mise au point du microscope à effet tunnel en 1981 par les prix Nobel de Physique Gerd Binnig et Heinrich Rohrer, puis du microscope à force atomique en 1985 que l'observation et la manipulation de la matière à cette nouvelle échelle deviennent possibles (Acosta Jimenez, 2016).

S'il s'agit d'une science moderne, les nanotechnologies sont en fait utilisées depuis des milliers d'années sans même que l'Homme en soit conscient. En effet, l'encre de Chine qui associe un pigment noir issu de la combustion d'arbre non résineux ou d'huiles végétales avec de l'eau, correspondrait aujourd'hui à une suspension colloïdale de nanoparticules de carbone dans un milieu liquide. Elle serait donc définie comme une nanotechnologie, alors que le procédé date de près de 4000 ans. Plus tard, les peuples arabes du Moyen-Âge utilisèrent les propriétés de dureté et de résistance des nanotubes de carbone pour la fabrication de leurs sabres. Ignorant la présence de nanomatériaux, les forgerons de Damas ont affiné leur procédé de fabrication afin d'obtenir des lames de meilleure performance. De même, des nanoparticules d'or et d'argent ont coloré les vitraux et rosaces des églises construites en Europe. Leur taille et leur forme variables permirent notamment d'apporter de multiples couleurs aux vitraux de la Cathédrale Notre-Dame de Chartres.

En 1857, Michael Faraday décrit sans le savoir la synthèse de nanoparticules d'or. Il observe que des particules d'or en suspension ont des propriétés optiques différentes selon les conditions d'éclairage et/ou de traitements physico-chimiques. Il ne l'explique que par la présence mélangée de particules d'or de différentes tailles, en différentes proportions et prédit une division extrême de ces particules,

telle qu'elles ne peuvent pas être observées par quelque microscope (Faraday, 1857). Il marque ainsi une transition dans l'appréhension des nanosciences, permettant le passage de la sérendipité à la physique et à la chimie modernes.

Les **nanosciences** étudient l'ensemble des phénomènes observés à l'échelle nanométrique et les propriétés qui y sont reliées. Les nanotechnologies décrivent les techniques permettant la conception, la fabrication et la caractérisation des structures nanométriques. De ces nanotechnologies sont issus les **nanomatériaux** pour lesquels les définitions sont multiples. Nous retiendrons celle émise par la Commission européenne en 2011 qui caractérise « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules dans leur répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm » (Règlement de la Commission européenne n° 696/2011).

On parle d'**agglomérat** si les particules primaires sont faiblement liées entre elles et forment un amas friable pour lequel la surface externe globale correspond à la somme des surfaces des constituants individuels. On parle d'**agrégat** lorsque cette surface externe globale est inférieure à la somme des surfaces individuelles des particules fortement liées entre elles. Cette définition est souvent controversée, jugée à la fois trop large et trop restrictive lorsqu'il peut être considéré que des particules agglomérées pourraient avoir les mêmes propriétés que les particules libres.

Nous prendrons ici comme référence la norme mondiale ISO/TS 80004-2 définie en 2015. Celle-ci reprend les termes de la recommandation de la Commission européenne en ajoutant la notion de structuration interne à l'échelle nanométrique pour la définition de nanomatériaux ou de nanocomposites.

1.2 Classification des nanoparticules

Les nanoparticules peuvent être classées selon plusieurs paramètres :

- **Leur source** : On retrouve dans l'atmosphère des nanoparticules d'origine naturelle : biologique (virus et nano-organismes), géologique (issues de l'érosion) ou atmosphérique (éruptions volcaniques), mais également celles générées non intentionnellement par l'homme (particules ultrafines et rejets industriels). On distinguera ces dernières des

nanoparticules manufacturées, produites intentionnellement pour exploiter leurs propriétés physico-chimiques (Jeevanandam et al., 2018).

- **Leur dimension** : Il existe une classification fondée sur l'organisation dans l'espace des nanomatériaux. On différenciera les nanofeuillets (nanofilms ou fibre optique) des nanofils (nanotubes de carbone) et des nanoparticules (dendrimères, points quantiques, fullerènes) dont respectivement une, deux ou trois de leurs dimensions sont à l'échelle nanométrique.
- **Leur nature chimique** : La classification la plus courante pour les nanomatériaux manufacturés repose sur leur nature chimique (Jeevanandam et al., 2018). Ceux-ci peuvent être organiques (issus de la chimie des lipides, des protéines, des sucres ou des polymères), inorganiques (métaux et oxydes métalliques) ou dérivés du carbone (Figure 25).



Figure 25 : Classification des nanoparticules selon leur nature chimique. Réalisé sur BioRender.

1.3 Spécificité d'échelle

Essentiellement du fait de leur petite taille, les nanoparticules possèdent des propriétés qui n'existent pas pour leurs équivalents macroscopiques.

a. Effets de surface

Dans les champs d'application traditionnels, l'essentiel de l'activité d'un matériau est lié à sa nature chimique et à sa structure cristalline. En effet, à une échelle micro- et macroscopique, la proportion d'atomes à la surface des objets est négligeable et n'induit pas d'effet spécifique de surface en regard d'effets massiques (dureté, résistance, etc.). A plus petite échelle, en considérant des particules nanoscopiques, la proportion d'atomes à la surface des particules augmente considérablement lorsque leur taille diminue : le rapport surface/volume augmente (Figure 26). Comme les atomes situés en surface se trouvent dans un environnement différent de ceux de cœur, en contact direct avec les milieux ambiants, ils vont présenter des propriétés différentes. De fait, seuls ces atomes sont susceptibles d'interagir avec le milieu environnant et ils seront responsables de la réactivité des

particules. La réactivité chimique des nanoparticules est donc proportionnelle à leur surface spécifique.

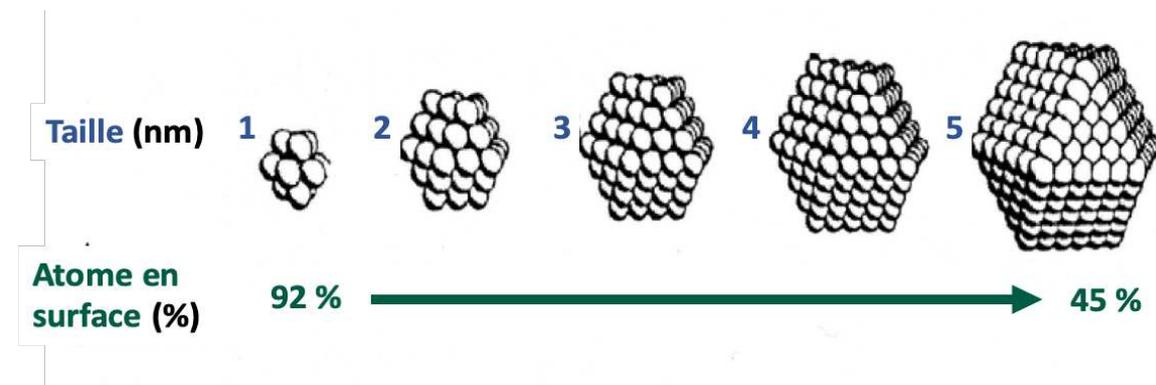


Figure 26 : Proportion des atomes en surface des nanoparticules en fonction de leur taille.

On peut alors considérer que plus les nanoparticules sont petites, plus elles sont thermodynamiquement instables et réactives. La prévalence de ces phénomènes de surface en regard de la masse du matériau justifie l'intérêt croissant des industriels pour les éléments à cette échelle. Mais si la réactivité chimique peut être exploitée pour des applications en catalyse, elle peut également occasionner des toxicités.

b. Échelle du vivant

La dimension des nanoparticules les place à une échelle privilégiée favorisant leurs interactions avec les systèmes cellulaires et moléculaires. Les nanoparticules se retrouvent à la taille des biomolécules telles que les protéines, les sucres et les acides nucléiques (Figure 27). Les conséquences de ces interactions facilitées peuvent être à l'origine d'effets délétères ou bénéfiques.

Les structures biologiques, molécules, virus et bactéries ont évolué au cours du temps pour atteindre des formes et une chimie soutenant leurs interactions et leurs fonctions (Albanese et al., 2012). Par la facilité à synthétiser des nanoparticules de forme et de taille contrôlées, il est possible de générer des nanoparticules aux structures proches de biomolécules naturelles ou fonctionnalisables avec ces biomolécules, qui leur permettront de mimer le vivant et de soutenir des applications en santé.

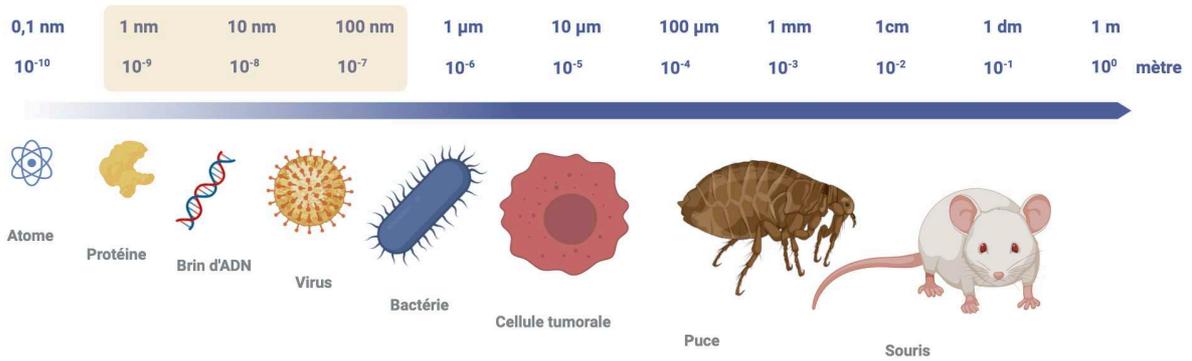


Figure 27 : Dimensions nanométriques au regard du Vivant. Réalisé sur BioRender.

Cependant, les nanoparticules ne sont pas qu'un support inerte, elles peuvent présenter des propriétés propres, liées à la fois à leur taille et à leur nature chimique.

c. Effets quantiques

Les nanoparticules constituent un état intermédiaire entre le matériau brut et l'atome pour lequel la physique quantique dicte ses lois. Cette spécificité est principalement due au confinement quantique des électrons dans les trois dimensions spatiales. Ce confinement électronique est à l'origine de propriétés optiques singulières des nanoparticules avec une absorbance spécifique liée à la nature du matériau. Par exemple, l'or, de couleur jaune à l'échelle macroscopique, absorbe très fortement dans le vert (autour des 500 nm) à l'état nanoparticulaire, ce qui lui confère sa couleur rouge caractéristique.

Ces spécificités d'échelle confèrent aux nanoparticules des propriétés physico-chimiques singulières qui inspirent de nouvelles applications (Horikoshi & Serpone, 2013) :

- Des **propriétés optiques** dues à l'absorption plasmonique qui varie selon la taille et la forme des nanoparticules,
- Des **propriétés catalytiques** liées à la grande surface spécifique des nanoparticules (nickel, platine, argent ou or),
- Des **propriétés thermiques et électriques** puisque le point de fusion des métaux diminue avec la taille des nanoparticules,
- Des **propriétés mécaniques** qui permettent de renforcer la dureté d'un matériau sans l'alourdir,
- Des **propriétés magnétiques**, la force magnétique augmentant avec la diminution du diamètre des nanoparticules.

Ainsi, il existe des applications dans de nombreux domaines industriels (secteurs automobile, électronique, cosmétique, agro-alimentaire, etc.) mais également de l'environnement et de la santé (Ricaud & Witschger, 2012).

1.4 Applications biomédicales des nanoparticules métalliques

La dimension des nanoparticules les situant à l'échelle du vivant, il est possible de tirer parti de leurs propriétés spécifiques pour des applications médicales en imagerie, pour le diagnostic et/ou la thérapie (Singh et al., 2018). Ces applications sont d'autant plus importantes et intéressantes que l'échelle nano permet de les associer comme l'illustre le développement de la théranostique qui associe thérapie et diagnostic. Le lecteur intéressé pourra se référer à l'annexe I qui explicite quelques principes d'applications biomédicales de nanoparticules métalliques.

Les applications thérapeutiques des nanoparticules sont principalement liées à leurs propriétés d'échelle. Leur taille les plaçant à l'échelle du vivant, elle favorise les interactions des nanoparticules avec les systèmes biologiques, ainsi que le passage de barrières physiologiques.

Ces propriétés d'échelle sont exploitées afin d'améliorer la vectorisation de principes actifs et leur internalisation par les cellules cibles. En effet, le gain de spécificité d'un traitement vis-à-vis de sa cible permettrait d'améliorer la tolérance clinique à ce traitement en limitant le risque de développer des effets indésirables. Si la toxicité dudit traitement limite une escalade de dose, sa vectorisation améliorerait son efficacité et/ou élargirait sa marge thérapeutique.

L'un des rationnels pour l'utilisation de nanoparticules en cancérologie repose sur l'augmentation de la perméabilité et de la rétention (EPR ou *Enhanced Permeability and Retention*) au niveau tumoral. L'EPR est initialement décrit *in vivo* en 1986 par Matsumura et Maeda qui imputent l'accumulation tumorale passive de macro-molécules à une hyper-vascularisation et à un défaut de clairance par les systèmes sanguins et lymphatiques (Matsumura & Maeda, 1986). L'accumulation tumorale des nanoparticules par EPR est illustrée sur la figure 28. Comme la croissance tumorale s'accompagne d'une angiogenèse rapide et incomplète, les vaisseaux fenêtrés et la discontinuité de la membrane basale sont à l'origine de la formation de larges pores qui favoriseraient alors l'extravasation des nanoparticules (Bazak et al., 2014).

Chez la souris, les tumeurs croissent rapidement jusqu'à atteindre 10% de leur volume corporel total. Dans ce contexte, la néo-angiogenèse produit des vaisseaux dont les pores peuvent atteindre 1000

nm, et la probabilité d'accumulation tumorale des nanoparticules peut atteindre cinquante fois celle des tissus sains (Z. Cheng et al., 2012). Cependant, bien que clairement décrit chez le petit animal, la véracité clinique du concept d'EPR est incertaine. Chez l'Homme, plusieurs facteurs sont susceptibles de limiter l'EPR. D'une part, les vaisseaux sont répartis de manière hétérogène au sein des tumeurs, leur fenestration n'est pas régulière et les péricytes à la base de l'endothélium vasculaire sont plus nombreux. D'autre part, les micro-environnements tumoraux humains et murins diffèrent fortement. La matrice extra-cellulaire est beaucoup plus abondante chez l'Homme et s'oppose à la diffusion des nanoparticules avec une pression intra-tumorale intense.

Ainsi, on estime que chez l'Homme, l'EPR offre une spécificité modeste avec une accumulation des nanoparticules à la tumeur seulement deux fois plus élevées que dans les autres organes (Nakamura et al., 2016). De plus, une étude récente suggère que 97% des nanoparticules d'or (15, 50 ou 100 nm) localisées dans les tumeurs après injection intraveineuse sont le résultat d'un transport actif au travers des cellules endothéliales et non le résultat d'un simple transport passif (Sindhwani et al., 2020).

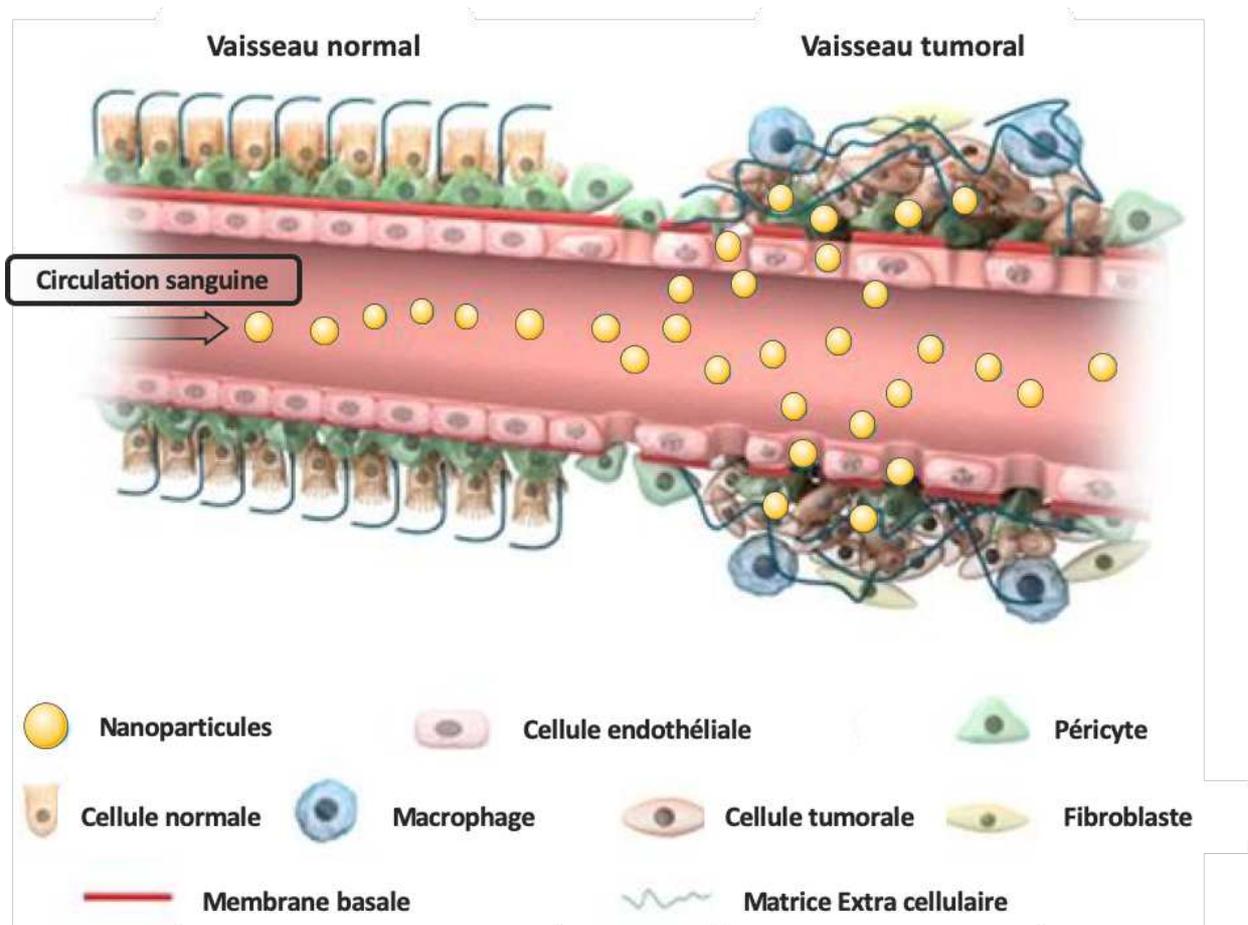


Figure 28 : Principe de l'Enhanced Permeability and Retention effect (EPR). D'après Abdalla (Abdalla et al., 2018).

Toutefois, la connaissance de ces paramètres ouvre la réflexion à de nouvelles stratégies de développement pour l'optimisation de l'accumulation préférentielle des nanoparticules au niveau tumoral, qu'il s'agisse de médiateurs de la perméabilité vasculaires tels que l'acide nitrique, la bradykinine, les prostaglandines (Maeda et al., 2015) ou de stratégies de vectorisation active.

La plupart des cellules cancéreuses sur-expriment à leur surface des biomarqueurs qu'il est possible de cibler afin d'y adresser spécifiquement un traitement (Figure 29.A). La manipulation de la chimie de surface des nanoparticules favorise les possibilités de conjugaison avec des ligands spécifiques de ces biomarqueurs tumoraux. Il peut alors s'agir d'aptamères, de peptides ou d'anticorps monoclonaux (Figure 29.B). Parmi les biomarqueurs des cellules tumorales mammaires, on retrouve notamment HER2, EGFR ou CD44 qu'il est possible de cibler par une fonctionnalisation respective du trastuzumab, cetuximab ou encore de l'acide hyaluronique.

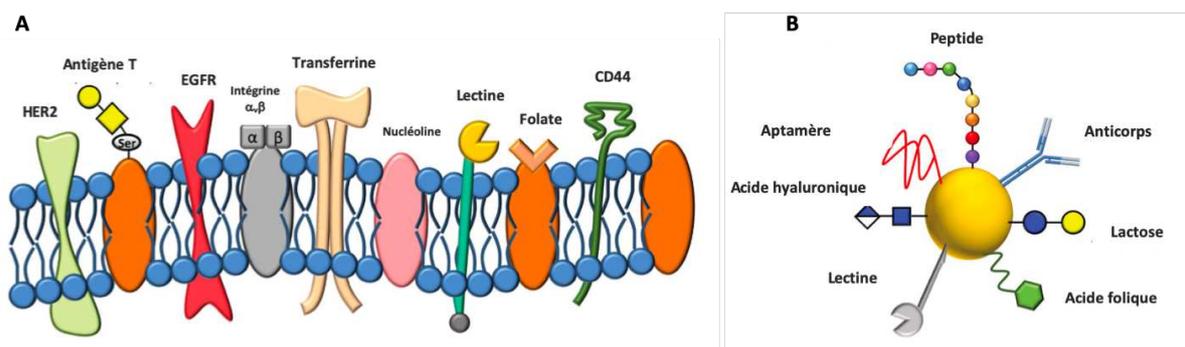


Figure 29 : Représentation schématique d'une membrane cellulaire (A) sur-exprimant des récepteurs pouvant être utilisés comme marqueurs des cellules cancéreuses et (B) d'une nanoparticule d'or fonctionnalisée avec des ligands couramment utilisés pour cibler des cellules cancéreuses. D'après Calavia (Calavia et al., 2018).

Les nanoparticules organiques sont les plus avancées cliniquement pour la vectorisation de principes actifs. La plupart des médicaments autorisés concernent des formulations lipidiques comme les liposomes de doxorubicine (Doxil[®]) ou de vincristine (Marqibo[®]), ainsi que des formulations protéiques comme la paclitaxel liée à l'albumine humaine (Abraxane[®]) (Farjadian et al., 2019). Plus limitées dans leur translation clinique, les nanoparticules métalliques apportent aussi des solutions pour le transport de principes actifs. C'est le cas des polymères de coordination (ang : MOF pour *Metal-Organic Framework*) dont la structure poreuse permet l'encapsulation ou l'adsorption des principes actifs à vectoriser et dont la libération peut être conditionnée à des facteurs environnementaux endogènes (pH) ou exogènes (température) (Y. Wang et al., 2019).

Au-delà de leurs dimensions qui favorisent le transport de principes actifs, les nanoparticules métalliques ont des propriétés intrinsèques complémentaires qui participent au développement de nouvelles approches thérapeutiques, notamment en thérapie photo-thermique (PTT) (annexe I) ou en radiothérapie (RT).

1. Nanoparticules métalliques en association avec la radiothérapie

1.1 Principe de la radiothérapie potentialisée par des nanoparticules

Historiquement, l'effet radio-sensibilisant des matériaux de haut numéro atomique (haut-Z) est empirique. Il a été observé suite à des angiocardigraphies par imagerie X, réalisées chez des enfants préalablement injectés avec un produit de contraste iodé. Ces enfants présentaient alors une lymphotoxicité qui n'était pas observée en réponse à l'injection du produit de contraste seul. Suite à ce constat, l'équipe de Matsudaira a mis en évidence une génotoxicité du double-traitement par produit de contraste iodé et par irradiation X sur des lymphocytes murins en culture. L'augmentation des cassures simple-brin et du nombre de micronoyaux a alors été associée à l'augmentation d'un dépôt de dose physique principalement par le biais d'effets photoélectriques (Matsudaira et al., 1980).

a. Effets physiques

Initialement, le rationnel d'utilisation de matériau de haut-Z pour des approches de radio-sensibilisation repose donc sur le principe physique d'augmentation locale du dépôt de dose. En effet, comme le dépôt de dose dépend de la capacité du tissu à absorber les rayonnements incidents, augmenter artificiellement la densité d'un tissu par l'utilisation d'atomes lourds est une piste prometteuse. Dans ce contexte, les nanoparticules, dont la taille est compatible avec une diffusion tissulaire et dont la surface spécifique favorise l'occurrence d'effets de surface au regard de la masse, sont une solution attrayante.

L'effet physique sur lequel repose la radiothérapie potentialisée par les nanoparticules de haut-Z est relatif aux interactions différentielles des rayonnements ionisants avec les tissus majoritairement composés d'eau et avec les tissus densifiés par la présence de ces nanoparticules (Figure 30). Le cortège électronique est d'autant plus dense que le numéro atomique d'un atome est élevé ce qui augmente d'autant la probabilité d'interactions de photons incidents avec la matière.

Au cours de ces interactions, l'énergie des photons incidents est transmise à la matière. L'énergie est alors soit diffusée sous forme de photons de fluorescence, soit absorbée totalement ou en partie par un électron. De la même manière que décrit dans le chapitre 2, partie 1.2, si l'énergie du photon incident est supérieure à l'énergie de liaison de l'électron rencontré, ce dernier est éjecté sous forme de photoélectron ou d'électron Compton (Kwatra et al., 2013).

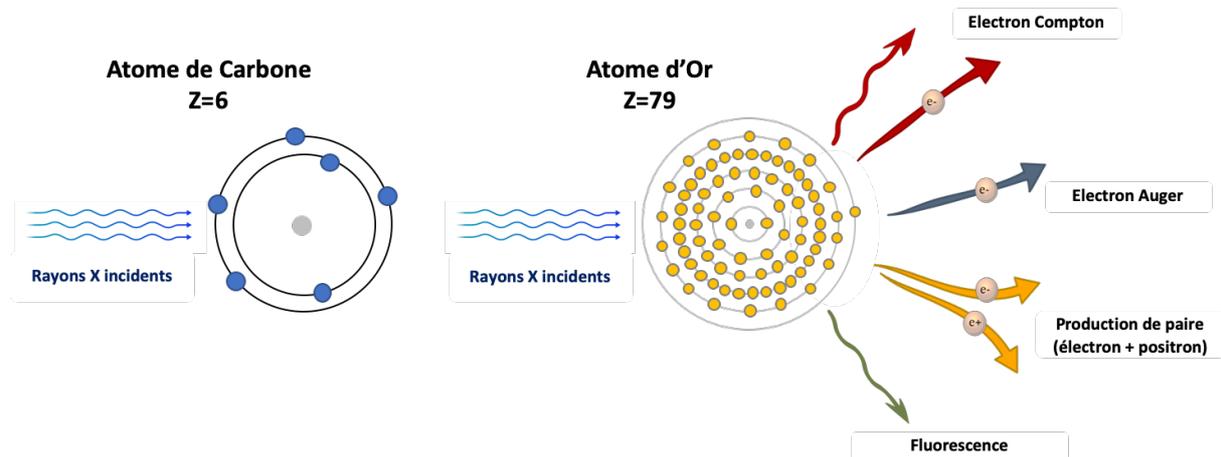


Figure 30 : *Interactions rayonnements-matière des atomes de haut numéro atomique.* La probabilité d'interaction de photons incidents avec des atomes augmente avec le numéro atomique. Inspiré de Kwatra, Venugopal et Anant (Kwatra et al., 2013).

Lorsqu'une vacance est laissée dans les couches internes du cortège électronique, celle-ci est comblée par un électron d'une couche plus externe, ce qui libère de l'énergie sous forme de fluorescence ou d'électrons Auger. Les électrons Auger produits ont une énergie plus faible et ont donc un court trajet, ce qui conduit à un dépôt de dose localisé.

La section efficace de l'effet photoélectrique est la plus dépendante du numéro atomique de la matière rencontrée. En effet, celle-ci varie selon Z^5 alors que la dépendance des sections efficaces de la création de paires est relative au carré du numéro atomique et que celle de l'effet Compton est nulle. L'utilisation de nanoparticules de haut-Z pour obtenir un dépôt de dose différentiel entre tissu tumoral et tissu sain est donc particulièrement appropriée lors des effets photoélectriques.

Les effets photoélectriques prédominant à faibles énergies, la potentialisation des effets de l'irradiation par des nanoparticules de haut-Z devrait être la plus efficace autour des kilo-électrons volts (keV), comme montré sur la figure 31. Entre 2 et 200 keV, l'absorption différentielle de l'or par rapport à une matière organique est en faveur d'un dépôt de dose différentiel, qui permettrait

d'augmenter plus spécifiquement les dégâts occasionnés aux tissus tumoraux, dont font partie les lésions à l'ADN et/ou de préserver les tissus sains situés dans le champ d'irradiation (Her et al., 2017).

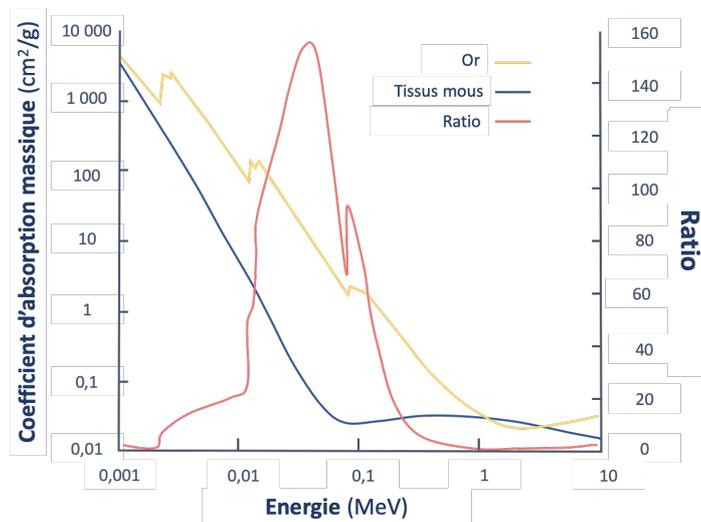


Figure 31 : Comparaison de l'absorption massique de l'or par rapport aux tissus mous. D'après Butterworth (Butterworth et al. 2013).

b. Effets chimiques

Ce principe physique ne semble néanmoins pas expliquer toutes les observations expérimentales. En effet, la forte dépendance de la section efficace de l'effet photoélectrique pour l'énergie des photons incidents et pour le numéro atomique des atomes rencontrés devrait limiter l'effet radio-sensibilisant aux seuls matériaux lourds et aux énergies de l'ordre du keV. Cependant, des nano-diamants hydrogénés, issus de la chimie du carbone, peuvent également potentialiser les effets d'une irradiation gamma à 662 keV (Grall et al., 2015), et des nanoparticules d'or ceux d'une irradiation X à 4 MeV (Mehrnia et al., 2017). Ces données suggèrent l'existence d'autres mécanismes, ne se limitant pas à l'émission d'espèces particulières énergétiques et aux lésions primaires des acides nucléiques, des protéines et des lipides.

Les particules secondairement émises lors de l'interaction des rayonnements ionisants avec des nanoparticules de haut-Z peuvent participer à la radiolyse de l'eau et à la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Par ailleurs, la taille des nanoparticules leur confère une grande surface spécifique susceptible de catalyser le transfert d'électrons et la formation de ces espèces réactives. Comme le stress oxydatif est à l'origine de la majorité des effets liés à l'irradiation, il est supposé comme étant prépondérant dans la potentialisation des effets de l'irradiation par des nanoparticules

(Butterworth et al., 2013). Les mécanismes exacts conduisant à une augmentation du stress oxydatif sont encore mal compris entre un appauvrissement d'espèces anti-oxydantes, un stress endoplasmique ou mitochondrial (Howard et al., 2020).

Par ailleurs, les effets physiques et chimiques ont des conséquences différentes selon le type cellulaire ce qui suggère des effets biologiques singuliers dans la radiothérapie associée aux nanoparticules (Butterworth et al., 2016).

c. Effets biologiques

L'effet potentialisateur de l'irradiation d'une nanoparticule peut être variable selon la nature et le type cellulaire. La donnée la plus fréquemment retrouvée pour comparer l'efficacité du double-traitement en comparaison à l'irradiation seule est le *Dose Enhancement Factor* (DEF). Le DEF correspond au rapport de la dose déposée dans un volume contenant la nanoparticule par rapport la dose déposée dans un même volume d'eau. Il est, entre autres, calculé selon la nature du matériau, l'énergie du faisceau et le coefficient d'absorption massique correspondant. Une étude de K. Butterworth rattache les DEF obtenus par simulation aux résultats obtenus expérimentalement. L'effet alors prédit est systématiquement sous-estimé en comparaison à celui observé (Figure 32) (Butterworth et al., 2012).

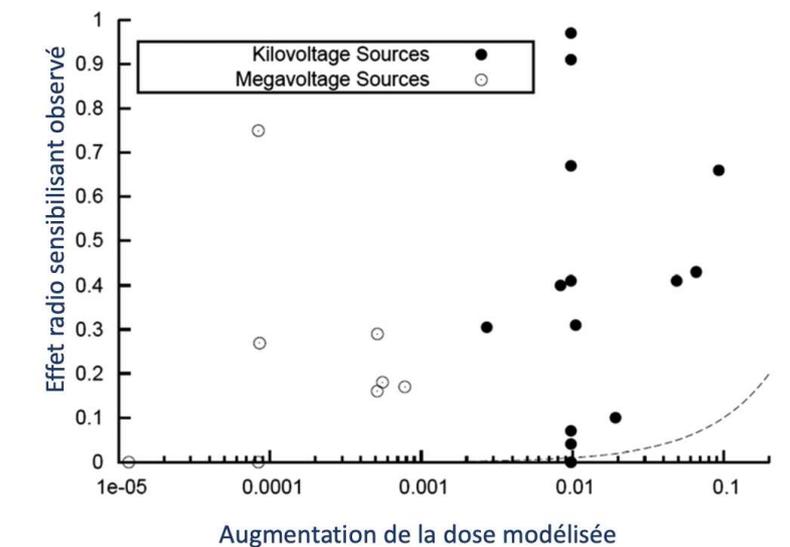


Figure 32 : Comparaison de l'effet radio-sensibilisant de nanoparticules d'or observé expérimentalement avec les valeurs prédites en modélisation. D'après Butterworth (Butterworth et al., 2012).

Cela met en évidence l'importance du facteur biologique dans la réponse au double-traitement. L'augmentation du stress oxydatif intra-cellulaire n'active pas nécessairement les mêmes cascades de réponses biologiques en termes de cassures de l'ADN, réparation de l'ADN, arrêt dans le cycle cellulaire, activation des voies de mort et de survie clonogénique. Par exemple, une augmentation précoce du nombre de cassures double-brins peut être la conséquence de nanoparticules localisées à proximité du noyau, alors que des lésions plus tardives seront plutôt indirectes, résultant d'un stress oxydatif. De même la présence de cassures résiduelles sera plutôt la conséquence d'un défaut des systèmes de réparation que d'un niveau initial de cassures accru (Butterworth et al., 2016).

La probabilité d'observer une potentialisation des effets des rayonnements ionisants est donc difficilement prévisible. Elle est la conséquence de paramètres physiques, chimiques et biologiques propres aux nanoparticules, aux modèles biologiques étudiés et aux propriétés des rayonnements ionisants.

1.2 Nanoparticules métalliques en développement

Sur la base de leurs propriétés physico-chimiques, les nanoparticules de hauts numéros atomiques sont prometteuses pour des applications en radiothérapie. Le choix du matériau dépend en partie des interactions physiques attendues, mais également de son innocuité en l'absence d'activation par les rayonnements ionisants. De nombreux matériaux font l'objet de recherches pour des applications en association avec la radiothérapie dont le Gadolinium (Z=64), l'Hafnium (Z=72), l'Or (Z=79) mais également le Platine (Z=78) ou le Bismuth (Z=82) (Liu et al., 2018).

a. Nanoparticules d'or

Historiquement, l'or est le matériau le plus étudié du fait de sa stabilité et biocompatibilité. La preuve de concept de l'efficacité des nanoparticules en association avec la radiothérapie date de 2004 avec l'étude pionnière de Hainfeld. Suite à la xénogreffe de cellules tumorales mammaires humaines, une injection intraveineuse de nanoparticules d'or (AuNP) de 1,9 nm est réalisée en ou sans association avec une irradiation de 30 Gy. Le traitement seul par les AuNPs n'influence pas la croissance tumorale ; l'irradiation seule ne permet qu'un contrôle partiel du volume tumoral et le double-traitement permet un contrôle tumoral total dès un mois après la co-exposition (Figure 33).

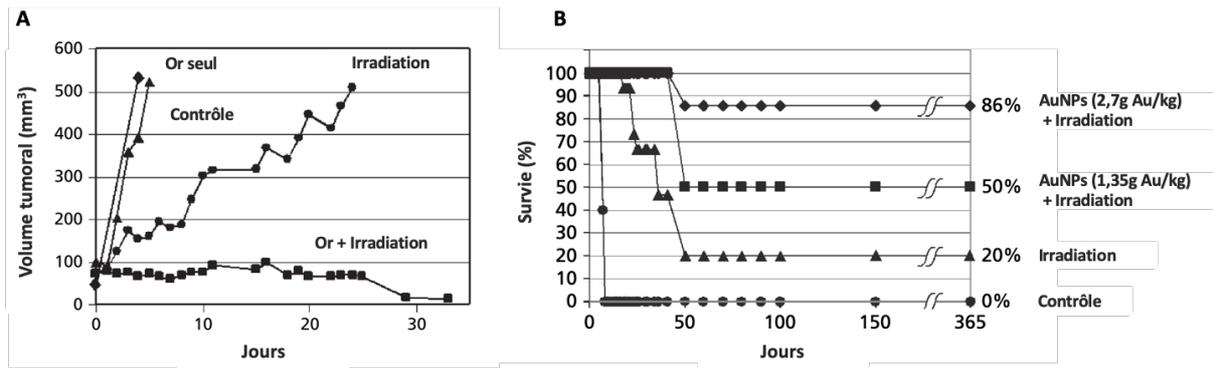


Figure 33 : Étude princeps de l'efficacité de radiothérapie méditée par des nanoparticules d'or de 1,9nm. (A) Suivi du volume tumoral de souris injectées avec des cellules tumorales mammaires humaines, en réponse au traitement AuNPs et/ou irradiation (B) Courbe de survie à 1 an des souris traitées par 2 concentrations d'AuNPs et/ou irradiation. D'après Hainfeld (Hainfeld et al., 2008).

La survie à un an ne montre pas de différence entre les groupes contrôle et le groupe traité aux AuNPs uniquement. Les souris irradiées ont un taux de survie de 20% et le double-traitement apporte un bénéfice dépendant de la quantité d'AuNPs injectées : en doublant la quantité d'AuNPs, les souris passent de 50 à 86% de survie.

Depuis ces travaux pionniers, de nombreuses études sont menées pour évaluer l'influence des paramètres physico-chimiques des nanoparticules (X.-D. Zhang et al., 2012), de leur localisation (Cui et al., 2014), de la nature de l'irradiation (Jain et al., 2011; Polf et al., 2011) ou des conditions oxygènes (Jain et al., 2014) sur l'effet potentialisateur de l'irradiation.

Si l'effet initial a été démontré *in vivo*, les études menées *in vitro* ne suffisent pas encore à détailler un mécanisme d'action de ces nanoparticules en association avec la radiothérapie. Ce manque de compréhension limite actuellement la translation clinique des nanoparticules d'or pour cette application. Certains résultats sont effectivement prometteurs mais il existe une trop forte disparité dans (1) le choix des nanoparticules, (2) des modèles biologiques, (3) des conditions de traitements pour générer des grands principes qui seraient utiles à la Communauté Scientifique. La comparaison inter-études ne permet par exemple pas de mettre en évidence un ordre de grandeur quant à la concentration de nanoparticules nécessaires pour mettre en évidence un effet *in vivo* : les quantités varient de 0,25 à 75 mg par gramme de tumeur (Cui et al., 2017).

Si les nanoparticules d'or ne sont pas encore avancées en clinique, deux nanoparticules à base de métaux sont actuellement testées cliniquement en association avec la radiothérapie : les AGuiX à base de gadolinium et NBTXR3 à base d'oxyde d'hafnium (C. Verry et al., 2019).

b. Nanoparticules à base de gadolinium

Les nanoparticules AGuiX sont développées par la société française NH TherAguix et sont l'acronyme de « *activation and guidance of irradiation by X-rays* ». Il s'agit d'un agent cyclique organique (DOTA) complexant des ions gadolinium. Ces nanoparticules ont une taille inférieure à 5 nm, afin de faciliter le passage de barrières physiologiques et de permettre leur clairance rénale. Développées pour une approche double de thérapie (en association avec la radiothérapie) et de diagnostic, grâce aux propriétés paramagnétiques du gadolinium qui contraste en IRM, les AGuiX se positionnent dans le champ de la théranostique. En effet, pouvoir imager les structures à irradier présente un grand intérêt en termes de positionnement des faisceaux et de suivi de la progression/régression tumorale.

Ces nanoparticules ont été testées pré-cliniquement sur de nombreuses lignées et à des énergies allant du keV au MeV. *In vivo*, l'obtention de l'effet potentialisateur de l'irradiation nécessite entre et 1 et 10 µg par gramme de rongeur (Sancey et al., 2014).

Ces nanoparticules sont actuellement testées en clinique pour le traitement de 15 patients présentant des métastases cérébrales issues de tumeurs primaires différentes. La phase 1 a permis de démontrer la tolérance et la bonne translation clinique de l'accumulation tumorale passive de ces nanoparticules (C. Verry et al., 2019).

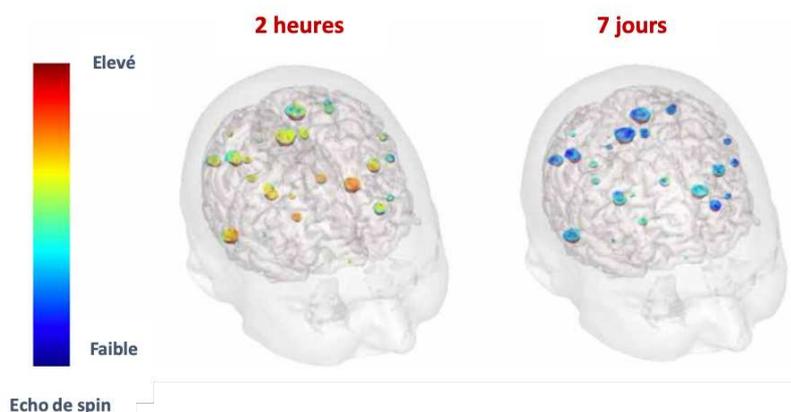


Figure 34 : Reconstruction 3D de l'IRM cérébrale 2 heures et 7 jours après l'injection intraveineuse de 100 mg/kg d'AGuiX. D'après Verry (Camille Verry et al., 2019).

En effet, l'injection intraveineuse d'une dose d'AGuiX a permis d'imager par IRM et de reconstruire les métastases 2 heures et jusqu'à 7 jours suivant l'injection (Figure 34). La rétention prolongée des nanoparticules devrait aider à la programmation de la radiothérapie, mais également d'en potentialiser localement les effets.

D'autres essais cliniques sont en cours, notamment pour les indications du cancer de l'utérus et celui du pancréas, mais aucun n'a encore eu l'occasion de démontrer l'efficacité des AGuiX comme agent potentialisateur chez l'Homme.

c. Nanoparticules à base d'hafnium

Les nanoparticules les plus avancées cliniquement sont les nanoparticules d'oxydes d'hafnium (HfO_2), développées par la société française Nanobiotix. L'hafnium est un métal de transition et ces nanoparticules sont formulées sous une forme cristalline insoluble de 50 nm afin de potentialiser les effets de l'irradiation : NBTXR3.

La preuve de concept est publiée dans une étude de 2012 qui corrèle des données de simulation avec des observations expérimentales obtenues *in vitro* (Figure 35.A). Réalisées pour un faisceau de photons monochromatiques de 200 keV, 1 MeV et de 6 MeV, les simulations Monte Carlo (code PENELOPE) orientent vers un dépôt de dose localement massif (jusqu'à seize fois plus élevé pour une énergie de 200 keV en présence de nanoparticules), alors qu'un dépôt de dose négligeable est relevé dans des conditions de simulation globale qui considèrent une distribution nanoparticulaire homogène. Ces observations sont cohérentes avec la distribution des nanoparticules telle qu'observée sur la figure 35.B, confinées dans des structures cellulaires de type endosomal 12 heures après leur injection intra-tumorale.

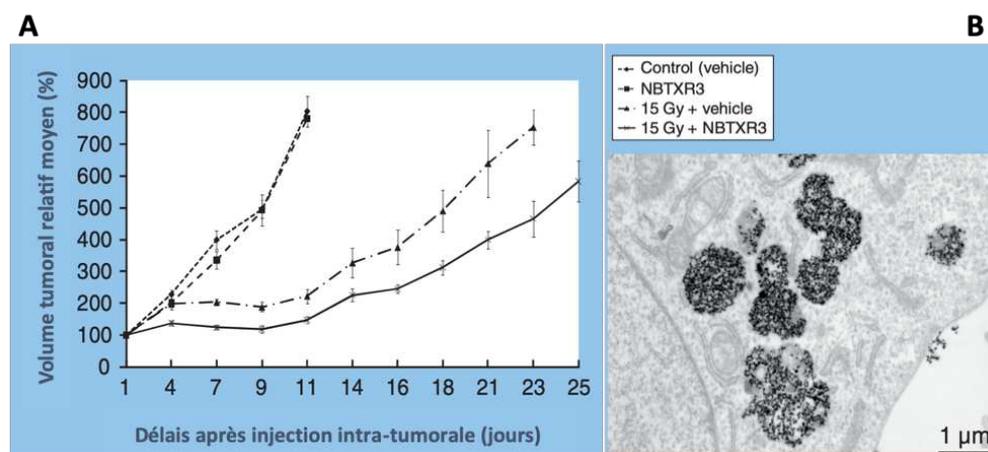


Figure 35 : Données précliniques relatives à NBTXR3 (A) Courbe de croissance du volume tumoral moyen de xénogreffes de cellules tumorales A673 en réponse à une irradiation Cobalt de 15 Gy et/ou à l'injection de nanoparticules NBTXR3 24 heures au préalable. (B) Micrographe électronique à transmission de cellules de fibrosarcomes HT1080 xénogreffées sur des souris nude, 12 heures après l'injection intra-tumorale de 400 µM de NBTXR3. D'après Maggiorella (Maggiorella et al., 2012).

Les expositions menées *in vitro* sur 6 modèles de lignées tumorales cancéreuses, de natures plus ou moins différenciées, montrent une différence d'internalisation des nanoparticules NBTRX3 selon les lignées cellulaires et une diminution de la survie clonogénique en lien avec la concentration d'exposition aux nanoparticules (Marill et al., 2014).

Les études *in vivo* menées sur des souris greffées avec des cellules issues d'une lignée humaine de sarcome d'Ewing montrent un effet bénéfique du traitement par NBTRX3 en association à une irradiation unique de 15 Gy au Cobalt 60, alors que les nanoparticules non activées par la radiothérapie n'ont pas d'effet (Figure 35.A). Ces études précliniques ont également montré une bonne rétention des nanoparticules au sein de la tumeur jusqu'à 14 jours, mais sans suivi au-delà (Maggiorella et al., 2012). Ces observations permettent de positionner NBTRX3 en tant que dispositif médical avec un mécanisme d'action physique, et de lancer ainsi des essais cliniques.

Les essais cliniques de phase 1 ont permis d'identifier les limites du protocole d'injection intratumorale à 10 % du volume du sarcome traité (Bonvalot et al., 2017). Les phases 2 et 3 visaient à démontrer l'efficacité de NBTRX3 associé à un protocole de radiothérapie de 50 Gy en 25 sessions, préalablement à la chirurgie. Le double-traitement, qui n'a pas causé de toxicité majeure, a permis de passer de 8 à 16% de réponse complète et d'assainir d'avantage les marges avant la résection tumorale (Bonvalot et al., 2019).

Ces nanoparticules ont reçu le marquage CE en 2019 pour le traitement des sarcomes des tissus mous localement avancés. Sous le nom de marque Hensify®, NBTRX3 est le premier produit de la classe des « *radio-enhancer* ». Des essais cliniques sont en cours afin de démontrer l'efficacité de ces nanoparticules contre les cancers pulmonaires avancés, les cancers du pancréas, du rectum, de la prostate et contre les métastases hépatiques.

Néanmoins, si le mécanisme d'action physique est suggéré par le rationnel décrit précédemment, les mécanismes exacts ne sont pas connus. Les essais cliniques les plus avancés actuellement concernent par ailleurs les cancers ORL et visent à démontrer l'intérêt de l'association des nanoparticules et de la radiothérapie avec la chimiothérapie (cisplatine) ou l'immunothérapie (anti-PD1). L'intérêt clinique porté à ces associations suggère l'existence d'un mécanisme d'action non limité à une interaction physique.

Objectifs généraux

La première partie de ce manuscrit nous a permis de mettre en avant les problématiques relatives à l'hétérogénéité tumorale des cancers du sein et ses conséquences sur la réponse clinique aux traitements. En effet, la diversité phénotypique des cellules tumorales mammaires confère aux tumeurs une hétérogénéité biologique à l'origine de résistances thérapeutiques.

La plupart des thérapies anti-cancéreuses cible les cellules proliférantes à renouvellement rapide mais l'existence d'une sous population de cellules souches cancéreuses dotées d'une radio-résistance innée peut être à l'origine de rechutes. En effet, cette population quiescente est également plastique ce qui lui permet de redonner une tumeur dans son hétérogénéité. La radio-résistance peut également être acquise en réponse aux traitements et la transition épithélio-mésenchymateuse est l'un des principaux mécanismes d'échappement. La dé-différenciation des cellules épithéliales fait alors suite à la mise en place d'une reprogrammation épigénétique des cellules tumorales, au cours de laquelle leur morphologie, polarité, jonctions intercellulaires ou contacts/interactions avec la matrice extracellulaire sont profondément remaniés. Les cellules mésenchymateuses présentent alors des propriétés d'invasivité et de migration qui participent à instaurer la cascade métastatique. Dans le cancer du sein, la transition épithélio-mésenchymateuse enrichit les tumeurs en cellules aux propriétés souches. La paire de marqueurs membranaires CD24⁻/CD44⁺ identifie alors une sous-population qui présente à la fois une résistance accrue aux traitements mais aussi une invasivité et une tumorigénicité qui participent au développement de métastases et augmentent le risque de rechute.

La mortalité liée au cancer du sein étant majoritairement liée à la présence de métastases, il est nécessaire de pouvoir éradiquer les cellules qui en sont à l'origine. Toutefois, l'escalade de dose délivrée à la tumeur est limitée par sa toxicité aux tissus sains et dans le traitement du cancer du sein, la présence du cœur à proximité du champ d'irradiation impose de grandes précautions. S'il n'est pas possible d'augmenter les doses d'irradiation par respect d'une balance bénéfice/risque, des approches de traitements combinés sont actuellement développées pour potentialiser localement les effets de la radiothérapie.

Dans ce contexte, les nanoparticules de haut numéro atomique sont décrites comme prometteuses pour un effet radio-sensibilisant. En effet, sur la base d'un différentiel d'absorption massique, la probabilité d'interaction avec des rayonnements incidents augmente fortement avec la densification

Objectifs généraux

de la matière. Ainsi, le dépôt d'énergie augmentera en présence de nanoparticules métalliques internalisées dans les cellules.

Compte tenu que l'hétérogénéité phénotypique est susceptible d'influencer la réponse au traitement par les nanoparticules et que l'hétérogénéité fonctionnelle est susceptible d'influencer la réponse au traitement par l'irradiation, nous nous sommes attachés à systématiquement décrire la réponse au simple- et au double-traitement de populations épithéliales et mésenchymateuses (Figure 36).

L'un des principaux enjeux est alors de s'assurer de l'internalisation des nanoparticules dans nos systèmes cellulaires et particulièrement dans les cellules CD24⁻/CD44⁺ plus impliquées dans la radio-résistance et les phénomènes de rechute. Enfin, le potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules de haut numéro atomique étant principalement décrit *in vivo*, nous avons cherché à en expliciter les mécanismes d'action *in vitro* dont la meilleure compréhension devrait permettre de déterminer les paramètres physico-chimiques et les conditions optimales pour la potentialisation des effets de l'irradiation.

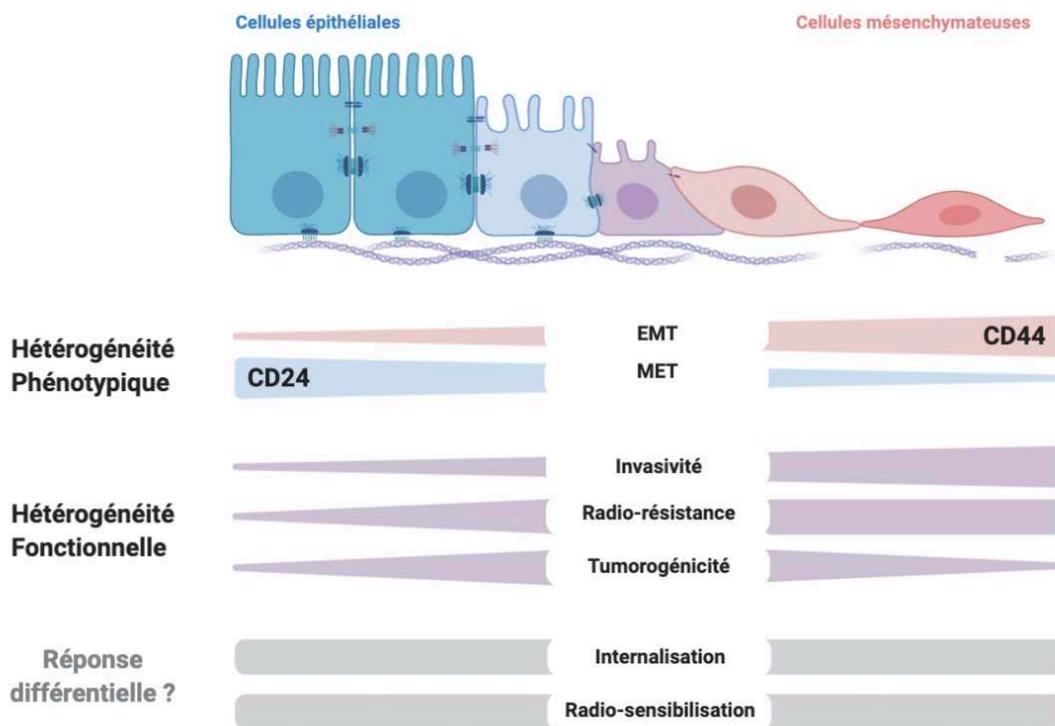


Figure 36: Schéma présentant les principaux enjeux de ces travaux de thèse en étudiant d'une part la réponse différentielle des cellules épithéliales et mésenchymateuses vis-vis du traitement par les nanoparticules seules et d'autre part en évaluant le potentiel radio-sensibilisant de ces nanoparticules en association avec des rayonnements ionisants. Réalisé sur BioRender.

Méthodologies

1. Caractérisation des modèles cellulaires

a. Culture et modèles cellulaires

L'ensemble des cellules est cultivé dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂ et 95% d'humidité et testé régulièrement aux mycoplasmes avec le kit de détection MycoAlert™ (Lonza).

▪ HMLE

Le modèle HMLE de cellules épithéliales mammaires humaines immortalisées a été développé par le laboratoire de biologie du cancer du Dr. Weinberg (Institut Whitehead pour la recherche biomédicale, Cambridge) et nous a été fourni par le laboratoire du Dr. Puisieux (Centre de recherche en cancérologie de Lyon). Les cellules sont cultivées dans du milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 » (DMEM/F12) supplémenté en glutamate (GlutaMAX-1) et complémenté en sérum de veau fœtal (SVF) à une concentration de 10% et d'un mélange antibiotique-antimycotique 100X (Gibco) à la concentration de 1%. Extemporément, le milieu de culture est complémenté par de l'insuline (10 µg/ml), de l'hydrocortisone (0,5 µg/ml) et de l'EGF (10 ng/ml).

La transition épithélio-mésenchymateuse est induite sur les cellules HMLE.E par une exposition au TGF-β1 à 10 ng/ml (BioLegend). Les cellules HMLE.M sont ensuite séparées des cellules HMLE.E par une étape de tri cellulaire basée sur l'expression de CD24⁻/CD44⁺ en cytométrie de flux (trieur BD Influx). Une pression de TGF-β1 à 5 ng/ml est maintenue en permanence dans le milieu de culture.

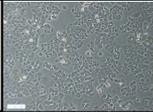
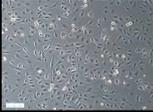
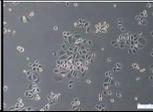
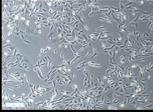
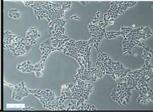
▪ MCF10-A

Les cellules MCF10-A sont des cellules épithéliales mammaires humaines normales immortalisées, cultivées dans du milieu « *Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12* » (DMEM/F12) supplémenté en glutamate (GlutaMAX-1) et complémenté en sérum de cheval (HS) à une concentration de 5% et d'un mélange antibiotique-antimycotique 100X (Gibco) à la concentration de 1%. Extemporément, le milieu de culture est complémenté par de l'insuline (10 µg/ml), de l'hydrocortisone (0,5 µg/ml), de l'EGF (20 ng/ml) et de la toxine cholérique (0,1 µg/ml). La transition épithélio-mésenchymateuse est induite sur les cellules MCF10-A par une exposition au TGF-β1 à 10 ng/ml. Une pression de TGF-β1 à 10 ng/ml est maintenue en permanence dans le milieu de culture.

▪ **Autres lignées tumorales mammaires**

Les milieux de culture des lignées cellulaires utilisées sont décrits ci-dessous :

Tableau 4 : Composition des milieux de culture cellulaire des lignées tumorales mammaires in vitro.

Epthélliales	T47D		DMEM Glutamax - 10% SVF -1% antibiotique/antimycotique	Mésenchymateuses	MDA-MB-157		DMEM Glutamax - 10% SVF -1% antibiotique/antimycotique
	SKBR3		DMEM Glutamax - 10% SVF -1% antibiotique/antimycotique		MDA-MB-436		DMEM Glutamax - 10% SVF -1% antibiotique/antimycotique
	ZR75-1		DMEM Glutamax - 10% SVF -1% antibiotique/antimycotique		MDA-MB-231		DMEM Glutamax - 10% SVF -1% antibiotique/antimycotique
	MCF7		DMEM Glutamax - 10% SVF -1% antibiotique/antimycotique		SUM159PT		DMEM F/12 Glutamax - 5 % SVF -1% antibiotique/antimycotique 0,01 mg/ml insuline - 500 ng/ml hydrocortisone

Parmi leurs caractéristiques, les lignées T47D, SKBR3, MDA-MB-157, MDA-MB-436, MDA-MB-231 et SUM159PT présentent une forme mutée du gène TP53 tandis que les lignées HMLE, MCF10-A, ZR75-1 et MCF-7 expriment sa forme sauvage.

b. Phénotypage membranaire

Les cellules en culture sont décollées à l'aide du TrypLE Express (Thermofisher), centrifugées et comptées à l'aide d'un compteur automatique (TC20, Biorad) en considérant l'exclusion du bleu trypan. Le phénotypage membranaire est réalisé sur 200 000 cellules re-suspendues dans une solution de « Phosphate Buffered Saline » (PBS, Gibco) avec 1% d'albumine de sérum bovin (BSA). Elles sont incubées 15 minutes à 4°C à l'abri de la lumière avec 2 µl d'anticorps couplés à un fluorochrome : CD24 PE 555428 (BD BioScience), CD44 FITC 555478 (BD BioScience) et/ou E-cadhérine APC – CD324 Clone 674A (EXbio). Les cellules sont ensuite rincées au PBS, centrifugées et re-suspendues dans une solution de PBS-1% BSA jusqu'à leur analyse par le cytomètre en flux Novocyte (ACEA Biosciences).

c. Mesure de la surface cellulaire

La surface cellulaire moyenne des cellules est calculée par microscopie automatisée avec le système IncuCyte® (Sartorius, Essen Biosence) qui permet le suivi des cultures cellulaires en temps réel. Les T47D sont ensemencées à 20 000 cellules et les MDA-MB-231, HMLE.E et HMLE.M à 10 000 cellules/puit en plaque 24 puits. Après 24 heures, les noyaux cellulaires sont marqués par l'IncuCyte®

Nuclight Rapid Red (Sartorius, Essen Biosence) à la dilution 1/500^{ème}. Les images en contraste de phase et en fluorescence rouge sont acquises toutes les 2 heures dans 9 champs. La surface cellulaire moyenne est calculée par le rapport de la surface totale occupée par les cellules en contraste de phase par le nombre de noyaux marqués.

d. Analyse des transcrits RT-qPCR

Pour l'extraction d'ARN totaux, environ 1×10^6 cellules sont centrifugées à 300 g pendant 5 minutes et congelées à -80°C sous forme de culots secs. L'ARN total est extrait sur des colonnes « *total RNA purification kit* » (Norgen Biotek Corp, Protégène) conformément aux recommandations du fournisseur. Les échantillons sont traités à la DNase selon les recommandations du kit « Turbo DNA Free kit » (Invitrogen, Ambion). La quantité d'ARN est mesurée par mesure d'absorbance à 260 nm au NanoDrop (Thermo Scientific) et sa qualité est vérifiée par une puce RNA 6000 Nano (Agilent), lue au bioanalyseur. La reverse transcription est réalisée à partir d'1 µg d'ARN avec le kit « *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis* » selon les recommandations du fournisseur (Thermofisher). La réaction se décompose en 3 étapes : l'hybridation des amorces par une pré-incubation de 10 minutes à 25°C, la transcription inverse avec une incubation d'une heure à 42°C permettant la synthèse d'ADNc et la désactivation de l'enzyme par un chauffage à 85°C pendant 5 minutes. Les ADNc sont utilisés extemporanément ou conservés à -20°C.

La q-PCR est réalisée avec mélange de 10 µl de « *iTaq Universal Probes Supermix* » (Biorad) avec 1 µl de sonde, 7 µl d'eau désionisées et 2 µl d'ADNc dans le thermocycleur Applied Biosystem 7300. Les références des amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Référence des amorces utilisées en RT-qPCR (fournisseur Thermofisher).

Assay ID	Gènes	Nom du gène
Hs99999905_m1	GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Hs99999902_m1	RPLPO	<i>Ribosomal protein laterak stalk sous unité P0</i>
Hs01013965_m1	CDH1	<i>Cadhérine 1, E-cadhérine</i>
Hs00185584_m1	VIM	<i>Vimentine</i>
Hs00195591_m1	SNAI1	<i>Snail homolog 1</i>
Hs001075864_m1	CD44	<i>CD44 total</i>
Hs00193435_m1	HAS2	<i>Hyaluronane synthase de type 2</i>
Hs01081473_m1	CD44 S	<i>CD44 isoforme standard</i>

Après activation de l'enzyme à 95°C pendant 5 minutes, 40 cycles d'amplification alternant la dénaturation des brins d'ADN (15 secondes à 95°C) et l'hybridation des amorces ainsi que l'élongation

Méthodologies

(1 minute à 60°C) sont réalisés. Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à deux gènes de référence (GADPH et RPLPO) et l'expression relative des transcrits est exprimée par rapport à l'expression du gène dans la lignée HMLE.E.

e. Immuno-marquage pour la cytométrie en flux

Le marquage en immunofluorescence de la clathrine et de la cavéoline est réalisé sur cellules fixées et perméabilisées. Les cellules en culture sont décollées à l'aide du TrypLE Express (Thermofisher), centrifugées et comptées à l'aide d'un compteur automatique (TC20, Biorad) en considérant l'exclusion du bleu trypan. 500 000 cellules sont ensuite fixées pendant 20 minutes dans une solution de para formaldéhyde à 4% (PFA). Les cellules sont alors centrifugées et lavées 2 fois dans le tampon PermWash™ (BD biosciences) avant d'être perméabilisées pendant 15 minutes à température ambiante dans le PermWash™. Elles sont ensuite centrifugées et marquées avec l'anticorps primaire dilué au 1/200^{ème} dans 50 µl de PermWash™ anti-cavéoline 7C8 (Sant Cruz) ou anti-clathrine pendant 1h10 à température ambiante avant d'être lavées et marquées avec un anticorps secondaire couplé à un Alexa fluor 488 dilué au 1/250^{ème} dans du PermWash™ pendant 1 h à température ambiante. Après deux lavages, les cellules sont reprises dans une solution de PBS-0,5% SVF avant d'être analysée en cytométrie de flux au Novocyte (ACEA Biosciences).

f. Immuno-marquage pour la microscopie

Les marquages en immunofluorescence pour une acquisition d'images en microscopie sont réalisés sur des cellules cultivées sur des lames polymères compatibles (Ibidi) de 4 ou 8 puits.

Pour le marquage par la *Hyaluronic acid binding protein* (HABP), 20 000 HMLE.E et HMLE.M, 30 000 MDA-MB-231 et 120 000 T47D sontensemencées dans des lames 4 puits. Après 72 heures, les cellules sont fixées dans une solution de PFA 4% pendant 15 minutes à températures ambiante. Les puits sont ensuite lavés au PBS et les sites de fixation aspécifiques bloqués par l'exposition des cellules à de la BSA 2% pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont ensuite marquées 1 heure à température ambiante par l'HABP couplée à la biotine (EMD Millipore) diluée au 1/250^{ème} dans la BSA 2%. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont exposées 45 minutes à de la streptavidine couplée à un Alexa fluor 488 (Thermofisher) diluée au 1/500^{ème} dans de la BSA 2%. Après 3 lavages au PBS, les noyaux cellulaires sont marqués par de l'Hoechst 33342 pendant 15 minutes à température ambiante. Les lames sont ensuite imagées au microscope confocal de type « Spinning Disk » (laser à 405 nm pour le Hoechst et 488 nm pour HABP).

2. Traitements appliqués aux cellules en culture

a. Nanoparticules utilisées pour ces études

Les nanoparticules sont des objets singuliers dont le comportement biologique est influencé par leurs propriétés chimiques. La multiplication des modèles de nanoparticules permet d'élargir les observations à des natures chimiques, des tailles, et des chimies de surface différentes conditionnant ainsi quantitativement et qualitativement leurs interactions cellulaires.

La synthèse des nanoparticules d'or AuNP@DTDTPA et AuNP@DTDTPA-Cya5 est réalisée au sein du laboratoire du Pr. Roux à l'Institut Univers, Temps-fréquence, Interfaces, Nanostructures, Atmosphère et environnement, molécules (UTINAM) selon une synthèse inspirée de la méthode de Brust (Jiménez Sánchez et al., 2019). La synthèse des nanoparticules d'or AuNP@PEG-NH₂ est réalisée selon le mode de synthèse de Turkevich au sein de l'Institut de Chimie Physique (ICP) par l'équipe du Pr. Sicard (Gilles et al., 2014). Les nanoparticules de platine PtNP@PEG-OH sont synthétisées selon un mode radiolytique (Salado-Leza et al., 2020) par l'équipe du Pr. Lacombe au sein de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO).

Les nanoparticules de dioxyde de titane NM100 et NM103 proviennent du centre commun de recherche européen (JRC) et ont été caractérisées par de nombreux laboratoires européens afin (European Commission Joint Research Center Institute for Health and Consumer Protection, 2014). Les suspensions de NM100 et NM103 sont préparées selon le protocole harmonisé Nanogenotox, de remise en suspension de ces nanomatériaux à l'échelle européenne (Keld Alstrup Jensen, Yahia Kembouche, Elzbieta et al., 2009). Environ 15 mg de poudre sont pesés dans un flacon à scintillation de 20 ml et pré-mouillés avec 30 µl d'éthanol 96%. La suspension est ensuite préparée à 2,56 mg/ml dans une solution de BSA 0,05% avant d'être dispersée par une sonde directe à 20 % de son amplitude pendant 7 minutes 54 (correspondant à un dépôt d'énergie de 8000 joules). Le flacon de nanoparticules est maintenu dans un bain à refroidissement qui empêche l'échauffement de la suspension.

Les nanoparticules sont ensuite caractérisées en termes de diamètre hydrodynamique dans l'eau et dans leur milieu biologique d'exposition, par des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Ces mesures sont faites à une concentration de 50 µg/ml en moyenne.

b. Exposition cellulaire aux nanoparticules

Les suspensions de nanoparticules sont systématiquement mélangées avant d'être prélevées et sont pré-mélangées au milieu biologique d'exposition cellulaire extemporanément à la concentration désirée. Afin de tenir compte de la sédimentation des nanoparticules dans la considération de la concentration de nanoparticules en contact de la couche cellulaire, nous nous assurons de l'homogénéité de la concentration surfacique quel que soit le support de culture cellulaire. Les équivalences entre concentrations surfaciques et concentrations volumiques sont arbitrairement données pour les plaques 96 puits (Tableau 6.A).

Par soucis de praticité, les concentrations surfaciques $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dans le cas des AuNP@DTDTPA et $32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les AuNP@PEG-NH₂, choisies pour les tests à concentrations uniques, sont régulièrement appelées par leur équivalent volumique en plaque 96 puits (respectivement 25 et 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) alors bien même qu'en plaque 24 puits, ces concentrations réelles seraient respectivement 61 et 122 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tableau 6 : Tableaux de conversion pour le maintien d'une concentration surfacique constante quel que soit le support de culture cellulaire. (A) Tableau d'équivalence des concentrations volumiques et surfaciques pour une exposition en plaque 96 puits ; (B) Tableau d'équivalence des concentrations molaires et surfaciques de PtNPs avec adaptation du volume d'exposition pour le maintien d'une concentration fixe à 0,5 mM ; (C) Tableau de comparaison des concentrations volumiques selon les différents supports de culture pour une concentration surfacique fixée à $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'AUNP@DTDTPA et $32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'AuNP@PEG-NH₂.

A

Concentration ug/ml	Concentration ug/cm ²
1	0,64
10	6,4
25	16
50	32
100	64
150	96
250	160

B

Support	Surface (Cm ²)	Volume (ml)	PtNP	
			Concentration molaire (mM)	Concentration surfacique
Flasque 25	25	7,5	0,5	0,15
Plaque 6 puits	9	2,7	0,5	0,15
Plaque 12 puits	3,6	1,08	0,5	0,15
Plaque 24 puits	1,9	0,57	0,5	0,15
Plaque 48 puits	1,1	0,33	0,5	0,15
Plaque 96 puits	0,31	0,1	0,5	0,16
Lame 8 puits	0,7	0,21	0,5	0,15

C

Support	Surface (Cm ²)	Volume (ml)	AuNP DTDTPA		AuNP PEG-NH ₂	
			Concentration ug/cm ²	Concentration ug/ml	Concentration ug/cm ²	Concentration ug/ml
Flasque 25	25	5	16	80	32	160
Plaque 6 puits	9	2	16	72	32	144
Plaque 12 puits	3,6	1	16	58	32	115
Plaque 24 puits	1,9	0,5	16	61	32	122
Plaque 48 puits	1,1	0,25	16	70	32	141
Plaque 96 puits	0,31	0,2	16	25	32	50
Lame 8 puits	0,7	0,21	16	53	32	107

Dans le cas des nanoparticules de platine, il a été choisi de maintenir une équivalence de la masse molaire afin de pouvoir comparer les résultats biologiques obtenus avec d'autres équipes. Dans le même souci de maintenir une même concentration surfacique, les volumes d'exposition ont alors été modifiés pour maintenir constantes à la fois les concentration molaires et surfaciques.

c. Mesure de l'internalisation des nanoparticules

Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules conditionnent également les méthodes permettant de leur détection et leur dosage intracellulaire. Les techniques disponibles sont multiples et les techniques utilisées sont choisies en regard de la question adressée (qualitative, quantitative, absolue ou relative, etc.) ainsi que du rendement attendu. Le tableau 7 précise les méthodes utilisées pour caractériser l'internalisation des différentes nanoparticules précédemment présentées.

Tableau 7 : Méthodes utilisées pour la détection des nanoparticules selon leur propriétés physico-chimiques. Pt = platine, Au = Or, TiO₂ = Dioxyde de titane.

				Spectrométrie de masse	Microscopie électronique	Microscopie à fluorescence	Microscopie à fond noir	Déviaton SSC - FACS	
Pt	4 nm	PEG-OH	-16 mV	PtNP	+	+	-	-	-
Au	6 nm	DTDTPA-Cya5	-30 mV	Au-Cya5	+	+	+	-	-
	32 nm	PEG-NH ₂	+23 mV	AuNP	+	+	-	-	
TiO ₂	25 nm	Al	+ 5 mV	NM103	+	+	+	-	+
	110 nm	~	-25 mV	NM100	+	+	-	+	

▪ Spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (icp-ms) permet l'identification et le dosage des éléments. Cette méthode destructive est utilisée pour doser la quantité moyenne des nanoparticules internalisées dans les cellules exposées. Au temps voulu suite à l'exposition aux nanoparticules, les cellules sont lavées 2 fois, décollées par le TrypLE Express (Thermofisher), centrifugées et comptées à l'aide d'un compteur automatique (TC20, Biorad). Les cellules sont ensuite

à nouveau centrifugées avant d'être digérée par de l'acide nitrique 16n. La masse de métal dosée par la suite est rapportée au nombre initial de cellules.

▪ **Déviaton du SSC en cytométrie de flux**

Le mesure du signal *Side Scatter* (SSC) en cytométrie de flux nous renseigne sur la complexité et la granulosité cellulaire. Le suivi de la déviation de ce paramètre en réponse à une interaction forte ou à une internalisation des nanoparticules de dioxyde de titane a préalablement été décrite (Zucker et al., 2010). Afin, d'évaluer l'internalisation des nanoparticules de TiO_2 , les cellules sont lavées 2 fois au PBS et une fois au TrypLE avant d'être décollées au TrypLE Express (Thermofisher). L'action de la trypsine est ensuite inactivée par l'ajout de milieu complété. Les cellules sont centrifugées à 300 g pendant 5 minutes et suspendues dans du PBS avant d'être passées en cytométrie de flux au Novocyte (ACEA Bioscience). L'analyse de la valeur moyenne du SSC sur 10000 cellules nous renseigne sur la quantité de nanoparticules internalisées ou très fortement liées aux cellules. Les différentes conditions sont testées en duplicata ou triplicata indépendants et chaque puit est analysé deux fois.

d. Localisation des nanoparticules

▪ **Microscopie à fond noir**

La microscopie à fond noir (dont le principe est illustré sur la figure 37), permet d'imager les structures capables de dévier la lumière soit par leurs propriétés chimiques (nanoparticules de dioxyde de titane), soit par leurs propriétés physiques (nanoparticules d'or).

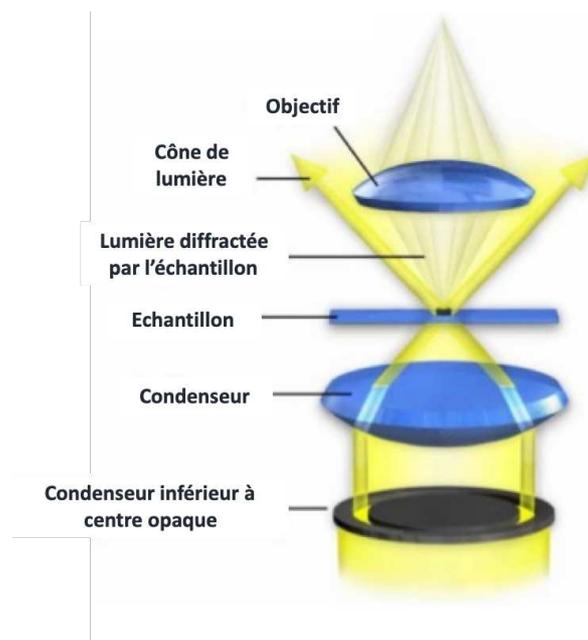


Figure 37 : Principe de la microscopie à fond noir.

En microscopie à fond noir, les rayons sont transmis par un condenseur annulaire avant d'être concentrés sur l'échantillon à imager. Selon les lois optiques, la lumière est transmise sous forme d'un cône lumineux dont les rayons ne pénètrent pas directement dans l'objectif. En l'absence d'éléments diffusant la lumière, l'image transmise est donc noire à l'exception des contours d'objets opaques.

- **Microscopie électronique en transmission**

La microscopie électronique en transmission (MET) permet une analyse structurale des échantillons cellulaires et donc l'identification de structures dans lesquelles se trouvent les nanoparticules en cours ou suite à leur internalisation. Les cellulesensemencées en plaque 6 puis sont exposées aux nanoparticules selon les équivalences relatées dans le tableau 6 avant d'être lavées trois fois au PBS et fixées par un mélange de 2% de glutaraldéhyde à 0,1 M et de sodium cacodylate à pH 8 pendant une heure à température ambiante. Les échantillons sont par la suite contrastés, coupés et imagés.

- **Co-localisation avec Lyotracker**

Les AuNP@DTDTPA fonctionnalisées avec la cyanine 5 sont fluorescentes (ex : 650 nm/ em : 670 nm) et permettent donc d'être imagées par microscopie à fluorescence. Afin d'étudier la co-localisation de ces nanoparticules avec les lysosomes, il est possible de marquer cette structure cellulaire suite à l'exposition aux nanoparticules. Les cellules sontensemencées sur une lame (IBIDI) à 8 puits et laissées à adhérer pendant 48 heures avant d'être exposées aux AuNP@DTDTPA-Cya5 à la concentration de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour 24 heures. Les cellules sont ensuite imagées en temps réel au Spinning Disk par le marquage des noyaux au Hoechst 33342 (1/1000^{ème}) (ex : 361 nm/ em : 500 nm) et lysotracker Green (1/20000^{ème}) (ex : 504 nm/ em : 511 nm). Les cellules sont maintenues dans une atmosphère à 37°C et 5% CO₂. Le lysotracker étant extrêmement cytotoxique, ce réactif est ajouté extemporanément à l'acquisition du puit.

La quantification du nombre de lysosomes est réalisée par cytométrie en flux suite à une exposition ou non aux nanoparticules de titane NM100 et NM103. Suite à l'exposition des cellules pendant 24 heures aux nanoparticules à la concentration de 32 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, les cellules sont lavées, décollées et centrifugées avant d'être re-suspendues dans une solution de BSA 1%. Chaque échantillon cellulaire est alors séparé en deux afin d'avoir son propre contrôle en cas d'interférence des nanoparticules vis-à-vis de la fluorescence du lysotracker green (Invitrogen).

Les cellules concernées sont alors exposées 15 minutes à 37°C au lysotracker avant d'être lavées et passées au cytomètre en flux Novocyte (ACEA Bioscience). L'acquisition de la fluorescence se fait dans le canal FITC (530 nm/30).

e. Traitement à la hyaluronidase

Afin de dégrader l'acide hyaluronique contenu dans la matrice extra-cellulaire, nous utilisons une enzyme une hyaluronidase. Au-delà de la quantité d'enzyme, son activité doit être mesurée. Pour s'affranchir de cette contrainte, nous utilisons la hyaluronidase utilisée en standard de référence pour la pharmacopée européenne (Sigma) et dont l'activité est estimée à 3410 U/ml.

Les cellules T47D, MDA-MB-231, HMLE.E et HMLE.M sont respectivementensemencées à hauteur de 70 000, 50 000 et 40 000 cellules par puit, en plaque 12 puits. Après 24 heures les cellules sont traitées par 200 U/ml de hyaluronidase. Après deux heures d'action, les nanoparticules de titane NM100 et NM103 sont rajoutées directement dans le puit pour une concentration finale de 16 µg/cm² après aspirations/refoulements.

L'influence de la hyaluronidase est déterminée après 24 heures d'exposition aux nanoparticules par la mesure de la déviation du SSC comme précédemment décrit.

f. Irradiation

Les irradiations des cellules ont été réalisées sur un GSR D1 (Gamma Service Medical GmbH), irradiateur auto-blindé contenant 4 sources de Césium 137 émettant des rayonnements gamma. La décroissance radioactive de la source est prise en compte pour les calculs de dose et les échantillons sont irradiés à 2, 4, 6 et/ou 8 Gy avec un débit de dose de 2,7 Gy/min.

Des boîtes 6 puits, 12 puits et des tubes de 1,5 ml sont utilisés comme contenants et une dosimétrie a été réalisée pour ces configurations d'irradiation. Pour cela, nous avons utilisé une chambre d'ionisation 31010 de chez PTW selon les recommandations du protocole TG-61 de l'AIEA. Cette chambre d'ionisation a une cavité sensible de 0,125 cm³ et est étalonnée par le PTB (N° du certificat d'étalonnage : 1904442) en kerma air pour du Césium 137. Chaque mesure a été corrigée en pression et température ; les effets de recombinaison et de polarité ont été pris en comptes.

Les irradiations des tumeurs de souris sont réalisées avec un SARRP (*Small Animals Radiation Research Platform*), tube à rayons X (XSTRAHL, LTD) pour lequel la présence d'un *gantry* permet de réaliser des rotations de -180° à +180° autour de la zone d'intérêt.

Dans un premier temps, la souris est placée sur le dos et, un CBCT est réalisé pour planifier un traitement ciblé sur la tumeur grâce au TPS (*Treatment Planning System*) intégré. Afin d'obtenir un dépôt de dose le plus homogène possible, la tumeur est irradiée avec 2 faisceaux d'irradiation de -45°

et 45°. La taille du champ d'irradiation est adaptée à la taille de la tumeur à irradier par un collimateur modulable (Figure 38).

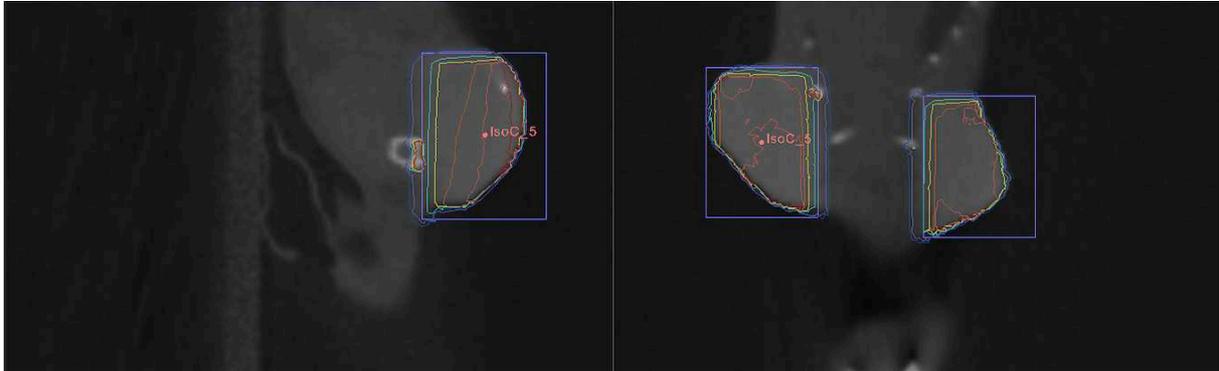


Figure 38 : Coupes sagittale et longitudinale de la région cervicale murine présentant les courbes d'isodoses issues de la planification d'un traitement localisé de 10 Gy.

Chaque tumeur reçoit une dose de 10 Gy avec un débit de dose d'environ 3.64 Gy/min (dépendant de la taille de champ). Pour ces conditions d'irradiation les paramètres sont 220 kV, 13 mA et 0,15 mm de cuivre. Avant d'irradier, un contrôle qualité du tube et du débit de dose quotidien sont effectués selon les recommandations de l'AIEA et du protocole TG-61. Celui-ci est effectué avec une chambre d'ionisation 31010 de chez PTW étalonnée en dose dans l'eau par le PTB (certificat d'étalonnage n°1904445).

3. Études de la réponse cellulaire *in vitro*

a. Mesure de l'impédance des cellules en temps réel

La mesure de l'impédance cellulaire en temps réel est réalisée sur l'*xCELLigence* (ACEA Bioscience) grâce à des microélectrodes d'or intégrées au fond de plaques 96 puits. Elle mesure la résistance cellulaire au courant électrique et se traduit par un index cellulaire, adimensionnel, qui appréhende l'ensemble des activités cellulaires en temps réel, mais sans identifier l'origine de cette modification. Ainsi, la mesure de l'impédance cellulaire mesure en temps réel des variations qui reflètent globalement des modifications quant à la survie, à la mort, à la morphologie, au potentiel de membrane des cellules. C'est une méthode sensible et reproductible.

Méthodologies

Les cellules T47D, MDA-MB-231, HMLE.E et HMLE.M sont respectivementensemencées à hauteur de 15000, 6000, 1500 et 2000 cellules par puit, 24 heures avant l'ajout des nanoparticules. L'impédance est mesurée toutes les 5 minutes pendant 6 heures au cours de la période d'adhésion, puis toutes les 10 minutes jusqu'au traitement par les nanoparticules. Dans le cas du traitement seul par les nanoparticules, une gamme de concentration de 0 à 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ est réalisée avec une acquisition toutes les 5 minutes pendant 6 heures, puis toutes les 10 minutes et une normalisation des index cellulaires au moment de l'exposition aux nanoparticules. Dans le cas du double-traitement, les cellules sont d'abord pré-incubées 24 heures avec les nanoparticules avant leur irradiation à 6 Gy au césium, moment auquel les courbes seront normalisées.

b. Mesure de la survie/mortalité cellulaire

Les expériences de survie mortalité sont menées en triplicata dans des boites 6 et 12 puits. Le nombre de cellulesensemencées initialement dépend du type cellulaire, de la durée anticipée de l'expérience ainsi que du traitement. Il est calculé de façon à atteindre 90% de confluence au moment de l'analyse. Classiquement, les cellules sontensemencées 24 heures avant d'être traitées par les nanoparticules et sont irradiées 6 à 24 heures après le traitement. Après 3 et 6 jours, les cellules sont lavées, décollées au TryPLE, centrifugées en remise en suspension dans un volume fixe de milieu de culture. Elles sont ensuite diluées au 1/5^{ème} dans une solution d'iodure de propidium à une concentration finale de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puis transférées dans une plaque 96 puits à fond rond. Un volume fixe de cette suspension est prélevé au cytométrie de flux Novocyte (ACEA Biosciences), doté d'une seringue de précision lui permettant une mesure absolue du nombre de cellules dans l'échantillon. La distinction entre cellules vivantes et cellules mortes est alors faite par l'intégration de l'iodure de propidium dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire.

Pour les études de survie /mortalité à plus long terme, les cellules sont réensemencées une fois par semaine selon le même raisonnement, permettant de ne pas dépasser une confluence de 90%.

c. Mesures de la survie clonogénique

Préalablement à la mise en œuvre des conditions de survie clonogénique, les cellules sontensemencées en plaque 6 ou 12 puits où elles seront exposées aux nanoparticules le temps et la concentration impartis. Après le traitement, les cellules sont décollées et séparées du TrypLE Express (Thermofisher), centrifugées et comptées à l'aide d'un compteur automatique (TC20, Biorad) en considérant l'exclusion du bleu trypan. Elles sont réparties dans des tubes où elles seront irradiées en

suspension au GSR D1 selon une gamme de dose de 0 à 8 Gy. Avec l'augmentation de la dose, le nombre de cellulesensemencées par la suite dans des boites de pétri de 60 mm est plus conséquent. Le nombre de cellulesensemencées à une dose donnée est le même pour les cellules pré-traitées aux nanoparticules ou non. Les milieux de culture sont changés une fois par semaine. L'essai est arrêté 7 jours après l'ensemencement pour les HMLE.E et les HMLE.M, 14 jours pour les MDA-MB-231 et 28 jours pour les T47D. Les boites de pétri sont alors lavées au PBS, fixées aux PFA 4% pendant 2 heures puis colorées au Giemsa à 10% de volume dans l'eau. Elles sont enfin lavées abondamment à l'eau. Les colonies regroupant plus de 50 cellules sont alors comptées à la loupe binoculaire.

d. Mesures du stress oxydatif

Pour mesurer le potentiel de surproduction d'espèces réactives de l'oxygène par les AuNP@DTDTPA dans un système acellulaire, nous avons mélangé ces nanoparticules à la concentration de 25 µg/ml avec de l'acide coumarique 3 carboxylique (CCA) à 0,5 mM. Nous avons irradié ce mélange une heure au GSR D1 au plus haut débit de dose possible (pour une dose totale de 1132 Gy).

En sortie d'irradiateur, nous mesurons la fluorescence associée à la forme oxydée 7OH-CCA de la coumarine (ex : 330 nm/ em : 450 nm) au spectro-photomètre CLARIOstar Plus (BMG Labtech).

Pour mesurer le stress oxydatif dans nos modèles cellulaires, nous avons choisi la sonde dihydroéthium (DHE, Invitrogen) qui s'oxyde particulièrement au contact de l'anion superoxyde et dont la forme oxydée s'intercale dans l'ADN où elle fluoresce (ex : 535 nm/ em : 610 nm). Comme nous réalisons ce test fluor-métrique sur des cellules adhérentes, il est nécessaire d'avoir un tapis cellulaire des plus homogènes.

Les cellules sont doncensemencées en plaque 96 puits 48 heures avant l'exposition aux nanoparticules. Les cellules sont traitées dans les conditions souhaitées par les nanoparticules et 30 minutes avant l'irradiation, la sonde DHE est ajoutée dans le milieu de culture pour une concentration finale de 10 µM. La ménadione est utilisée comme contrôle positif à la concentration de 50 µM. Les cellules sont ensuite irradiées à 6 Gy et la fluorescence est lue en sortie d'irradiateur. Afin de s'assurer qu'une hétérogénéité cellulaire ne soit pas à l'origine d'une hétérogénéité dans le signal, la fluorescence est acquise selon un mode orbital, plus représentatif.

Des tests d'interférences entre le produit fluorescent de l'oxydation de la sonde DHE, le 7-OH DHE et les nanoparticules sont réalisés dans des conditions acellulaires, en mélangeant des quantités croissantes de 7-OH DHE (de 0 à 250 nM) avec des concentrations croissantes en nanoparticules (de 0 à 25 µg/ml) et acquérant le signal de fluorescence associé.

e. Analyse de la distribution dans le cycle cellulaire

La phase du cycle cellulaire est déterminée par la quantité d'iodure de propidium intercalée dans l'ADN nucléaire. Au moment choisi, les cellules sont décollées à l'aide du TrypLE Express (ThermoFisher), centrifugées et reprises dans une solution de PBS avec une concentration moyenne de 500 000 cellules/ml. Elles sont ensuite fixées au goutte à goutte par l'ajout de 4 volumes d'éthanol glacial et laissées une nuit à -20°C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1000 g pendant 4 minutes et lavées avant d'être marquées par un mélange d'iodure de propidium (0,03 mg/ml) et de RNase (0,05 mg/ml) pendant 15 heures à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées et passées au cytomètre Novocyte (ACEA Biosciences) où leur fluorescence est mesurée dans le canal PE (572 nm/28) suite à l'exclusion des doublets de cellules. La répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire est ensuite calculée par le module « analyse du cycle cellulaire » du logiciel NovoExpress (ACEA Biosciences).

f. Évaluation du stress génotoxique

Le stress génotoxique peut être évalué par l'immuno-marquage des histones γ -H2AX, rapidement phosphorylés en cas de cassures double-brins de l'ADN.

Les cellules sont cultivées sur des lames Millicell™ (Millipore) 48 heures avant tout traitement pour leur laisser le temps d'adhérer. Elles sont ensuite successivement traitées par les nanoparticules et irradiées à 6 Gy au GSR D1 selon le plan de traitement. Après 1, 4 ou 24 heures, les lames sont lavées et fixées au PFA 4% pendant 20 minutes et les cellules sont perméabilisées avec du PBS-Triton 0,1% pendant 10 minutes. Afin de permettre une meilleure spécificité du marquage, une étape de blocage d'une heure dans une solution de PBS-10 % sérum de chèvre précède l'incubation avec l'anticorps primaire anti-phospho-Histone H2A.X (ser139, clone JBW301, Millipore) à 1/500^{ème} dans le même tampon. Après 75 minutes, les cellules sont rincées au PBS-Triton 0,025% et marquées avec un anticorps secondaire couplé à de l'Alexa Fluor™ 488 dilué au 1/500^{ème} dans le PBS-10% sérum de chèvre pendant 1 heure. Les cellules sont ensuite lavées et leurs noyaux sont colorés par un marquage au Hoechst 33342 (1 μ g/ml) pendant 15 minutes. Les lames sont ensuite montées avec du ProlonGold (Invitrogen) et laissées une nuit à polymériser. Les noyaux et les foci sont ensuite imagés au Spinning Disk puis dénombrés par le traitement de l'image réalisé sur le logiciel CellProfiler.

4. Études de la réponse tumorale *in vivo*

a. Xénogreffe des lignées tumorales mammaires

Après une semaine d'adaptation à l'animalerie, les souris femelles SwissNude (Charles Rivers) de 6 semaines sont conditionnées par un irradiation corps entier au ^{137}Cs à la dose de 6 Gy (débit de dose 1,01 Gy/min) afin de prévenir un rejet de greffe. La xénogreffe est réalisée 24 heures plus tard sous anesthésie générale à l'isoflurane. Elle consiste en l'injection sous-cutanée de cellules tumorales mammaires humaines (les cellules mésenchymateuses MDA-MB-231 et HMLE.M, et les cellules épithéliales T47D et HMLE.E) sur les flancs de la souris. Chaque souris reçoit donc deux injections issues de la même lignée tumorale mais ces injections sont d'1 millions de cellules sur un flanc et de 5 millions sur l'autre. Nous considérons 8 groupes de 3 souris recevant respectivement un type cellulaire suspendu dans du PBS ou dans du Matrigel pour une espérance maximale de 6 tumeurs par condition.

A ces fins, les cellules sont décollées de leur support, centrifugées à 300 g pendant 5min puis comptées à l'aide d'un compteur automatique (TC20, Biorad). Elles sont maintenues à basse température et concentrées à hauteur de 1 et 5 millions dans 0,1 ml d'une solution de PBS^{+Ca²⁺+Mg} ou de Matrigel. Les suspensions cellulaires sont injectées au moyen de seringues à insuline.

Au 38ème jour, les tumeurs de MDA-MB-231 sont irradiées localement au SARRP comme précédemment décrit. La croissance des volumes tumoraux est évaluée bis hebdomadairement par la mesure des dimensions tumorales externes au pied à coulisse digital. Le volume considéré est calculé selon la formule « **Longueur * largeur * $\frac{Largeur}{2}$** » et normalisé au moment de l'irradiation.

b. Modèle tumoral mammaire murin

Les souris utilisées sont des MMTV-PYMT (*Jackson Laboratories*) qui développent spontanément des tumeurs mammaires après 3-4 mois. Pour cette étude préliminaire, 3 souris ont servi de contrôle, et 4 autres ont localement été traitées au niveau des tumeurs cervicales qu'elles développaient : 1 souris a reçu le simple traitement par injection intra-tumorale de 25 μl d'AuNP-PEG-COOH à l'aide d'une seringue à insuline, 1 souris a été localement irradiée à 10 Gy au SARRP, 2 souris ont reçu le double-traitement. L'évolution des volumes tumoraux sont par la suite évalués bi hebdomadairement par une mesure au pied à coulisse digital. Le volume considéré est calculé selon la formule « **Longueur * largeur * $\frac{Largeur}{2}$** » et normalisé au moment du traitement.

Quelle que soit la procédure réalisée, les souris sont anesthésiées sous isoflurane.

c. Histologie – Coloration à l'hématoxyline/éosine

Les tumeurs sont prélevées *post mortem* et lavées dans du PBS avant d'être fixées dans une solution de PFA 4% au minimum 24h sous agitation. Les tumeurs sont ensuite incluses en paraffine par le système automatique de préparation d'échantillon « Tissue-Tek® VIP®6, Sakura » qui réalise des bains successifs d'alcool de 70% à 100%, de toluène puis de paraffine liquide. Les blocs de paraffine sont ensuite formés à l'aide de la console d'enrobage « Tissue-Tek, Sakura » dont le refroidissement instantané facilite l'orientation de tumeurs en vue de leur coupe.

Le bloc de paraffine est ensuite coupé en section de 5 µm d'épaisseur au microtome manuel. Les coupes sont dépliées au bain marie avant d'être déposées sur des lames de verre recouvertes de polysine puis séchées 12 heures à 37°C.

Pour leur coloration, les lames sont déparaffinées dans le toluène et progressivement réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de 96% à 70%. Elles sont ensuite colorées par l'hématoxyline de Mayer pendant 2 minutes afin de marquer les structures acides. Les lames sont ensuite rincées à l'eau courante et dans l'eau chlorhydrique avant d'être bleuies par un passage de 5 secondes dans une solution de carbonate de lithium. Les lames sont rincées avec de l'eau courante avant de colorer les structures cellulaires basiques par l'éosine aqueuse à 1% pendant 30 secondes. Enfin, les lames sont progressivement déshydratées des bains successifs d'éthanol de 70% à 100% puis de toluène avant le montage entre lame et lamelle avec de l'Eukitt.

Les coupes sont imagées par microscopie en fond clair et à fond noir (microscope Olympus BX41) à l'aide du logiciel Archimed.

Résultats

1. Potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules

Les numéros atomiques de l'or ($Z=79$) et du platine ($Z=78$) en font de bons candidats pour une approche de radio-sensibilisation. Nous avons donc étudié le potentiel radio-sensibilisant de nanoparticules d'or et de platine sur des modèles de tumeurs mammaires *in vitro* et *in vivo*. Nous nous sommes particulièrement attachés à analyser la réponse de modèles cellulaires associés à différents sous-types histologiques : la lignée T47D de type luminal A et la lignée MDA-MB-231 de type triple-négatif.

1.1 Étude du potentiel-radio sensibilisant de nanoparticules de platine *in vitro* et *in silico*

Le potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules de platine (PtNP) a été préalablement évalué par approches de modélisation physique ou de façon mécanistique sur des plasmides ou des bactéries radio-résistantes. À notre connaissance, aucune étude n'a été menée pour évaluer le potentiel radio-sensibilisant de ces nanoparticules sur des cellules tumorales mammaires. Nous avons donc cherché à mettre en évidence l'effet-Z de PtNP PEGylées en association avec des rayonnements ionisants (RI). Pour cela nous avons évalué le potentiel gain d'une co-exposition RI et PtNP en termes de cytotoxicité, génotoxicité, stress oxydatif, blocage dans le cycle cellulaire et survie clonogénique.

Face à l'absence d'effet significatif du double-traitement par rapport aux RI seuls, nous avons recherché quels paramètres pourraient expliquer l'absence d'effet-Z potentialisant les effets de l'irradiation. Nous avons donc modélisé cet effet-Z (Code Geant4DNA) en tenant compte de nos données expérimentales comme la nature des nanoparticules, la quantité intra-cellulaire internalisée, la localisation et l'état d'agrégation des PtNP ainsi que de la géométrie de l'irradiateur.

Cette modélisation, qui intègre des paramètres expérimentaux biologiques et physiques, nous a notamment mené à considérer l'équilibre électronique pour déterminer les flux incidents de photons et d'électrons susceptibles d'interagir avec les nanoparticules internalisées. Dans ces conditions, la *Dose Enhancement Factor (DEF)* localement attendue à proximité des nanoparticules, en tenant compte de nos conditions expérimentales et des flux de photons et d'électrons qui en résultent, est

Résultats

10 fois plus faible que celle estimée par une approche de modélisation strictement théorique. Ainsi dans la littérature, la DEF est très surévaluée lorsque l'effet-Z est estimé selon des modèles simplistes qui ne considèrent que le numéro atomique du métal et l'énergie du faisceau incident.

Par ailleurs, l'énergie des électrons émis secondairement à l'irradiation des nanoparticules limite majoritairement le dépôt de surdose à un rayon de 100 nm autour de la NP. Les NP étant majoritairement séquestrées dans des lysosomes, les électrons et les espèces radicalaires de l'oxygène générées ne peuvent pas endommager l'ADN nucléaire. Pour affiner l'estimation de la DEF, il nous apparaît maintenant nécessaire de reprendre la modélisation, en tenant compte de cette production d'espèces chimiques à distance du noyau, car ce point est probablement très lié à l'amplitude de l'effet-Z.

Enfin, un autre point qui nécessitera des investigations complémentaires concerne la caractérisation des propriétés chimiques des PtNP. En effet, l'analyse du stress oxydatif généré par l'exposition des cellules aux PtNP, en comparaison avec une exposition à une molécule pro-oxydante (ménadione) associée ou non à une exposition aux PtNP, suggère que nos nanoparticules ont en fait un potentiel oxydo-réducteur bien plus complexe qu'attendu. En effet, l'exposition des cellules aux PtNP seules augmente la production de radicaux hydroxyles mais par contre la présence de PtNP dans la cellule lors d'une exposition à la ménadione diminue fortement le stress oxydatif de la ménadione. Le potentiel oxydo-réducteur de ces nanoparticules et l'influence de leur chimie de surface (PEG) dans la perturbation du stress oxydatif devront faire l'objet d'études plus approfondies pour optimiser la chimie de surface des nanoparticules pour les applications en radiothérapie.



Article

Radiation enhancer effect of platinum nanoparticles in breast cancer cell lines: *in vitro* and *in silico* analyses

Marie Hullo¹, Romain Grall¹, Yann Perrot², Cécile Mathé¹, Véronique Ménard¹, Xiaomin Yang³, Sandrine Lacombe³, Erika Porcel³, Carmen Villagrasa², Sylvie Chevillard¹, Emmanuelle Bourneuf^{1,*}

¹ CEA DRF, IBFJ, IRCM, and University Paris Saclay, Route du Panorama, 92265, Fontenay-aux-Roses cedex, France;

² IRSN, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, BP17, 92962, Fontenay-aux-Roses, France;

³ Université Paris Saclay, CNRS UMR 8214, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, 91405 Orsay, France.

* Correspondence: Emmanuelle.bourneuf@cea.fr

Abstract: High-Z metallic nanoparticles are new players in the therapeutic arsenal against cancer, especially radioresistant cells. Indeed, the presence of those NPs inside malignant cells is believed to enhance the effect of ionizing radiation by locally increasing the dose deposition. In this context, the potential of platinum nanoparticles (PtNPs) as radiosensitizers was investigated in two breast cancer cell lines, T47D and MDA-MB-231, showing a different radiation sensitivity. PtNPs internalized into the two cell lines and localized in lysosomes and multivesicular bodies. Analyses of cell responses in terms of clonogenicity, survival, mortality, cell cycle distribution, oxidative stress and DNA double-strand breaks did not reveal any significant enhancer effect when cells are co-exposed to PtNPs and ionizing radiation as compared to radiation alone. This result is different from a previous study performed in the same conditions with cervical cancer HeLa cells. It shows that the efficacy of radioenhancement is strongly cell type dependent. Simulation of the early stage ionization processes, taking into account the irradiation characteristics as well as realistic physical parameters in the biological sample, indicated that PtNPs could increase weakly the dose deposition (by 3%) in the immediate vicinity of the nanoparticles. Some features potentially at the origin of a biological effect could not be taken into account in the simulation. Thus, chemical and biological effects could explain this discrepancy. For instance, we showed that, in these breast cancer cell lines, PtNPs exhibited anti-oxidant properties, which could counteract the radio-enhancing effect. This work shows that the efficacy of PtNPs for enhancing radiation effects is strongly cell dependent, and that no effect is observed in the case of breast cancer cell lines. Thus, more extensive experiments are needed on other relevant biological models to evaluate those combined strategies, since several clinical trials have already demonstrated the success of combining nanoagents with radiotherapy on a range of tumor types.

Keywords: Platinum nanoparticle; ionizing radiation; dose enhancement effect; Radiation enhancement effect; radiation sensitivity; radiation resistance

1. Introduction

Among therapeutic strategies available to fight against solid tumors, radiotherapy (RT) is used in more than half of the cases. RT consists in a delivery of ionizing radiation to the cancer cells, leading to direct and indirect DNA damage. Indeed, ionization can directly induce nucleic acids strand breaks, but also produce free radicals by water radiolysis. Thus, those species will contribute to DNA damage leading to cell death depending on the tumor cells radiation sensitivity [1]. Indeed, tumors are very heterogeneous entities and contain variable proportions of cells resistant to treatments. Radiation resistance, at the origin of many treatment failures and tumor relapses, can be attributed to innate mechanisms such as genetic and mutation specificities of tumor cells and/or can be acquired by tumor cells during treatment. Research in radiotherapy currently focuses on increasing the dose and dose rate delivered to the tumor with a better ballistic for preserving healthy tissues. Concerning this later point, the use of metallic high-Z nanoparticles (NP) seems very promising for enhancing the radiation effect within the tumor as the photoelectric interaction cross-section is dependent on Z^5 . Once into the cells and upon irradiation, those metallic NP will emit showers of secondary electrons, which will be added to those generated by the ionization of water molecules in the biological medium, thus intensifying local energy deposits and intracellular ROS production. In a mouse mammary carcinoma model, Hainfeld et al. [2] showed a clear radiosensitization effect of gold nanoparticles delivered to the tumors before irradiation. This first *in vivo* demonstration paved the way to a growing number of publications illustrating the interest of high-Z nanoparticles for enhancing ionizing radiation effect, mainly by studying gold, gadolinium and hafnium nanoparticles [1].

Although platinum ($Z=78$) nanoparticles also fulfill necessary criteria for radiation enhancement effect, literature is still scarce. Most studies concern very small Pt nanoparticles [3-8], few focused on larger and more complex structures such as nanoflowers [9], nanodendrites [10-11], or bimetallic nanoparticles [12].

This study is the first to explore the possible radiosensitization of human breast cancer cell lines by PtNPs. More than 50% of breast malignant tumors are treated with radiotherapy, and despite a majority of favorable outcomes, some resistant tumors relapse. In this study, two cell lines were used as models of breast cancer, differing in the level of aggressivity and radiation resistance. Different biological endpoints such as cell survival/death, proliferation, DNA double-strand breaks and ROS were analysed after PtNPs and ionizing radiation co-exposure. Overall, PtNPs do not provide any enhancer effect in the two breast cancer cell lines in comparison to radiation only, in agreement with results obtained by Geant4 modelling that predict a rather limited effect on physical dose deposition and only at the close vicinity of PtNPs. In our experimental conditions, this enhanced physical step cannot generate direct damage to DNA and is not believed to generate major biological responses.

2. Results

2.1. Nanoparticle characterization

As recommended, PtNPs were suspended in water and in culture medium and were characterized by DLS measurements in either water or culture medium. Z-average in water and DMEM are 25.8 nm and 19.7 nm, respectively. The measured zeta-potential is -16 mV in water.

2.2. Nanoparticle uptake by breast cancer cells

First, we sought to determine if PtNPs were internalized into the cells and what was their intracellular localization. The PtNPs uptake was characterized after exposure of two different breast cancer cell lines, T47D and MDA-MB-231.

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ICP-MS absolute quantification of intracellular platinum was performed on cell extracts after 2, 6 or 24 h of exposure. In the two cell lines, a gradual uptake of nanoparticles is observed, with the highest uptake rate within the first two hours of exposure (Figure 1A). Although at a slower pace, intracellular platinum amounts continue to increase until 24 h. Interestingly, at that point, the platinum mass is higher in MDA-MB-231 cell line (0.5 pg/cell) than in T47D cells (0.2 pg/cell). In order to investigate intracellular distribution of nanoparticles, Transmission Electronic Microscopy (TEM) was used, taking advantage of the possible visualization of platinum particles without labelling (Figure 1B). Images were obtained after 2, 6 or 24 h of nanoparticle exposure, for MDA-MB-231 and T47D cell lines. As early as 2 h after the beginning of exposure, nanoparticles (indicated by arrows) can be observed in intracellular vesicles (V) and multivesicular bodies (MVB) or late endosomes. As shown on the picture taken at 24 h on MDA-MB-231 cells, nanoparticles are internalized into cells within endocytic vesicles, and probably transported in endosomes until being sequestered in MVBs. The number of nanoparticles per cell increases with time of exposure, confirming what is quantitatively measured by ICP-MS.

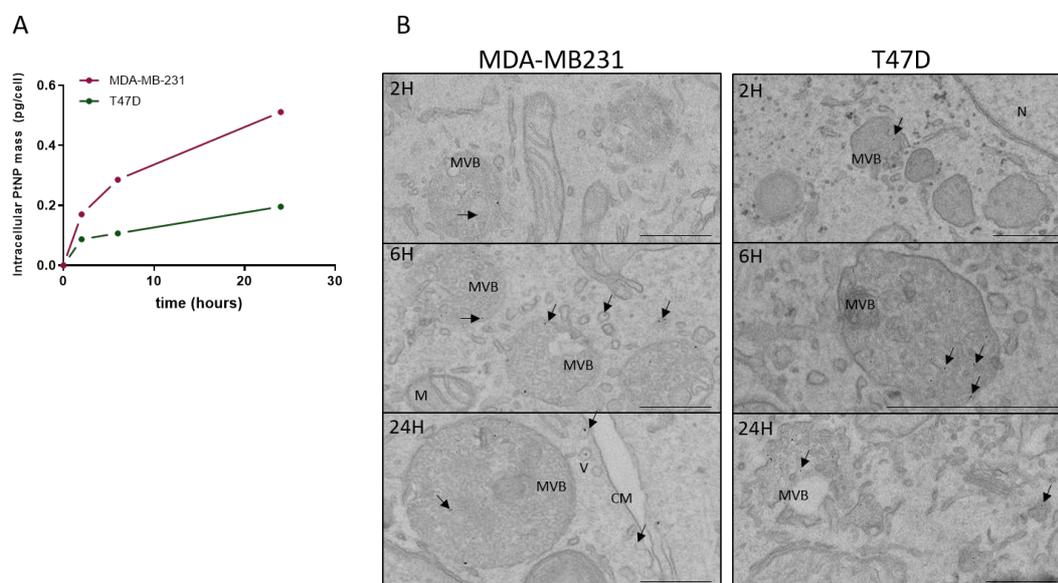


Figure 1. Assessment of nanoparticle uptake in MDA-MB-231 and T47D cells. (a) Absolute quantification of intracellular mass of platinum nanoparticles per cell, following an exposure of 2, 6 or 24 hours and measured by ICP-MS. (b) Representative images of Transmission Electron Microscopy, obtained on MDA-MB-231 (left) and T47D (right) cell lines, after being exposed for 2, 6 or 24 hours to 0.5 mM PtNPs. Nanoparticles are indicated by arrows. M = Mitochondria, MVB = Multi Vesicular Body, V=Vesicle, CM=Cell Membrane, N= Nucleus. Scale bar = 500 nm.

2.3. *In vitro* radio-enhancement effect of PtNPs

A clonogenic assay was performed in order to determine the extent of radiosensitization of breast cancer cell lines by PtNPs as compared to radiation alone. For each cell type, MDA-MB-231 and T47D, the surviving fraction was assessed following irradiation of cells pre-exposed to 0.5 mM PtNPs or not. The results shown in figure 2 present the clonogenic survival of cells exposed to PtNPs for 6 h (A) or 24 h (B), in response to different doses of ionizing radiation. Results of figure 2 show that MDA-MB-231 clonogenic survival after irradiation is similar, whether cells were pre-exposed or not to PtNPs for 6 h. For 24h exposure, the two curves do not superimpose but surprisingly, PtNPs-exposed cells show a better survival than control cells. Concerning T47D cells, clonogenic survival

is only impaired for the lowest dose of 2 Gy. By increasing the duration of exposure in order to optimize the intracellular concentration of PtNPs, T47D cells benefit from no enhancing effect. Therefore, except for the 2 Gy irradiation after 6 h exposure of T47D cells, the intracellular presence of PtNPs does not modify clonogenic survival of those cell lines after irradiation.

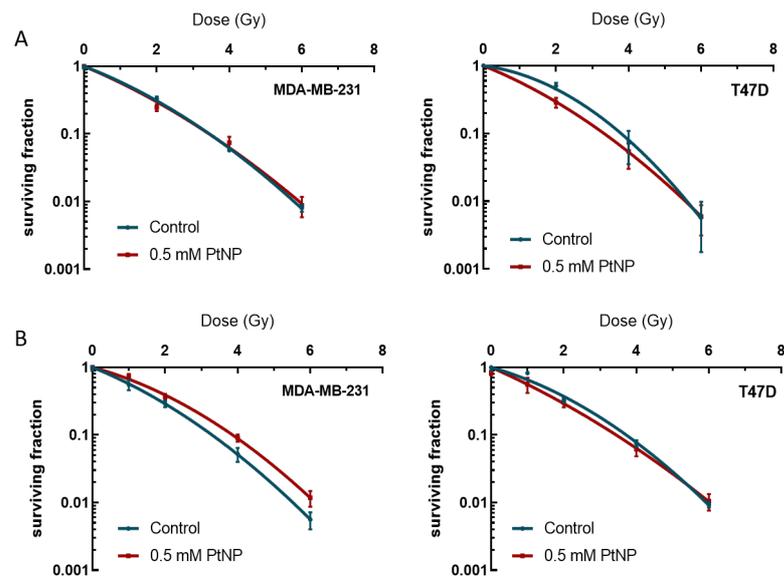


Figure 2. Survival of MDA-MB-231 and T47D cell lines determined by clonogenicity tests. The surviving fractions of each cell line and each condition were plotted against the radiation dose. (a) Cells were exposed to 0.5 mM PtNPs for 6 h, irradiated at 2, 4 or 6 Gy, and cultured for 14 days (MDA-MB-231, 5 replicates) or 28 days (T47D, two sets of 5 replicates). (b) Cells were exposed to 0.5 mM PtNPs for 24h, irradiated at 1, 2, 4 or 6 Gy, and cultured for 14 days (MDA-MB-231, 5 replicates) or 28 days (T47D, 5 replicates).

We then investigated in more details if exposure to PtNPs had an effect on cell proliferation and mortality (Figure 3). Although barely significant, the exposure to PtNPs in MDA-MB-231 cells induces a slight increase in percentage of dead cells (Figure 3A, $p < 0.05$ at day 3 and non-significant at day 6). Three days post-irradiation, MDA-MB-231 cell death increases ($p < 0.001$), with no difference between PtNPs-exposed cells or not. The difference between control and γ -irradiated cells is even larger after 6 days of culture, reaching more than 20% of cells. Again, the presence of PtNPs prior to irradiation does not enhance MDA-MB-231 mortality. In T47D cells, after 3 days of culture, the only significant difference corresponds to a faint increase in percentage of dead cells between control and irradiated cells ($p < 0.05$). At day 6 however, mortality reaches more than 10% of cells compared to control cells, but the pre-treatment with PtNPs has no effect. Therefore, in the two cell lines, the pre-exposure of cells with PtNPs does not enhance mortality compared to IR only.

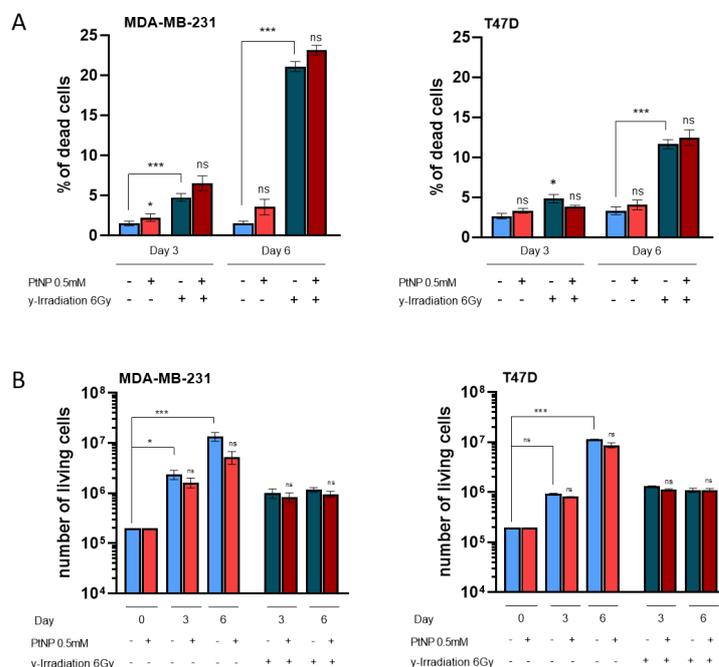


Figure 3. Quantification of cell mortality and survival after irradiation of cells pre-treated with PtNPs or not. (a) Percentage of dead cells measured by PI exclusion method. Cells were irradiated at 6 Gy after being exposed to 0.5 mM NPs or not, and mortality was evaluated after 3 or 6 days of culture. The experiment was conducted on two triplicates for each time point for MDA-MB-231 cell line, and on one triplicate for day 3 and two for day 6 for T47D cell line. (b) Measure of proliferation by counting absolute living cell numbers. Cells were irradiated at 6 Gy after being exposed to 0.5 mM NPs or not. Cell counts were assessed by flow cytometry, after 3 or 6 days of culture after treatments. The experiment was conducted on two triplicates for each time point for MDA-MB-231 cell line, and on one triplicate for day 3 and two for day 6 for T47D cell line. Statistical significance was determined with the Kruskal-Wallis test. ns: non-significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$.

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

In order to evaluate cell survival, cells were exposed to 0.5 mM PtNPs for 6 h and/or irradiated at 6 Gy (Figure 3B). An increase in cell number is observed at days 3 and 6, according to the proliferation rate of the two cell lines. The 6h-exposure with nanoparticles did not affect proliferation, since living cell numbers are equivalent in exposed versus non-exposed cultures. In contrast, irradiation induced cell proliferation arrest, whether in presence of PtNPs or not. At day 3, the number of cells is equivalent between irradiated and non-irradiated cells, in MDA-MB-231 and T47D cells. However, at day 6, the number remains similar, indicative of a slower proliferation rate and increase in mortality.

The distribution of cells within all cell cycle phases was assessed by quantifying propidium iodide incorporation by flow cytometry (Figure 4). Cells were irradiated at 6 Gy, after being exposed to 0.5 mM PtNPs or not. After 3 or 6 days of culture, cells were harvested and the cell cycle distribution was determined for each condition. The exposure to PtNPs alone did not induce any change in cell cycle distribution, whatever the cell line. The 6 Gy-irradiation led to an expected shift of cells towards a G2/M blockade and a hyperploidy. When cells were exposed to nanoparticles before irradiation, there were no significant changes in the patterns observed.

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

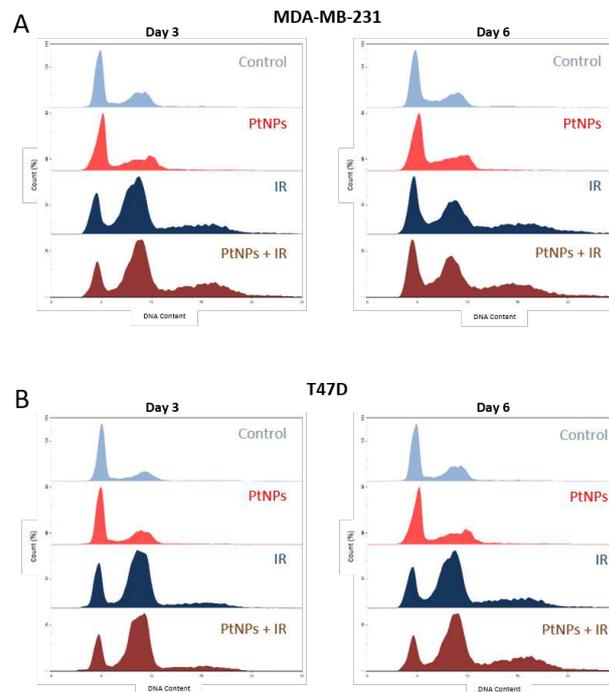


Figure 4. Cell cycle analysis of 6 Gy-irradiated breast cancer cells pretreated or not with 0.5 mM PtNPs. (a) Cell cycle distribution of MDA-MB-231 cells, exposed to 0.5 mM PtNPs and/or 6 Gy irradiation. Cells were harvested at day 3 (n=3) or at day 6 (n=3) after treatment. (b) Cell cycle distribution of T47D cells, exposed to PtNPs and/or 6 Gy irradiation. Cells were harvested at day 3 (n=1) or at day 6 (n=2) after treatment.

166
167
168
169
170

The production of ROS was then investigated by measuring the DHE probe's fluorescence in MDA-MB-231 and T47D cells, exposed to PtNPs and/or irradiated at 6 Gy. As can be observed on figure 5, PtNPs alone increase ROS in the two cell lines at rather equivalent levels and as expected, γ -irradiation alone also increases the ROS quantity in the two cell lines. However, when cells are exposed to PtNPs prior to irradiation, the levels of ROS reach, in the two cell lines, exactly the same levels as those obtained after exposure to PtNPs alone, indicating that after the double-exposure we cannot detect any additional ROS within the cells. To understand this later point, we decided to treat cells with menadione to induce first a stronger oxidative stress, and second a distinct oxidative stress as compared to radiation (Figure 5). Indeed, menadione mainly induces superoxide anion and then hydrogen peroxide while radiation induces firstly peroxide anions and then hydroxyl radicals. When cells are treated with menadione alone, the quantity of oxidized DHE probe is increased while when cells are pre-exposed to PtNPs, the level of oxidation remains equivalent to the untreated control cells (figure 5). These results indicate that PtNPs have ROS scavenger capacities and that they probably scavenge ROS species generated by γ -irradiation compared to those generated by menadione.

171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186

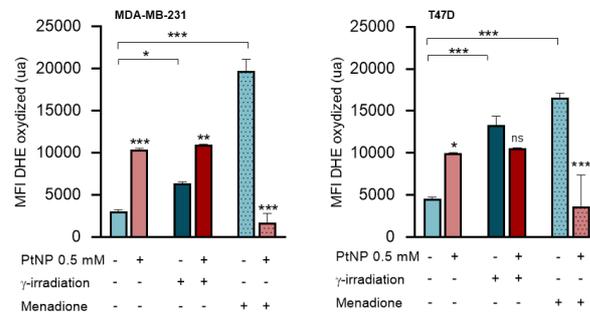


Figure 5. ROS quantification in breast cancer cells exposed or not to 0.5 mM PtNPs, and further irradiated or treated with menadione. The fluorescence emitted by the oxidized DHE probe was measured for MDA-MB-231 and T47D cell cultures, after exposure to PtNPs and/or irradiation with 6 Gy. The two last columns of each graph represent the fluorescent signals obtained with a treatment with menadione, an inducer of oxidative stress.

The number of DNA double-strand breaks (DSBs) is a reflect of treatment-induced genotoxicity. Since DNA breaks specifically induce phosphorylation of the histone H2A.X protein, labelling the nuclei with an antibody targeting γ H2A.X allows a direct quantification of the number of DSBs. Therefore, the number of γ H2A.X foci was reported 1, 4 or 24 hours after treatment (Figure 6). Interestingly, a 6-hour exposure with PtNPs only induces a few DSBs in MDA-MB-231 cells compared to control cells. When irradiated, cells undergo a burst of DSBs (mean = 30, compared to 0-3 in the controls), with no significant difference when cells were pre-treated with PtNPs. Results are similar after 1- and 4-hour delay. After a 24-hour delay, the number of foci in control cells decreases back to the control level, as a normal consequence of DNA repair. In the cells pre-exposed with PtNPs, there is still a significant difference with the irradiated-only cells, potentially pointing at a repair delay induced by the double treatment. In T47D cells, the number of foci observed in each condition is higher than in MDA-MB-231 cells. This is expected since it is known that T47D epithelial cells are more prone to genotoxicity than mesenchymal MDA-MB-231 cells. As for the MDA-MB-231 cells, irradiation leads to a dramatic increase in number of foci, but the exposure to PtNPs does not have an enhancer effect on the number of DNA breaks. DSBs decreased at 24 hours, with a slight but not significant difference when cells were pre-treated with PtNPs.

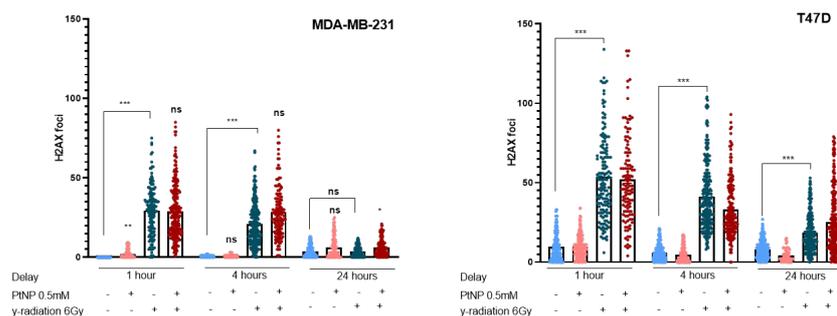


Figure 6. Double Strand DNA Breaks counting after 6 Gy irradiation of breast cancer cells pretreated or not with 0.5 mM PtNPs. DSBs foci were detected by labelling with H2A.X antibody, and counted 1-, 4- or 24 hours after irradiation. For each condition tested, a minimum of 100 nuclei were investigated. An unpaired t-test was used to identify outliers and a Kruskal-Wallis multiple comparison was performed to determine significance of findings. ns=non-significant, * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001.

2.4. Simulation of secondary electron energy spectra generated by PtNPs irradiation

Beyond long-standing hypotheses, we sought to evaluate the energy of particles reaching the cells in realistic *in vitro* conditions, as well as the potential increase in energy deposited within a cell after irradiating a PtNP. The first step of the study consisted in simulating primary and secondary particles obtained by irradiation of the cell culture and the second step in calculating the energy released by the plurienergetic spectra hitting PtNP compared to the case of water as a control (Figures 7 and 8). Figure 7A shows the X-Rays energy spectra interacting with the cell layer. According to the X Ray spectrum (Figure 7A), most photons are primary photons which transferred very small amounts of energy. This is due to the configuration of experimental setup and the use of ¹³⁷Cs as a source. As a result, most of the photons have an energy close to their initial energy (662 keV) and interact mainly by Compton effect inside the cell. A very small number of photons have energies that will lead to the desired photoelectric effect in the nanoparticle (K edge of Pt is 78.4 keV). In that case, electrons of different energy are generated (Figure 7B) and will deposit their energy into the cells leading to breakage of chemical bonds of biomolecules. The Dose Enhancement Factor (DEF) reflects the additional contribution of irradiated PtNP on the secondary electron emission as compared to the secondary electron emission after water irradiation alone. Thus, when calculating the DEF, this energy deposition (Figure 7B) must be taken into account, as there is a risk of overestimating this factor if not considered [13]. All the particles described above, both primary and secondary electrons, will interact with the nanoparticles and thus the resulting additional electrons that escape from the nanoparticle are those that will have a potential enhancement effect. The energy distributions are shown in Figure 8. Because of its chemical composition ($Z_{eff}=7.2$), very few interactions occurred in water (Figure 7C). Due to the high atomic number of platinum, interactions are much more frequent and thus induce a more efficient production of electrons although some are absorbed by the nanoparticle itself and never interact with cell components (Figure 7D). Thus, once the ionizing radiation interacts with the PtNP, a local increase in energy deposition is expected which will be accompanied by an increase in the number of radical species resulting from water radiolysis. However, it should be noted that most of the electrons escaping from the nanoparticle have an energy of less than 3 keV, which represents a range of less than 300 nm in liquid water.

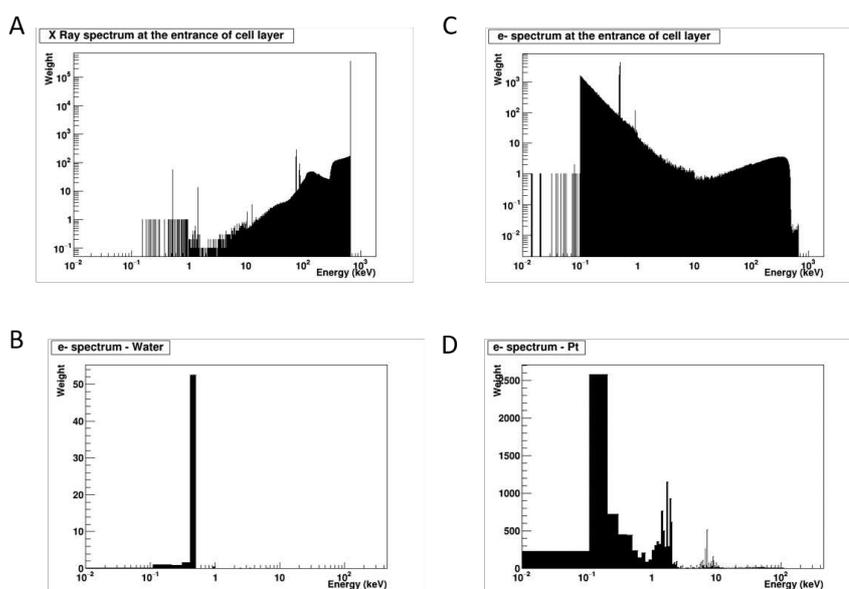


Figure 7. Simulation of energy spectra at the entrance of the cell layer and released by the Nanoparticles. (a) Energy spectrum of X Rays and electrons entering the cell culture. (b) Energy spectrum of electrons produced in a nanoparticle made of liquid water (left) and Pt (right) and escaping the nanoparticle.

Figure 8 shows the evolution of DEF as a function of the distance to the surface of the nanoparticle. The results taking or not into account the electronic equilibrium are given for didactic reasons. Two peaks are detectable, one at 50 nm, the other at 800 nm, which are due to the components of the spectrum of electrons escaping from the nanoparticle in Figure 7. The main peak, linked to the Auger emission, has a very low range. As it has recently been reminded [13], without taking into account the electron balance, i.e. when the beam of particles arriving on the nanoparticle has a size equivalent to the size of the nanoparticle, the DEF is very largely overestimated. In our study the overestimation reaches a factor of 10. It is therefore essential to look precisely at how the DEF is calculated. In our case, the correct calculation at equilibrium shows that the DEF maximum value is 3.1 at 45 nm around the nanoparticle and that the DEF reaches the value of 2 for distances higher than 100 nm. Then, there is a stabilization between 10 and 24% up to 1.5 μm from the nanoparticle. Finally, taking into account an uncertainty of 5% on the calculation, we can say that beyond 1.9 μm the enhancement effect is no longer perceptible. The DEF prediction, according to physical parameters in this experimental biological set-up, shows that the enhancement effect is localized in the immediate vicinity of the nanoparticle and that an effect at a larger distance is not expected only based on direct physical effects.

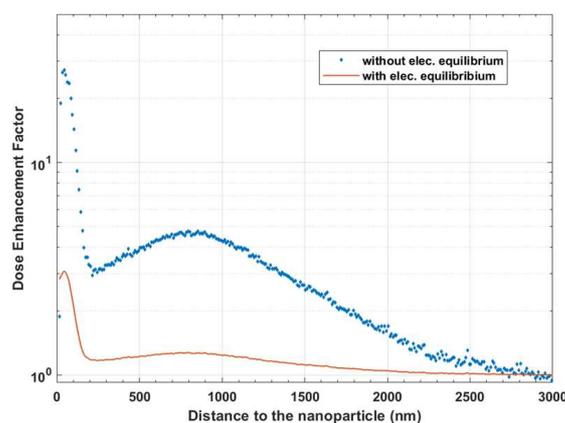


Figure 8. Dose Enhancement Factor according to the distance to nanoparticle, considering or not electronic equilibrium.

3. Discussion

One of the current challenges of radiotherapy is increasing the dose deposited specifically within the tumor while preserving normal tissue. Theoretically, radioenhancement effect can be achieved by irradiating intracellular metallic nanoparticles that locally increase the tissue density and thus energy absorption, then producing additional secondary electrons and further increasing ROS production and DNA damages within the cell. This was first shown in 2004 with gold nanoparticles injected in tumor bearing mice [2]. Since then, many publications have shown the interest of this strategy using gold, gadolinium and hafnium particles. Beside their interest to potentialize radiotherapy, these nanoparticles are biocompatible and are also useful for concomitant RMN or X-Ray imaging for theragnostics [14].

Although platinum fulfills all of the physical characteristics for inducing an enhancer radiation effect, only a few studies have evaluated its potential so far. Few papers analyse DNA breaks induced in plasmid DNA or in cell lines coexposed to PtNPs and radiation with different beam modalities, ie gamma, X or proton beams [6, 7, 12]. Using synthetic plasmid DNA, a net increase in DNA double breaks was observed after radiation and PtNP coexposure as compared to radiation alone, thus confirming the proof-of-concept of the enhancer effect. However, further studies analysing enhancer effect of PtNP in more realistic biological models, co-exposing either model organism [4] or mouse or human cancer cell lines [3-5, 8, 9, 11, 15] give rather discordant results. As also observed with other nanoparticles, these discrepancies could come from many different parameters such as size, charge and shape of NP that indeed could be modified as soon as the NP get in contact with biological entities. Radiation beam specificities, beam quality, and dose rates can also modulate the degree of enhancer effect [16]. In addition, NP uptake and localization could differ among cell types and they are not often quantified/qualified. Finally, radiation sensitivity is greatly dependent on cell types, cell differentiation, cell proliferation, etc. [17]. Moreover, in radiobiology, at least five factors have been identified as capable of modifying the cell responses to radiation, DNA repair capacity, cell proliferation, apoptosis sensitivity and antioxidant response [18]. Consequently, characterizing the enhancer effect by measuring a unique parameter such as DNA breaks or cell survival could not be sufficient to characterize the cellular response to ionizing radiation. To finish with, recent work on radiosensitization of *in vivo* models with metallic nanoparticles have also highlighted a crucial contribution of the host immune system in the tumor response to combined treatments [19]. Therefore, future projects aiming at deciphering radioenhancement in cancer should also include *in vivo* models.

In the present work, we have tested the potential enhancer effect of PtNPs on two human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and T47D by comparing cellular responses in terms of cell proliferation, cell death, cell cycle blockage and DNA breaks and repair after exposure to gamma radiation (6 Gy). These two cell lines were chosen because they present different genetic backgrounds and a different intrinsic radiation sensitivity as illustrated in figure 5, that indicates that DSBs were nearly totally repaired 24 h post-exposure in MDA-MB-231 while at the same time, DSBs remained detectable in T47D cells. In fact, with the exception of T47D cells after a 2 Gy irradiation, we never showed any benefit of the co-exposure PtNPs and radiation as compared to radiation alone in terms of tumor cell response, whatever the cell line and the biological endpoint. To verify that the absence of enhancer effect was not due to a defect in the NP internalization into the cells, NP distribution within the cell was assessed by TEM and intracellular PtNP was precisely quantified by ICP-MS. Those two techniques clearly evidenced an internalization of the PtNPs into the two cell lines, although PtNPs enter twice as much in MDA-MB-231 (0.5 pg) as in T47D (0.2 pg) with a similar localization in endosomes and multi-vesicular bodies.

The amount of intracellular PtNPs does not seem to be limiting for potentially inducing an effect since it is of the same order of magnitude as that described by Nicol et al, with which an enhancer effect was observed after gold nanoparticle exposure of MDA-MB-231 cells [20]. In addition, using the same PtNPs, Salado-Leza et al [8] showed a radio-enhancer effect in HeLa cells, with a larger effect using carbon ions than γ -rays. In the breast cancer cell line studied here, only a subtle effect was observed in one cell line, and at a single dose. Taken together, those results demonstrate once again the contradictory data that can be obtained on several cell lines or biological models. One of the common hypotheses about the lack of radiosensitization by metallic nanoparticles is based on the distribution of NPs within the cytoplasm exclusively. However, even in the case of a detectable enhancer effect, so far it has not been shown that NPs could penetrate the nucleus and therefore they cannot act directly on DNA. In that sense, Pagacova et al [5] have already showed an enhancer radiation effect with cytoplasmic PtNP, hypothesizing PtNP-induced damages to cytoplasmic structures leading to cell death without any detectable DNA damage.

Moreover, the localization of small metallic nanoparticles in endosomal compartment has been also previously described and it is commonly admitted that they end up in lysosomes, further engulfed in multivesicular bodies. PtNPs reside in a very acidic compartment and one could wonder if this could impair radioenhancer effect. This hypothesis is very unlikely since gold NPs, with the same intracellular location, were previously shown to be beneficial for enhancing radiation efficiency [21]. Thus overall, data indicate that the absence of radiation enhancement effect of PtNP cannot be totally attributed to a defect in PtNPs uptake or to a specific sub-cellular localization.

Another significant point that could explain the lack of effect of PtNP is the already described platinum anti-oxidant capacity, since ROS over production within the cell is supposed to be at the origin of the radiation enhancer effect. The antioxidant properties of platinum nanoparticles have been investigated in diverse cell lines [22], and have been observed for concentrations as low as 10 μ M [23]. While the concentrations used were proven to be non-toxic, ROS were scavenged by PtNPs with a size ranging from 2 to 5nm. In a more recent study, Jawaid et al [24] showed a ROS scavenging activity of PtNPs following irradiation, and with a nanoparticle concentration in the range of those used in the present study. Moreover, by comparing ROS detection after either PtNPs and irradiation or PtNPs and menadione, one can suspect that PtNPs are more prone to scavenge hydroxyl radicals rather than superoxide anions (Figure 5).

Given the absence of benefit of PtNPs for enhancing the efficacy of ionizing radiation observed in this work, we performed simulation for estimating, in our experimental conditions, the gain in terms of energy deposition and the spectra of secondary particles originating the enhancement effect that could be expected in the presence of intracellular PtNPs. If the NP were located within the cell nucleus, then the chemical stage simulation would allow to calculate DNA damage produced by the interaction of ROS. Unfortunately, in this work where the NP are mainly located in the lysosome, the inclusion of the chemical stage simulation as it is now available in Geant4-DNA will not allow to obtain any particular output useful for the interpretation of the biological results as it is just proportional to the increase in the energy deposition simulated here. There is currently no available data to be introduced in the code allowing other particular aspects of the chemical stage simulation in this case that could derive from the NP coating or other chemical interactions with the cell media. These considerations together with the important computing time needed for simulating the chemical stage decided us to only study the energy deposition around NP in comparison with the absence of the NP.

It is important to remember that the DEF calculation method can induce a significant bias if electronic equilibrium is not considered [13]. The three steps in which the simulation was performed, described in the material and methods section, allowed to obtain the needed electronic equilibrium and preserve the needed statistics for the number of simulated interactions with the NP. In accordance to other published results, in our simulations, we found that the maximal DEF that can be obtained with PtNPs, in these biological conditions (isolated NPs) and using Cesium irradiation, is around 3 in the immediate vicinity (45 nm) of the NP. The electron spectra confirmed that the physics-related effect is localized to the very close environment of the NP and decreases very rapidly (1.2 at 1 μ m of the NP). The question of how to interpret this extremely localized energy increase effect is nevertheless quite complex and several parameters specific to this particular experiment in terms of NP localization, size, concentration and photon spectrum, must be taken into account.

Indeed, McMahon et al [25], have compared the increase in local energy deposition produced by gold nanoparticles to the one produced in hadron therapy around the ion track. Therefore, they use the Local Effect Model [26-27] that has been developed for hadrontherapy in order to calculate the equivalent Relative Biological Effectiveness (RBE) produced by those NPs in the cell. Results in this paper show an excellent agreement in the simulated survival curves with these RBE for MDA-MB-231 cells exposed to 500

µg/mL of 1.9 nm gold nanoparticles prior to 160 kVp X-rays exposure. However, in had- 390
 rontherapy, ion tracks normally traverse the cell and often interact with the cell nucleus. 391
 Therefore, RBE values derived in this model implicitly take into account the fact that an 392
 increase in energy deposition will happen in cell nucleus or in other critical cell organs, 393
 which, is not the case in this work as most of the NP are located in the lysosomes. 394

Other important aspects of the localized energy deposition in nanometer scale 395
 around the NP and their biological consequences have been recently summarized in H. 396
 Rabus et al. [28]. In this paper, it is shown that the calculated DEF can correspond to ~10 397
 ionization in close vicinity of the GNP. These important number of ionizations in 10 nm 398
 volumes that can be at the origin of coating destruction and thus a loose in the biocom- 399
 patibility of the NP potentially leading to their biological effect. 400

Our model shows that the irradiation leads to energy deposition and ROS inhomoge- 401
 neities at the nanoscale and this has already been mentioned as having an important 402
 role in the way different cells will react and thus in radiosensitization [29]. Indeed, bio- 403
 chemical mechanisms involved in the cell response for such conditions are still not well 404
 understood and therefore could not be taken into account in our model. Our results indi- 405
 cate that the potential enhancement strongly relies on the biological distribution of the 406
 NPs which depends not only on the type of NP and but also on the cell type [30], although 407
 this distribution is not the only parameter to be taken into account in order to understand 408
 the biological effect. 409

4. Materials and Methods 410

4.1. Nanoparticles 411

Platinum nanoparticles of core size of 3.2 nm were synthesized through radiolytic 412
 method and PEGylated according to the method described by Li et al [4] and Salado-Leza 413
 et al [8]. Lyophilised PtNPs were suspended and vortexed in deionized water reaching a 414
 10 mM stock solution. PtNP size characterization was performed by a DLS after resuspension 415
 in water and complete culture medium. For cell exposure, PtNPs were dispersed in 416
 DMEM complete medium at a 0.5 mM exposure. Taking into account colloidal suspension 417
 and sedimentation of nanoparticles in complex media, we maintained a constant surface 418
 concentration of 0.15 mmol/cm² and always adapted the final volume of nanoparticles to 419
 cell culture support surface. 420

4.2. Cell Culture 421

Tumor breast cancer cell lines MDA-MB-231 (ATCC number HTB-26) and T47D 422
 (ATCC number HTB-133) were used for this study. Cells were routinely grown at 37°C in 423
 a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium 424
 (DMEM), GlutaMAX supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum 425
 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO – USA) and 1 mM antibiotic-antimycotic (Invitrogen, 426
 Carlsbad, CA – USA). 427

4.3. Radiation exposure conditions 428

Gamma-irradiations were performed on a GSR D1 irradiator (Gamma Medical Ser- 429
 vice). This self-shielded device irradiates with four sources of 137Cs, with a total activity 430
 around 180.28 TBq (measured in March 2014). Samples were irradiated at different single 431
 doses: 0, 2, 4 and 6 Gy with a dose rate of 2.7 Gy/min, taking the radioactive decrease into 432
 account. Samples were irradiated in 25 cm² flasks or 6 or 12 well-plates. Prior to irradiation, 433
 dosimetry was performed. A cylindrical ionizing chamber 31010 by PTW was used 434
 as the recommendation of the AAPM'S TG-61. This ionizing chamber has a cavity of 0.125 435
 cm³ calibrated in 137Cs air kerma free in air at the PTB reference facility number 1904442. 436
 The polarity and the ion recombination were measured for this 137Cs source. Each meas- 437
 urement was corrected by the KTP factor to take the variation of temperature and atmos- 438
 pheric pressure into account. 439

4.4. Transmission Electron Microscopy (TEM) 440

MDA-MB-231 and T47D were respectively seeded at 2×10^5 cells and 3×10^5 in 6-well plates 24 hours before treatment. After a retrograde kinetics setup (24-, 6- and 2-hour exposure to PtNPs), cells were washed three times in PBS and fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), for 1 hour at room temperature. Samples were then contrasted with Oolong Tea Extract (OTE) 0.5% in cacodylate buffer, postfixed with 1% osmium tetroxide containing 1.5% potassium cyanoferrate, gradually dehydrated in ethanol (30% to 100%), substituted gradually in mix of ethanol-epon, and embedded in epon (Delta Microscopies – France). Thin sections (70 nm) were collected onto 200 mesh copper grids, and counterstained with lead citrate. Grids were examined with Hitachi HT7700 electron microscope operated at 80kV (Elexience – France), and images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT). 451

4.5. Mass-Spectrometry (MS) 452

For Mass-Spectrometry, 1×10^6 MDA-MB-231 and 2×10^6 T47D cells were seeded in 25cm² flasks and exposed to PtNPs 0.5 mM for 2, 6 or 24 hours. Cells were washed three times in PBS before being harvested. Cells were counted in triplicate with an automatic cell counter (TC20, Biorad) before being centrifuged and digested in HNO₃ 16N solution. Platinum total mass was measured by using an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) and normalized to cell number. 458

4.6. Cell survival and viability (Propidium iodide exclusion) 459

Cells were seeded in triplicate in 12-well plates 24 hours before PtNPs treatment. After a 6-hour exposure with 0.5 mM PtNPs, cells were irradiated at 6 Gy and medium was changed. After 3 and 6 days, supernatants and cells were harvested and centrifuged for 5 min at 300 x g. Pellets were re-suspended in 500 µl of culture medium and samples were further diluted to one fifth in a 5 µg/mL of propidium iodide-PBS solution. Cell survival was calculated from volumetric absolute count with ACEA Novocyte flow cytometer (ACEA Biosciences – USA), optical configuration (405, 488, 640 nm). Live and dead cells are discriminated according to their propidium iodide exclusion and data were analysed with NovoSoftware (ACEA Biosciences – USA). 468

4.7. Immunofluorescence microscopy 469

MDA-MB-231 and T47D cells were respectively seeded at a density of 1.2×10^5 and 2.5×10^5 cells/well in a 8-well glass slide and left to adhere for 48 hours before treatment. After a 6-hour exposure to 0.5 mM PtNP, cells were irradiated at 6 Gy. Then, 1, 4 or 24 hours post-irradiation, cells were washed and fixed with a 4% paraformaldehyde solution for 20 minutes. Cells were then permeabilized using a PBS solution containing 0.1% Triton X-100 for 10 minutes. Then, cells were stained for γ -H2A.X foci to evaluate DNA double strand breaks formation and for Hoechst to image nuclei. This requires a blocking step using a buffer of 10% goat serum in PBS for 1 hour at room temperature. After blocking, cells were incubated 75 minutes with mouse anti-Phospho Histone H2A.X antibody (ser139, clone JBW301, Millipore, Merck – Germany) at a dilution of 1:500 in blocking buffer. Cells were rinsed 3 times with washing buffer (0.025% Triton X-100) before being incubated with Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse secondary antibody (Invitrogen – USA) at a dilution of 1:500 for 60 minutes in blocking buffer. Cells were rinsed 3 times in washing buffer and stained with Hoechst (1 µg/ml) for 15 minutes at 37°C. After a final rinse, slides were mounted with ProLongGold anti fade reagent (Invitrogen – USA) and sealed. Foci were viewed on a spinning disk Cell observer SD microscope (Zeiss, Oberkochen – Germany). Images were treated and foci per cell counted with a cell image analysis software (CellProfiler). 487

4.8. Cell cycle distribution 488

After 3 or 6 days of culture after treatment, cells were harvested and centrifuged before re-suspension in PBS at an average concentration of 5×10^5 cells/mL. Cells were fixed with a dropwise addition of 4 volumes of 70% glacial ethanol. The day after, cells were centrifuged at $1000 \times g$ for 4 min and washed before staining in a 0.03 mg/mL propidium iodide and 0.05 mg/mL RNase solution overnight. PI fluorescence was then recorded with a flow cytometer (Novocyte, ACEA Biosciences – USA) in the PE emission canal (572 nm/28) after doublet discrimination. Cell cycle distribution was determined with the NovoExpress built-in cell cycle analysis module (ACEA Biosciences).

4.9. Clonogenic cell survival assay

Following a 0.5 mM PtNP treatment, sub-confluent cells were removed from flasks using a 0.05% of a TrypLE express solution (Thermofisher). Living cells were counted using an automated cell counter (TC20, Biorad) considering trypan blue exclusion. Cells were then γ -irradiated with a dose range from 0 to 6 Gy. Colony forming assay was performed right after irradiation by plating cells in 60 mm diameter Petri dishes. MDA-MB-231 and T47D cells were left to proliferate for respectively 14 and 28 days, having a respective plating efficiency of 40% and 30%. Then, cells were washed and fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 2 hours. Colonies were stained with Giemsa blue (10% v/v in water) for 3 hours before extensive rinse. Colonies containing more than 50 cells were counted under binocular loupe and surviving fractions were calculated by dividing the plating efficiency in the irradiated sample by plating efficiency in untreated conditions.

4.10. Oxidative Stress measurement

MDA-MB-231 and T47D cells were respectively plated at a density of 4 and 8×10^5 cells/well in a 96-well plate and left to adhere for 48 hours. 6 hours prior to irradiation, medium was replaced by complete fresh medium, with or without a 0.5 mM PtNP suspension. Menadione was used as an oxidative stress positive control and added in corresponding sample at a concentration of 50 μ M. Dihydroethidium (DHE) is a fluorescent probe (ex: 535 nm, em: 610 nm) for oxidative stress monitoring. Once oxidized by superoxide anion, DHE intercalates into DNA and stains the nucleus red. DHE was added at a final concentration of 10 μ M and samples were incubated in the dark for 30 minutes at 37°C. Right after, plates were irradiated at 6 Gy and read at 610 nm with a microplate reader (ClarioStarPlus, Bmg Labtech – Germany). In order to get rid of cell growth inhomogeneity, fluorescence was acquired on an orbital average mode, covering the entire well. Analysis was performed by normalizing mean fluorescence of sample in presence of DHE probe by corresponding sample without DHE probe.

4.11. GEANT4-DNA Simulation

To support the experimental observations, Monte Carlo simulations were carried out making use of the Geant4 code [31-33]. This general-purpose toolkit simulation, first dedicated to high energy and nuclear physics, has been developed and improved to enable other applications in medical or space fields. For radiobiology, some models available in Geant4-DNA [34-36], totally included in the Geant4 distribution, exist in liquid water to simulate step by step physical interactions of charged particles down to ~ 10 eV. Geant4-DNA also allows the simulation of the diffusion and reaction of radical species resulting from the radiolysis of water.

In our simulations, only the physical aspect of the interaction of a particle with the NP has been taken into account.

The properties, in terms of energy and angular distribution, of the particles set in motion by the interactions in the NP and that escape from the NP were characterized using Livermore models. All their energy depositions in the surrounding liquid water (approximation of cellular medium) were calculated using the Geant4-DNA models.

Livermore models were used in this study for the modeling of the electromagnetic processes inside the NP because they can be forced to describe the interactions of electrons and photons with matter down to about 100 eV which is adapted to our scale in space and energy. New models specifically dedicated to gold nanoparticles have been recently published [37], but unfortunately, they are not yet available publicly. In case of gold nanoparticles, a paper compared the dose estimated by either a NP-specific model or by the Livermore tool. The results of this paper indicate that Livermore cross-sections overestimates the Dose Enhancement Factor of few percent [38].

In order to take into account the macroscopic characteristics of the cell irradiation as well as the microscopic aspects of the interactions with single NP and the determination of the energy deposition increase in nanometric shells around the NP, the simulations were performed in three steps.

The first step consisted in assessing the physical properties of particles (X-Rays and electrons) entering a layer representing the cell culture thanks to the detailed simulation of the whole experimental setup: irradiator, medium culture (water, 2.2 mm thick) surrounding the cell culture (water, 10 μ m thick). Primary particles were tracked inside the experimental setup producing secondaries. All the characteristics (position, energy, direction) of the particles entering the culture layer were recorded.

The second step consisted in injecting the particle's characteristics recorded at the previous step (phase space file) around a nanometric volume representing the NP in order to characterize the particles escaping from that volume. The volume was first made of water and then made of Pt in order to be able to identify the characteristics of the spectrum derived from the PtNP that could have a local effect. The NP was represented by a spherical volume of platinum with a diameter of 3.2 nm which corresponds to the mean diameter of NP core measured experimentally. For the present modelling, because microscopic observation together with the intracellular concentration indicate that PtNPs are far from each other (more than 150 nm), we have considered that PtNPs were isolated and therefore we neglected the possible secondary energy transfers.

The last step is the calculation of energy deposited by the particles obtained in the previous step. In order to calculate the Dose Enhancement Factor (DEF), the deposited energy by these particles escaping from the NP volume is counted in concentric layers of 10 nm that corresponds to sizes comparable to sensitive molecular volumes [25, 29, 39-41] around the position of the NP with or without the presence of the Pt.

5. Conclusions

In this work, analysing different biological endpoints such as cell survival and death, cell cycle DNA breaks and oxidative stress, we do not evidence any enhancer effect of PtNP in the two breast cancer cell lines T47D and MDA-MB-231 exposed to ionizing radiation. This result is different from the one observed with cervical cancer-derived (HeLa) cells [8]. The intracellular localization and the concentration of PtNPs, similar in the two studies, cannot explain this discrepancy.

Geant4 modelling of the early stage dose deposition in the presence of PtNPs, performed with realistic electronic equilibrium, predicts that at most, under our experimental conditions, the DEF could reach a maximum of 3% in the immediate vicinity of the PtNPs. The impact of this highly localized perturbation and the effect of PtNPs in its whole, in particular the contributions of the chemistry (radical chemistry, surface chemistry and influence of molecular oxygen) and the consecutive biology, remains unclear. For instance, the antioxidant effect of PtNPs found in the present case could play a role in scavenging the effect of reactive oxygen species.

Over the last decade, clinical studies demonstrated that DEF can really be observed after the double-treatment high-Z metallic nanoparticles and radiotherapy to treat certain cancer cases. This work shows that the efficacy of combined treatments is highly tumor

cell dependent. Systematic studies are needed to evaluate various combinations on biological models. In this regard, 3D models mimicking tumors or *in vivo* models could represent good alternatives.

Author Contributions: Conceptualization: M.H., R.G. and S.C.; *In vitro* experiments and analysis: M.H., R.G., C.M., V.M., S.C., E.B.; Simulation study: Y.P. and C.V.; Resources: X.Y., S.L., E.P.; Writing – Original Draft Preparation: Y.P., E.B., S.C.; Writing – Review & Editing: All authors. All authors have approved the final version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the Transverse Division n°4 (Radiobiology) of the French Alternative Energies and Atomic Energy Commission (Segment n° 4 Radiobiologie) and by Université Paris Saclay via the “Initiative de Recherche Stratégique” program, grant IRS NanoTheRad project.

M. Hullo was a recipient of a fellowship from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation, and X. Wang was a recipient of a fellowship from the China Scholarship Council (CSC, N° 201607040068)

Acknowledgments: The authors wish to thank facilities from INRAE and LNE. For electronic microscopy, this work has benefited from the facilities and expertise of MIMA2 - Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France. ICP-MS experiments were conducted on the Platform of the LNE laboratory (Laboratoire National de Métrologie et d’Essais, Paris, France). We are grateful to Christophe Carles for constant support and interest.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Liu, Y.; Zhang, P.; Li, F.; Jin, X.; Li, J.; Chen, W.; Li, Q. Metal-based NanoEnhancers for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells. *Theranostics* **2018**, *8*, 1824–1849, doi:10.7150/thno.22172.
2. Hainfeld, J.F.; Slatkin, D.N.; Smilowitz, H.M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol* **2004**, *49*, N309-315, doi:10.1088/0031-9155/49/18/n03.
3. Daneshvar, F.; Salehi, F.; Karimi, M.; Vais, R.D.; Mosleh-Shirazi, M.A.; Sattarahmady, N. Combined X-ray radiotherapy and laser photothermal therapy of melanoma cancer cells using dual-sensitization of platinum nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2020**, *203*, 111737, doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111737.
4. Li, S.; Porcel, E.; Remita, H.; Marco, S.; Réfrégiers, M.; Dutertre, M.; Confalonieri, F.; Lacombe, S. Platinum nanoparticles: an exquisite tool to overcome radioresistance. *Cancer Nanotechnol* **2017**, *8*, 4, doi:10.1186/s12645-017-0028-y.
5. Pagáčová, E.; Štefančíková, L.; Schmidt-Kaler, F.; Hildenbrand, G.; Vičar, T.; Depeš, D.; Lee, J.-H.; Bestvater, F.; Lacombe, S.; Porcel, E.; et al. Challenges and Contradictions of Metal Nano-Particle Applications for Radio-Sensitivity Enhancement in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20030588.
6. Porcel, E.; Liehn, S.; Remita, H.; Usami, N.; Kobayashi, K.; Furusawa, Y.; Le Sech, C.; Lacombe, S. Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology* **2010**, *21*, 85103, doi:10.1088/0957-4484/21/8/085103.
7. Schlathöller, T.; Eustache, P.; Porcel, E.; Salado, D.; Štefančíková, L.; Tillement, O.; Lux, F.; Mowat, P.; Biegun, A.K.; van Goethem, M.-J.; et al. Improving proton therapy by metal-containing nanoparticles: nanoscale insights. *Int J Nanomedicine* **2016**, *11*, 1549–1556, doi:10.2147/IJN.S99410.
8. Salado-Leza, D.; Porcel, E.; Yang, X.; Štefančíková, L.; Bolsa-Ferruz, M.; Savina, F.; Dragoe, D.; Guerquin-Kern, J.-L.; Wu, T.-D.; Hirayama, R.; et al. Green One-Step Synthesis of Medical Nanoagents for Advanced Radiation Therapy. *Nanotechnol Sci Appl* **2020**, *13*, 61–76, doi:10.2147/NSA.S257392.
9. Abdul Rashid, R.; Zainal Abidin, S.; Khairil Anuar, M.A.; Tominaga, T.; Akasaka, H.; Sasaki, R.; Kie, K.; Abdul Razak, K.; Pham, Binh.T.T.; Hawke, B.S.; et al. Radiosensitization effects and ROS generation by high Z metallic nanoparticles on human colon carcinoma cell (HCT116) irradiated under 150 MeV proton beam. *OpenNano* **2019**, *4*, 100027, doi:10.1016/j.onano.2018.100027.
10. Hossain, M.; Su, M. Nanoparticle location and material dependent dose enhancement in X-ray radiation therapy. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* **2012**, *116*, 23047–23052, doi:10.1021/jp306543q.
11. K.A., M.A.; Rashid, R.A.; Lazim, R.M.; Dollah, N.; Razak, K.A.; Rahman, W.N. Evaluation of radiosensitization effects by platinum nanodendrites for 6 MV photon beam radiotherapy. *Radiation Physics and Chemistry* **2018**, *150*, 40–45, doi:10.1016/j.radphyschem.2018.04.018.
12. Salado-Leza, D.; Traore, A.; Porcel, E.; Dragoe, D.; Muñoz, A.; Remita, H.; García, G.; Lacombe, S. Radio-Enhancing Properties of Bimetallic Au:Pt Nanoparticles: Experimental and Theoretical Evidence. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20225648.
13. Rabus, H.; Gargioni, E.; Li, W.B.; Nettelbeck, H.; Villagrasa, C. Determining dose enhancement factors of high-Z nanoparticles from simulations where lateral secondary particle disequilibrium exists. *Phys Med Biol* **2019**, *64*, 155016, doi:10.1088/1361-6560/ab31d4.

14. Sancey, L.; Lux, F.; Kotb, S.; Roux, S.; Dufort, S.; Bianchi, A.; Crémillieux, Y.; Fries, P.; Coll, J.-L.; Rodriguez-Lafrasse, C.; et al. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *Br J Radiol* **2014**, *87*, 20140134, doi:10.1259/bjr.20140134. 642
15. Yang, X.; Salado-Leza, D.; Porcel, E.; González-Vargas, C.R.; Savina, F.; Dragoe, D.; Remita, H.; Lacombe, S. A Facile One-Pot Synthesis of Versatile PEGylated Platinum Nanoflowers and Their Application in Radiation Therapy. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21051619. 643
16. Hwang, C.; Kim, J.M.; Kim, J. Influence of concentration, nanoparticle size, beam energy, and material on dose enhancement in radiation therapy. *Journal of Radiation Research* **2017**, *58*, 405–411, doi:10.1093/jrr/rrx009. 644
17. Penninckx, S.; Heuskin, A.-C.; Michiels, C.; Lucas, S. Gold Nanoparticles as a Potent Radiosensitizer: A Transdisciplinary Approach from Physics to Patient. *Cancers* **2020**, *12*, 2021, doi:10.3390/cancers12082021. 645
18. Curtis, S.B. Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation—a unified repair model. *Radiat Res* **1986**, *106*, 252–270. 646
19. Zhang, P.; Darmon, A.; Marill, J.; Mohamed Anesary, N.; Paris, S. Radiotherapy-Activated Hafnium Oxide Nanoparticles Produce Abscopal Effect in a Mouse Colorectal Cancer Model. *Int J Nanomedicine* **2020** May *29*;15:3843-3850. doi: 10.2147/IJN.S250490. 647
20. Nicol, J.R.; Harrison, E.; O'Neill, S.M.; Dixon, D.; McCarthy, H.O.; Coulter, J.A. Unraveling the cell-type dependent radiosensitizing effects of gold through the development of a multifunctional gold nanoparticle. *Nanomedicine* **2018**, *14*, 439–449, doi:10.1016/j.nano.2017.11.019. 648
21. Jain, S.; Coulter, J.A.; Hounsell, A.R.; Butterworth, K.T.; McMahon, S.J.; Hyland, W.B.; Muir, M.F.; Dickson, G.R.; Prise, K.M.; Currell, F.J.; et al. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2011**, *79*, 531–539, doi:10.1016/j.ijrobp.2010.08.044. 649
22. Hamasaki, T.; Kashiwagi, T.; Imada, T.; Nakamichi, N.; Aramaki, S.; Toh, K.; Morisawa, S.; Shimakoshi, H.; Hisaeda, Y.; Shirahata, S. Kinetic analysis of superoxide anion radical-scavenging and hydroxyl radical-scavenging activities of platinum nanoparticles. *Langmuir* **2008**, *24*, 7354–7364, doi:10.1021/la704046f. 650
23. Nomura, M.; Yoshimura, Y.; Kikui, T.; Hasegawa, T.; Taniguchi, Y.; Deyama, Y.; Koshiro, K.; Sano, H.; Suzuki, K.; Inoue, N. Platinum nanoparticles suppress osteoclastogenesis through scavenging of reactive oxygen species produced in RAW264.7 cells. *J Pharmacol Sci* **2011**, *117*, 243–252, doi:10.1254/jphs.11099fp. 651
24. Jawaid, P.; Rehman, M. ur; Yoshihisa, Y.; Li, P.; Zhao, Q. li; Hassan, M.A.; Miyamoto, Y.; Shimizu, T.; Kondo, T. Effects of SOD/catalase mimetic platinum nanoparticles on radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis* **2014**, *19*, 1006–1016, doi:10.1007/s10495-014-0972-5. 652
25. McMahon, S.J.; Hyland, W.B.; Muir, M.F.; Coulter, J.A.; Jain, S.; Butterworth, K.T.; Schettino, G.; Dickson, G.R.; Hounsell, A.R.; O'Sullivan, J.M.; et al. Biological Consequences of Nanoscale Energy Deposition near Irradiated Heavy Atom Nanoparticles. *Sci Rep* **2011**, *1*, 18, doi:10.1038/srep00018. 653
26. Scholz, M.; Kraft, G. Calculation of Heavy Ion Inactivation Probabilities Based on Track Structure, X Ray Sensitivity and Target Size. *Radiation Protection Dosimetry* **1994**, *52*, 29–33, doi:10.1093/oxfordjournals.rpd.a082156. 654
27. Elsässer, T.; Scholz, M. Cluster Effects within the Local Effect Model. *Radiation Research* **2007**, *167*, 319–329, doi:10.1667/RR0467.1. 655
28. Rabus, H.; Li, W.B.; Villagrasa, C.; Shuemann, J.; Hepperle, P.A.; de la Fuente Rosales, L.; Beuve, M.; Di Maria, S.; Klapproth, A.P.; Li, C.Y.; Poignant, F.; Rudek, B.; Nettelbeck, H. Intercomparison of Monte Carlo calculated dose enhancement ratios and secondary electron spectra for gold nanoparticles irradiated by X-rays: assessing the uncertainty and correct methodology for extended beams. Submitted to *EJMP-D* (2021) 656
29. McMahon, S.J.; Hyland, W.B.; Muir, M.F.; Coulter, J.A.; Jain, S.; Butterworth, K.T.; Schettino, G.; Dickson, G.R.; Hounsell, A.R.; O'Sullivan, J.M.; et al. Nanodosimetric Effects of Gold Nanoparticles in Megavoltage Radiation Therapy. *Radiotherapy and Oncology* **2011**, *100*, 412–416, doi:10.1016/j.radonc.2011.08.026. 657
30. McMahon, S.J.; Paganetti, H.; Prise, K.M. Optimising Element Choice for Nanoparticle Radiosensitisers. *Nanoscale* **2016**, *8*, 581–589, doi:10.1039/C5NR07089A. 658
31. Agostinelli, S.; Allison, J.; Amako, K.; Apostolakis, J.; Araujo, H.; Arce, P.; Asai, M.; Axen, D.; Banerjee, S.; Barrand, G.; et al. Geant4—a simulation toolkit. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **2003**, *506*, 250–303, doi:10.1016/S0168-9002(03)01368-8. 659
32. Allison, J.; Amako, K.; Apostolakis, J.; Araujo, H.; Arce Dubois, P.; Asai, M.; Barrand, G.; Capra, R.; Chauvie, S.; Chytráček, R.; et al. Geant4 developments and applications. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **2006**, *53*, 270–278, doi:10.1109/TNS.2006.869826. 660
33. Allison, J.; Amako, K.; Apostolakis, J.; Arce, P.; Asai, M.; Aso, T.; Bagli, E.; Bagulya, A.; Banerjee, S.; Barrand, G.; et al. Recent developments in Geant4. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **2016**, *835*, 186–225, doi:10.1016/j.nima.2016.06.125. 661
34. Incerti, S.; Ivanchenko, A.; Karamitros, M.; Mantero, A.; Moretto, P.; Tran, H.N.; Mascialino, B.; Champion, C.; Ivanchenko, V.N.; Bernal, M.A.; et al. Comparison of GEANT4 very low energy cross section models with experimental data in water. *Med Phys* **2010**, *37*, 4692–4708, doi:10.1118/1.3476457. 662
35. Bernal, M.A.; Bordage, M.C.; Brown, J.M.C.; Davidková, M.; Delage, E.; El Bitar, Z.; Enger, S.A.; Francis, Z.; Guatelli, S.; Ivanchenko, V.N.; et al. Track structure modeling in liquid water: A review of the Geant4-DNA very low energy extension of the Geant4 Monte Carlo simulation toolkit. *Phys Med* **2015**, *31*, 861–874, doi:10.1016/j.ejmp.2015.10.087. 663
36. Incerti, S.; Kyriakou, I.; Bernal, M.A.; Bordage, M.C.; Francis, Z.; Guatelli, S.; Ivanchenko, V.; Karamitros, M.; Lampe, N.; Lee, S.B.; et al. Geant4-DNA example applications for track structure simulations in liquid water: A report from the Geant4-DNA Project. *Med Phys* **2018**, doi:10.1002/mp.13048. 664

37. Sakata, D.; Kyriakou, I.; Okada, S.; Tran, H.N.; Lampe, N.; Guatelli, S.; Bordage, M.-C.; Ivanchenko, V.; Murakami, K.; Sasaki, T.; et al. Geant4-DNA Track-Structure Simulations for Gold Nanoparticles: The Importance of Electron Discrete Models in Nanometer Volumes. *Med. Phys.* **2018**, *45*, 2230–2242, doi:10.1002/mp.12827. 702
703
38. Engels, E.; Bakr, S.; Bolst, D.; Sakata, D.; Li, N.; Lazarakis, P.; McMahon, S.J.; Ivanchenko, V.N.; Rosenfeld, A.B.; Incerti, S.; et al. Advances in modelling gold nanoparticle radiosensitization using new Geant4-DNA physics models. *Phys Med Biol* **2020**, doi:10.1088/1361-6560/abb7c2. 705
706
707
39. Jones, B.L.; Krishnan, S.; Cho, S.H. Estimation of Microscopic Dose Enhancement Factor around Gold Nanoparticles by Monte Carlo Calculations: Microscopic Dose Enhancement Factor around Gold Nanoparticles. *Med. Phys.* **2010**, *37*, 3809–3816, doi:10.1118/1.3455703. 708
709
710
40. Leung, M.K.K.; Chow, J.C.L.; Chithrani, B.D.; Lee, M.J.G.; Oms, B.; Jaffray, D.A. Irradiation of Gold Nanoparticles by X-Rays: Monte Carlo Simulation of Dose Enhancements and the Spatial Properties of the Secondary Electrons Production: Monte Carlo Simulation on Gold Nanoparticles. *Med. Phys.* **2011**, *38*, 624–631, doi:10.1118/1.3539623. 711
712
713
41. Lin, Y.; McMahon, S.J.; Scarpelli, M.; Paganetti, H.; Schuemann, J. Comparing Gold Nano-Particle Enhanced Radiotherapy with Protons, Megavoltage Photons and Kilovoltage Photons: A Monte Carlo Simulation. *Phys. Med. Biol.* **2014**, *59*, 7675–7689, doi:10.1088/0031-9155/59/24/7675. 714
715
716

1.2 Étude du potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules d'or *in vitro*

Les nanoparticules d'or sont sans doute les plus étudiées pour leur potentiel de radio-sensibilisation. Leur numéro atomique et leur biocompatibilité en faisant un matériau de choix, nous avons étudié l'intérêt de nanoparticules d'or de différentes tailles (6 et 32 nm) en association avec les RI sur des modèles tumoraux mammaires présentant des niveaux de radio-sensibilité différents.

a. Potentiel radio-sensibilisant de nanoparticules d'or de 6 nm

Afin de montrer l'intérêt d'un double-traitement, le traitement par des nanoparticules seules ne devrait pas occasionner de toxicité. Ainsi, pour déterminer la gamme de doses à tester pour évaluer le potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules, nous avons défini le seuil de concentration en dessous duquel les AuNP@DTDTPA ne provoquaient pas de modification significative de l'impédance cellulaire (Figure 39).

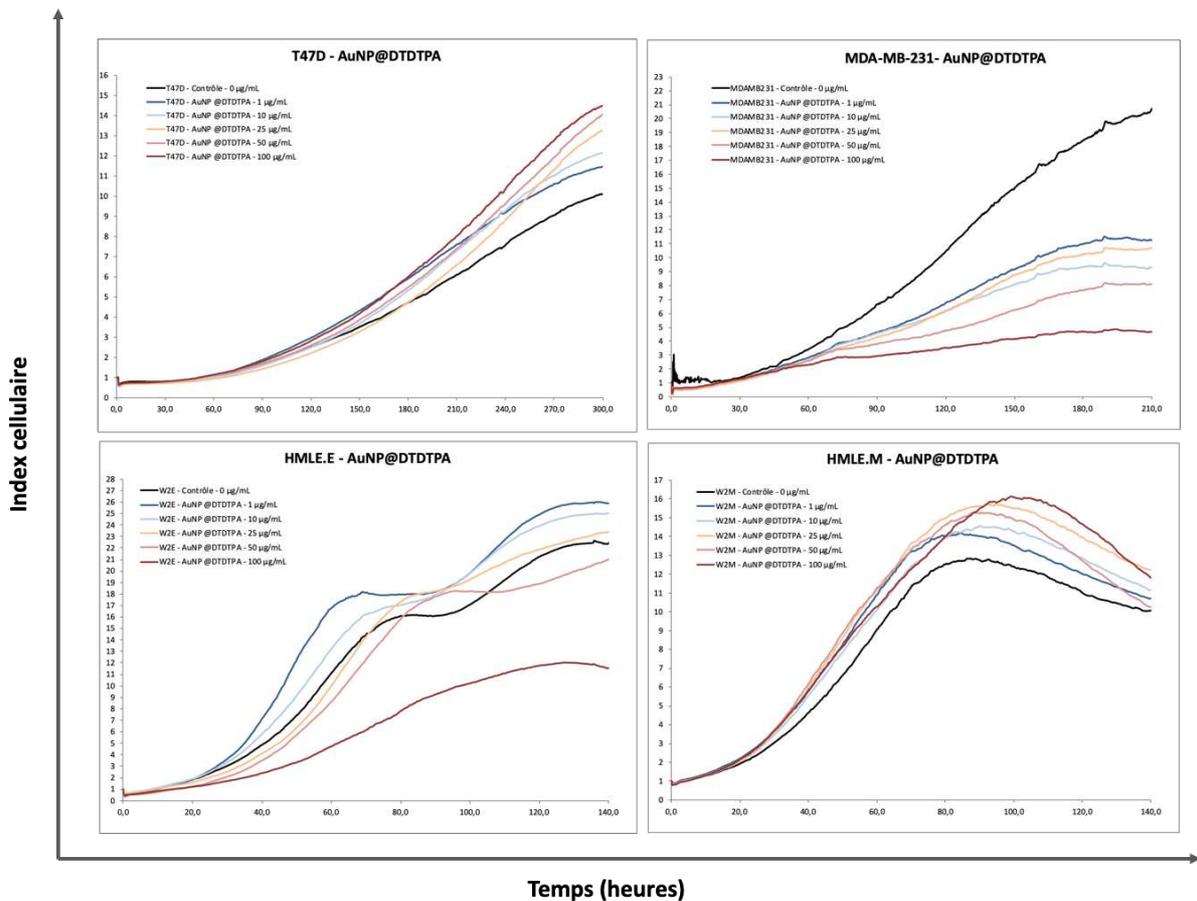


Figure 39 : Évolution au cours du temps de l'impédance (index cellulaire) des cellules tumorales mammaires T47D, MDA-MB-231, HMLE.E et HMLE.M en réponse à une exposition à des concentrations croissantes de AuNP@DTDTPA.

Résultats

Globalement, les AuNP@DTDTPA ne sont pas toxiques pour les lignées T47D, HMLE.M et HMLE.E sauf à la plus forte concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour HMLE.M, sachant que des index cellulaires supérieurs à ceux du témoin reflètent un changement morphologique des cellules et non une toxicité. Par contre, la lignée MDA-MB-231 semble être sensible à l'exposition à ces nanoparticules puisque dès les premières concentrations l'index cellulaire chute par rapport à celui des cellules témoin. Compte tenu de la toxicité très similaire observée aux concentrations 1, 10 et 25 mg/ml nous avons retenu pour toutes les expériences à suivre, et quelle que soit la lignée, une exposition à 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AuNP@DTDTPA qui nous a semblé être le meilleur compromis entre quantité de nanoparticules et innocuité. Dans les plaques de culture utilisées pour suivre l'impédance cellulaire, cette concentration volumique de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ correspond à une concentration surfacique de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ainsi, quels que soient les supports de culture pour les expériences à suivre, toutes les expositions aux AuNP@DTDTPA ont été ajustées à la concentration surfacique de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Afin d'objectiver un effet radio-sensibilisant de ces nanoparticules, nous avons exposé pendant 24 heures les cellules épithéliales T47D et mésenchymateuses MDA-MB-231 aux AuNP@DTDTPA à une concentration de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ puis nous avons analysé la survie clonogénique après exposition de ces cellules à des doses croissantes de rayonnements ionisants.

Irradiées de 0 à 6 Gy, les cellules ensemencées en conditions clonales n'ont pas montré de différence de survie clonogénique que les cellules soient, ou non, exposées aux nanoparticules avant l'irradiation et cela pour deux synthèses indépendantes de nanoparticules (Figure 40). L'une des hypothèses permettant d'expliquer l'absence d'effet-Z de ces nanoparticules pourraient être une internalisation insuffisante et ce point sera particulièrement développé dans la partie 2.

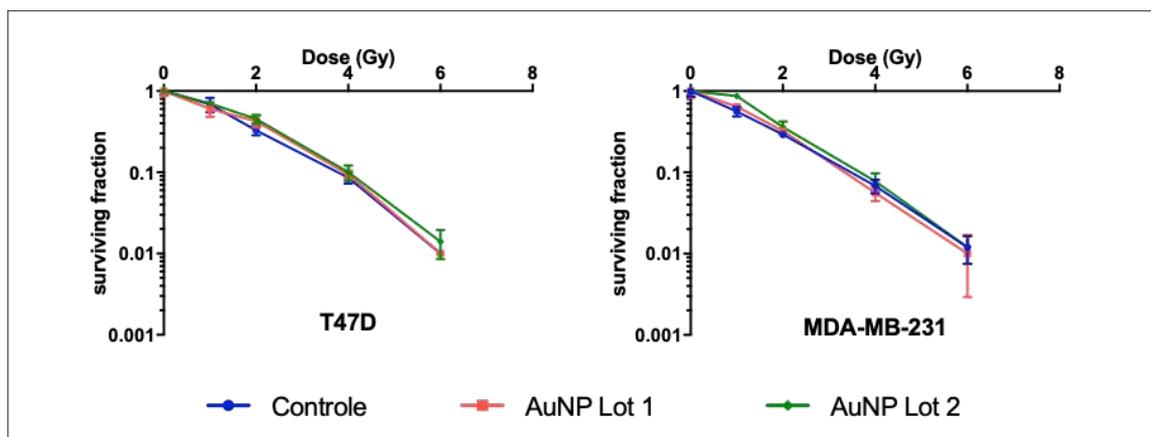


Figure 40 : Survie clonogénique après exposition des lignées tumorales mammaires T47D et MDA-MB-231 à des doses croissantes de rayonnements ionisants (source ^{137}Cs). Les cellules ont été (courbes rouges et vertes) ou non (courbe bleue) préalablement exposées pendant 24 heures aux AuNP@DTDTPA à la concentration de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Afin de faciliter la quantification et la visualisation de l'internalisation de ces nanoparticules, nous avons utilisé des AuNP@DTDTPA issues des mêmes lots de synthèse mais secondairement fonctionnalisées avec de la cyanine 5. Comme toute modification des paramètres physico-chimiques des nanoparticules est susceptible d'affecter leur réponse biologique, nous avons comparé la survie clonogénique après une irradiation à 4 Gy des lignées HMLE.E et .M exposées 24 heures au préalable à une gamme de concentration de d'AuNP@DTDTPA fluorescentes (AuNP-Cya5) ou pas (AuNP) (Figure 41).

Pour exclure le risque de passer à côté de différences de comportement trop subtiles pour être détectées, nous avons élargi la gamme de concentration à dix fois celle précédemment définie par xCELLigence®.

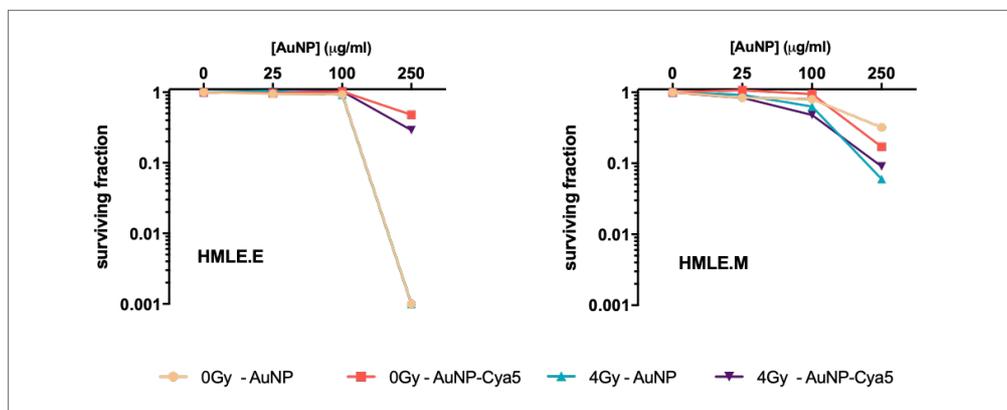


Figure 41 : Survie clonogénique des lignées tumorales mammaires HMLE.E et HMLE.M en réponse à une gamme 0 à 160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (correspondant à une gamme de 0 à 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des mesures d'impédance cellulaire) d'AuNP@DTDTPA fonctionnalisées ou non avec de la cyanine 5, irradiées ou non à 4 Gy par une source de ^{137}Cs .

A la concentration de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (équivalent à 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) déterminée par la mesure de l'impédance cellulaire, la présence de la cyanine 5 ne modifie pas la survie clonogénique par rapport aux nanoparticules non marquées. Ces nanoparticules fluorescentes pourront donc être utilisées dans ces conditions pour le suivi de leur localisation intra-cellulaire.

Au-delà de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, les courbes de survie clonogénique montrent une toxicité des nanoparticules quelles que soient les conditions de traitement. Conformément aux courbes d'impédance cellulaire, cette toxicité est majeure pour HMLE.E pour lesquelles la survie clonogénique est annihilée à 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A cette concentration, la présence de cyanine 5 à la surface des AuNP modifie particulièrement

Résultats

leur comportement vis-à-vis de la lignée HMLE.E puisque pour un traitement équivalent, la survie clonogénique des HMLE.E exposées aux AuNP-Cya5 (courbe rouges et violettes) est de l'ordre de 50%. Ces résultats illustrent la complexité à travailler avec des nano-objets et nous poussent donc à considérer ces nanoparticules fonctionnalisées avec de la cyanine 5 comme des objets singuliers pouvant nous éclairer sur les problématiques d'internalisation développées plus loin dans ce manuscrit. Par prudence, nous nous tiendrons néanmoins à l'utilisation des nanoparticules non fluorescentes pour caractériser un effet radio-sensibilisant.

La quantité de nanoparticules internalisées semble par ailleurs être un élément déterminant, puisqu'en dépit de la toxicité des AuNP@DTDTPA à la concentration de 250 µg/ml, les courbes de survie clonogénique suggèrent un potentiel radio-sensibilisant sur HMLE.M dont la survie en réponse à une irradiation gamma de 4 Gy passe de 32% (courbe orange) à 6% (courbe bleue) en présence d'AuNP.

b. Caractérisation de l'effet radio-sensibilisant en termes de stress oxydatif

Selon la théorie, en réponse à la densification de la matière, l'occurrence d'un effet-Z devrait augmenter la probabilité de radiolyse de l'eau et le stress oxydatif global.

Nos collaborateurs impliqués dans la synthèse des nanoparticules contrôlent leurs lots dans des conditions acellulaires, en vérifiant qu'une irradiation γ d'une suspension d'AuNP@DTDTPA à la dose de 1132 Gy provoque bien une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène. Comme observé figure 42, une augmentation de 54 % de la production de la forme oxydée fluorescente de la coumarine est observée après irradiation du milieu en présence de d'AuNP@DTDTPA.

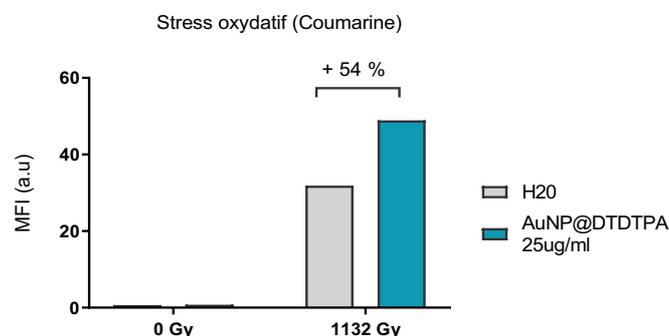


Figure 42 : Stress oxydatif, mesuré par l'oxydation de la coumarine, après irradiation gamma (Césium 137) d'une suspension d'AuNP@DTDTPA à une dose de 1132 Gy.

La mesure d'un stress oxydatif intra-cellulaire est plus complexe. A des doses d'irradiation biologiquement réalistes, la sonde dihydroéthidium (DHE) permet de mettre en évidence une augmentation du stress oxydatif par la mesure de la fluorescence de sa forme oxydée : pour les 4 lignées cellulaires étudiées, l'irradiation à des doses de 2 et 4 Gy (courbes bleues) augmente le stress oxydatif mesuré en sortie de l'irradiateur en l'absence de nanoparticules (Figure 43).

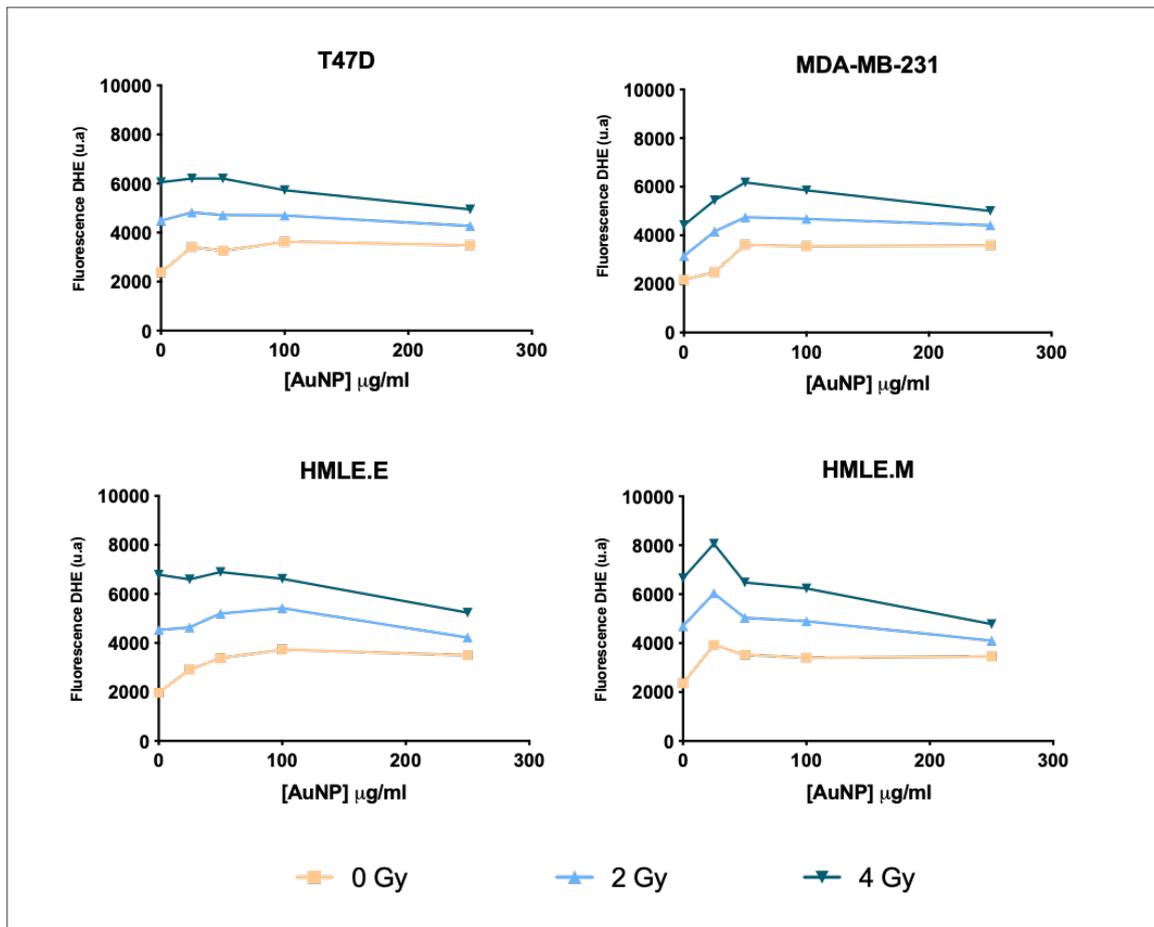


Figure 43 : Stress oxydatif mesuré par l'oxydation de la sonde dihydroéthidium (DHE) en sa forme 7-OH DHE fluorescente dans les cellules T47D, MDA-MB-231, HMLE.E et HMLE.M traitées 24 heures à une gamme de concentration d'AuNP@DTDTPA préalablement à une irradiation de 0, 2 ou 4 Gy. La mesure est réalisée immédiatement après l'irradiation.

En l'absence d'irradiation (courbe orange), l'exposition à des concentrations croissantes d'AuNP@DTDTPA génère une augmentation progressive du stress oxydatif dans toutes les lignées.

En l'absence d'AuNP@DTDTPA, suite à une irradiation à 2 et 4 Gy, on observe une augmentation du stress oxydant dans toutes les lignées, l'augmentation étant plus nette à la plus forte dose. En réponse aux double-traitement irradiation et AuNP@DTDTPA, l'effet est différent selon la nature épithéliale ou mésenchymateuse des cellules. L'exposition des lignées mésenchymateuses (MDA-MB-231 et

Résultats

HMLE.M) à des concentrations inférieures à 50 µg/ml provoque une légère augmentation du signal de fluorescence alors que le signal est constant pour les lignées épithéliales (T47D et HMLE.E).

Après l'exposition des 4 lignées cellulaires à des doses supérieures à 50 µg/ml d'AuNP, l'intensité de fluorescence liée à l'oxydation du DHE en réponse à l'irradiation diminue suggérant de possibles interférences entre la plus grande quantité de nanoparticules et la sensibilité de la mesure du stress oxydatif en fluorescence (Figure 43).

Afin de vérifier si les AuNP@DTDTPA peuvent interférer avec la sensibilité de la mesure du stress oxydatif, nous avons suivi la fluorescence à 605 nm de solutions à concentrations croissantes de la forme oxydée 7-OH DHE, en présence de différentes quantités d'AuNP@DTDTPA dans la solution. Les résultats présentés figure 44 montrent, en effet, une relation linéaire entre quantité de 7-OH DHE et intensité de fluorescente (courbe noire).

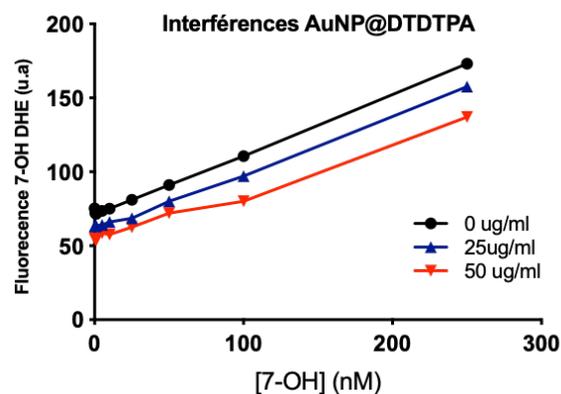


Figure 44 : Test d'interférences des AuNP@DTDTPA avec la forme oxydée de la sonde dihydroéthidium. La courbe noire représente la fluorescence du 7-OH DHE en fonction de sa concentration molaire en l'absence de nanoparticules d'or. Les courbes bleues et rouges représentent la fluorescence du 7-OH DHE en fonction de sa concentration molaire en présence respectivement de 25 et 50 µg/ml d'AuNP@DTDTPA.

Par contre, le signal de fluorescence du 7 OH-DHE décroît de façon dépendante de la quantité de nanoparticules en suspension (courbes bleue et rouge) confirmant l'hypothèse d'une absorption partielle du signal de fluorescence par les nanoparticules. De ce fait, l'exposition de ces cellules tumorales mammaires à des concentrations non toxiques de nanoparticules ne permet pas de mettre en évidence une surproduction de stress oxydatif en comparaison à une irradiation seule par cette méthode.

Les recherches menées avec ces nanoparticules d'or de 6 nm illustrent bien les difficultés rencontrées avec l'utilisation de nanoparticules en biologie en lien avec leurs propriétés physico-chimiques

spécifiques. Celles-ci ne permettent pas de conclure à un effet radio-sensibilisant ou à une augmentation du stress oxydatif sur nos modèles cellulaires.

c. Potentiel radio-sensibilisant de nanoparticules d'or de 32 nm

La taille et la surface des nanoparticules étant susceptible d'influencer les interactions biologiques et physiques de nanoparticules, nous avons cherché à caractériser l'effet-Z associé à d'autres nanoparticules d'or. Pour cela, nous avons testé les effets sur les lignées épithéliales T47D et mésenchymateuse MDA-MB-231 de 3 lots distincts d'AuNP PEGylées de 32 nm dont la reproductibilité apparente en taille mesurée par microscopie électronique est satisfaisante (Tableau 8).

Tableau 8: Caractérisation de la taille des nanoparticules d'or AuNP@PEG-NH₂ par microscopie électronique, diffusion dynamique de la lumière (DLS) et zétamétrie. Les mesures de DLS sont réalisées dans l'eau et le milieu biologique d'exposition (milieu de culture complété à 10% de sérum de veau fœtal).

AuNP@PEG-NH ₂	Cœur (MET)	Z-Average (H ₂ O)	Z-average (10% sérum)	Potentiel-zêta
Lot 1	32,8 nm	27,7 nm	30,2 nm	+ 23,2 mV
Lot 2	33,9 nm	43,6 nm	47 nm	+ 27,9 mV
Lot 3	31,9 nm	30,6 nm	31,6 nm	+ 14 mv

Une fois en suspension aqueuse, les trois lots testés présentent une certaine hétérogénéité dans leur distribution en taille et potentiel zêta. Néanmoins, le diamètre hydrodynamique moyen (*Z-average*) des lots 1 et 3 sont homogènes dans l'eau ainsi que le potentiel zêta des lots 1 et 2. En présence de sérum dans le milieu de culture cellulaire, le diamètre hydrodynamique moyen augmente de quelques nanomètres suggérant l'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules mais cela n'affecte pas la stabilité ou l'agglomération des nanoparticules.

Une exposition de 24 h à une concentration équivalente de 50 µg/ml d'AuNP@PEG-NH₂ (correspondant à 32 µg/cm²) n'impacte pas la survie cellulaire des T47D et des MDA-MB-231 à long terme (courbes vertes Figure 45).

L'irradiation gamma à 6 Gy provoque une baisse de la survie cellulaire et un délai de reprise apparente de la prolifération de respectivement 6 et 14 jours pour les lignées MDA-MB-231 et T47D (courbes rouges). Le double-traitement par les AuNP et les rayonnements ionisants (courbes jaunes) n'a pas

Résultats

d'effet surajouté sur la survie des cellules MDA-MB-231 mais induit un effet retard sur les cellules T47D en doublant le délai de reprise de leur prolifération. Cet effet retard sur les T47D n'a pas été reproduit suite aux expositions avec les autres lots d'AuNP. Nous devons préciser que cet arrêt de prolifération peut résulter d'un arrêt total de la prolifération ou d'un équilibre entre prolifération et mort cellulaires.

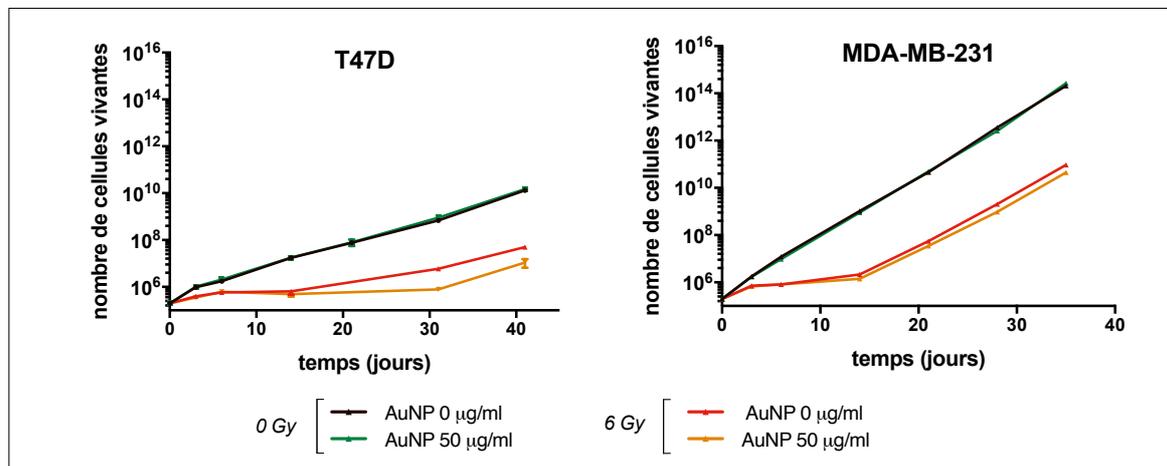


Figure 45 : Courbe de survie (incorporation d'iodure de propidium) des lignées tumorales T47D et MDA-MB-231 suite à une exposition à 50 µg/ml d'AuNP@PEG-NH₂ (courbes vertes), une irradiation γ de 6 Gy (courbes rouges).

Les mesures de l'impédance cellulaire (index cellulaire) permettent d'observer en temps réel des variations qui reflètent globalement des modifications de survie, mort, morphologie cellulaire et potentiel de membrane. Nous avons mesuré l'index cellulaire des cellules T47D et MDA-MB-231 en réponse à l'exposition aux trois lots d'AuNP fonctionnalisées avec des PEG-NH₂ et au lot PEG-COOH, couplée ou non à une irradiation à une dose de 6 Gy. Les résultats obtenus sont similaires pour les différents lots de nanoparticules et la figure 46 illustre quelques exemples de courbes obtenues. Le traitement par les nanoparticules aux concentrations de 10 à 50 µg/ml influence différemment les lignées cellulaires exposées (courbes oranges et rouges) : sans effet sur l'index cellulaire des MDA-MB-231, les AuNP induisent une augmentation de l'index cellulaire des T47D indépendamment de la concentration. De tels profils indiquent plutôt un changement morphologique des cellules qu'un effet réel sur la prolifération.

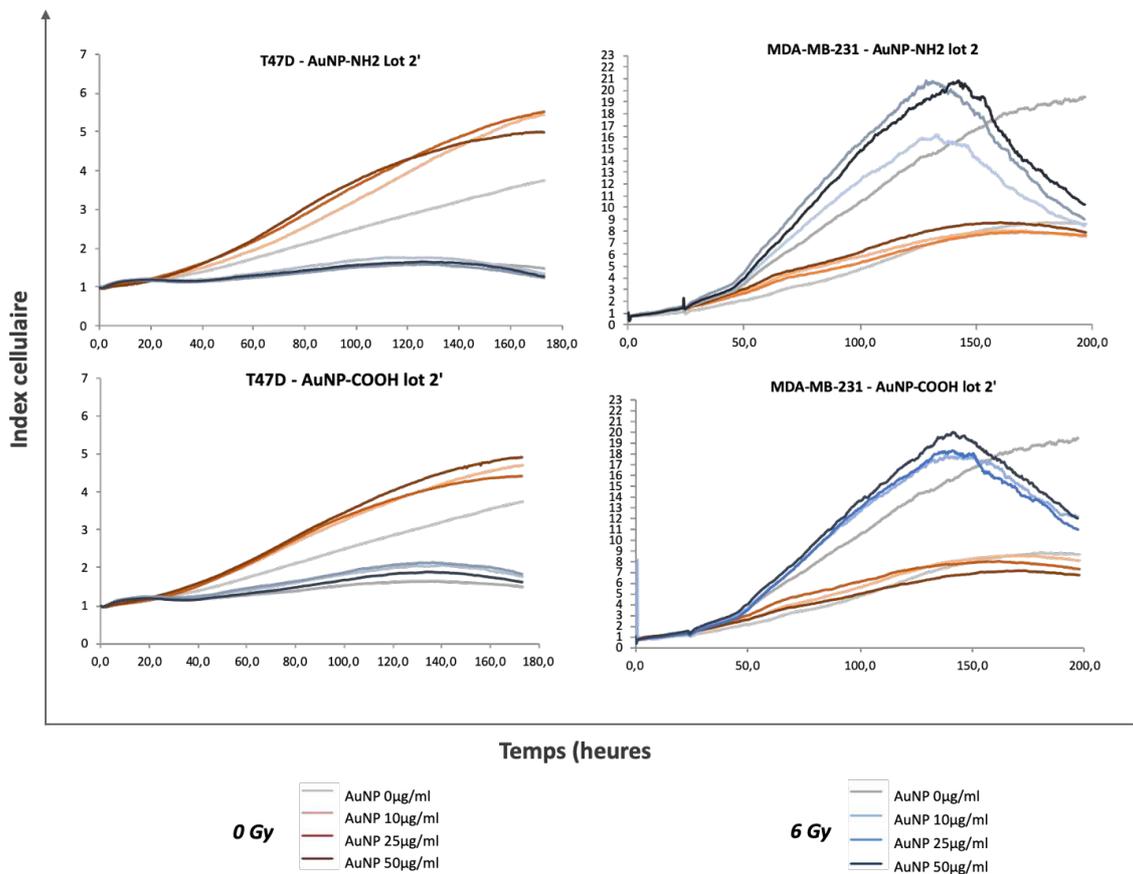


Figure 46 : Mesure de l'impédance cellulaire des lignées T47D et MDA-MB-231 (mesurée par l'index cellulaire) dans le temps en réponse au traitement par des nanoparticules d'or de 32 nm PEGylées avec un groupe amine (NH₂) ou carboxyle (COOH) en surface et/ou par des rayonnements γ à la dose de 6 Gy.

Après irradiation, le profil d'impédance des cellules T47D montre un arrêt complet de la croissance cellulaire (courbes grises). Compte tenu de cette réponse, nous ne sommes pas dans des conditions pouvant objectiver un potentiel effet radio-sensibilisant des nanoparticules (courbes bleues). Par contre, l'effet du double-traitement est visible pour les cellules MDA-MB-231 : l'exposition aux AuNP préalablement à l'irradiation provoque 5 à 6 jours après l'irradiation une chute brutale de l'index cellulaire par rapport aux cellules irradiées seulement. Notons cependant, que durant les premiers jours post-co-exposition, les cellules prolifèrent comme le témoin. Ces résultats permettent de préciser l'interprétation de la figure 45. En effet, nous pouvons conclure que la dose de 6 Gy est très cytotoxique pour les cellules T47D car elle bloque totalement la croissance cellulaire. Par contre concernant la lignée MDA-MB-231, nous concluons que, compte tenu que ces cellules prolifèrent pendant les 4-5 premiers jours post-traitement (impédance), le nombre constant de cellules vivantes observées figure 45 devrait résulter en fait d'un équilibre prolifération/mort cellulaire.

Résultats

Nous avons donc analysé la mort cellulaire après une exposition des cellules pendant 24h aux AuNP-NH₂ suivie d'une irradiation à 6 Gy.

Comme attendu, nous n'observons pas de mortalité pour la lignée T47D exposée aux AuNP et irradiée ou non, mais nous observons bien un pic de mortalité entre 5 et 10 jours après irradiation de la lignée MDA-MB-231 exposée ou non exposée aux AuNP (Figure 47).

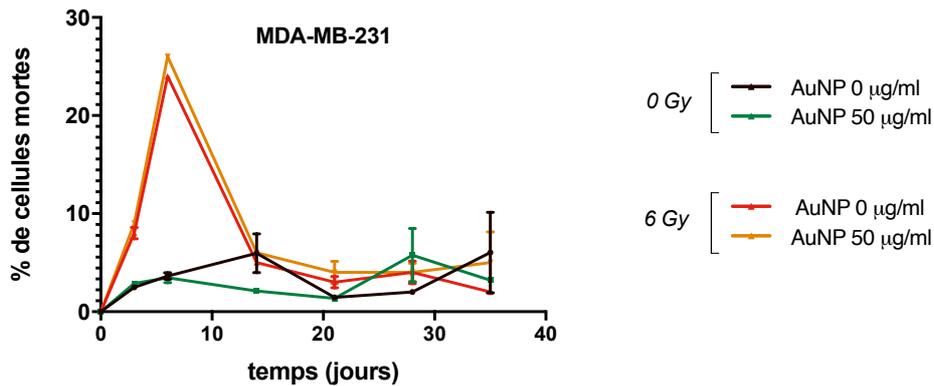


Figure 47 : Mortalité cellulaire mesurée par iodure de propidium des MDA-MB-231 irradiées ou non à 6 Gy suite au traitement par les AuNP-PEG-NH₂ à 50 µg/ml.

Néanmoins, nous observons une altération plus importante du cycle cellulaire en réponse au double-traitement par irradiation et nanoparticules. En réponse à l'irradiation seule (histogrammes rouges), les cellules MDA-MB-231 s'accumulent, comme attendu, en phase G2 et retrouvent un cycle normal après 14 à 21 jours. On observe également l'apparition d'une population pseudo-tétraploïde à J3 et une population en sub-G1 à J6. Le double-traitement augmente toutes ces altérations (histogrammes jaunes) avec notamment polyploïdie plus importante à J3 et maintenue après 6 jours, un pic sub-G1 plus important à J6 et un étalement de la phase S et G2 maintenu à 21 jours (Figure 48).

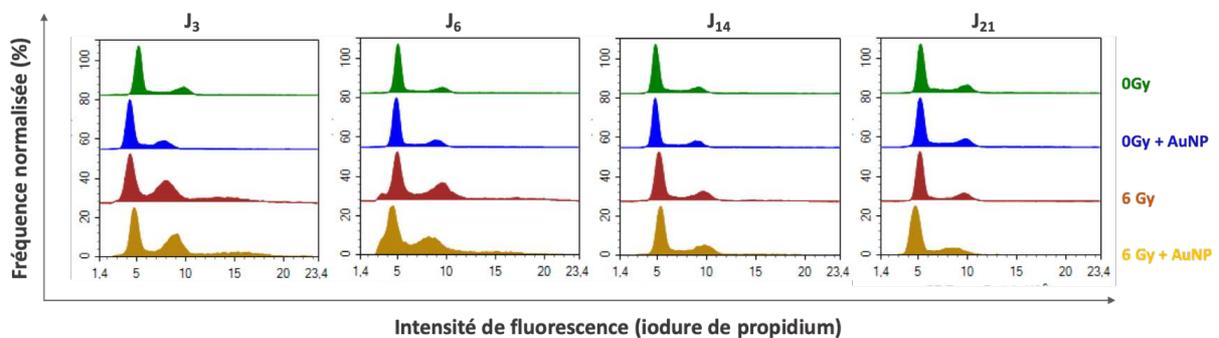


Figure 48 : Répartition dans le cycle cellulaire des MDA-MB-231 3, 6, 14 et 21 jours après le traitement par AuNP à 50 µg/ml et/ou une irradiation de 6 Gy.

Un point clef pour pouvant expliquer des résultats différents en fonction des lignées cellulaires concerne l'entrée et l'accumulation des AuNP dans les cellules. En effet la quantité et la répartition des nanoparticules dans les cellules sont des paramètres déterminants pour induire l'effet-Z et son intensité. De plus, si les quantités de nanoparticules internalisées sont proches des quantités limites nécessaires pour observer cet effet Z, l'absence de reproductibilité inter-lot pourrait s'expliquer par de subtiles modifications d'interactions cellules/AuNP et donc de la quantité de NP internalisées.

d. Internalisation des nanoparticules d'or de 32 nm

Pour analyser l'internalisation des AuNP, nous avons réalisé des dosages de l'or intra-cellulaire suite à l'exposition des lignées MDA-MB-231 et T47D.

Les dosages de l'or réalisés spectrométrie de masse (ICP-MS) nous ont permis d'estimer la quantité moyenne de nanoparticules internalisées par cellule : entre 0,08 et 0,13 pg d'or par cellule MDA-MB-231 et entre 0,015 et 0,07 pg d'or par cellule T47D (Figure 49). Ces dosages mettent en lumière une internalisation systématiquement différentielle d'un facteur 3 environ entre les lignées MDA-MB-231 et T47D, quels que soient les lots d'AuNP testés.

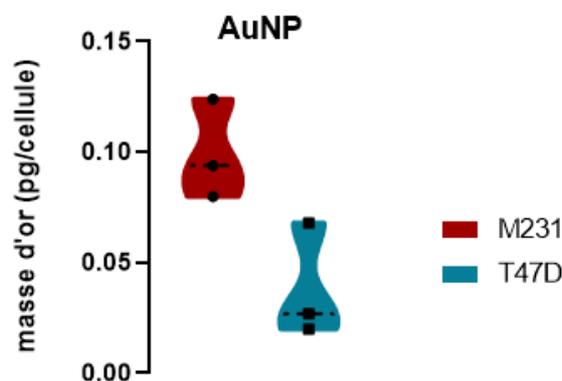


Figure 49 : Dosage par spectrométrie de masse de l'or internalisé dans les cellules MDA-MB-231 et T47D suite à leur exposition à des nanoparticules d'or AuNP-NH₂ à une concentration de 32µg/cm² pendant 24 heures.

Nous avons cherché à savoir si cette différence d'internalisation des nanoparticules d'or selon la nature cellulaire avait des conséquences sur leur stabilité intra-cellulaire. Ces questionnements ont été l'occasion pour le laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE) de valider la méthode de sp-ICP-MS (*single particle Inductively Coupled Mass Spectrometry*) qu'ils ont mis au point pour déterminer la

Résultats

concentration ainsi que la distribution en taille des nanoparticules dans nos cellules exposées (publication en annexe II).

Cette étude révèle l'absence d'agrégation des nanoparticules suite à leur internalisation par les cellules T47D et les MDA-MB-231. En effet, on retrouve une distribution en taille inchangée autour des 35 nm de diamètre dans la suspension mère d'AuNP et dans les échantillons cellulaires lysés de T47D et de MDA-MB-231 (Figure 50).

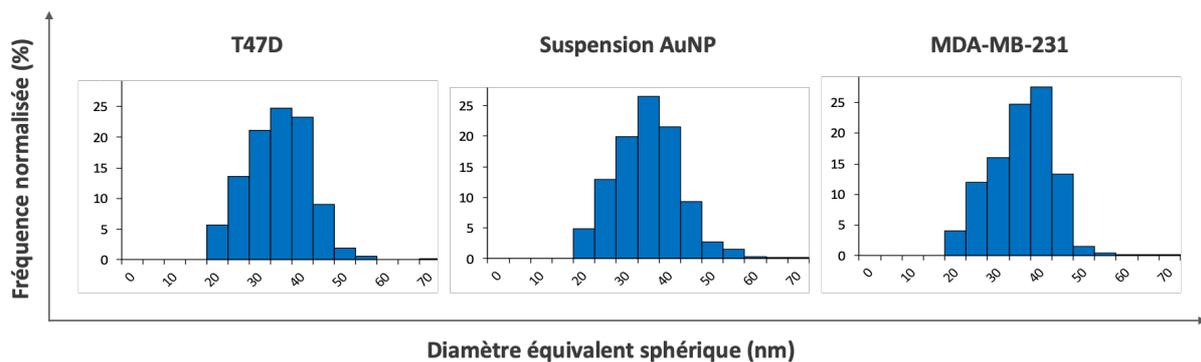


Figure 50 : Distribution en taille déterminée par sp-ICP-MS des nanoparticules d'or en suspension telles que synthétisées ou dans les lysats des cellules T47D et MDA-MB-231 après 24h d'exposition à la dose de 32µg/cm².

Les nanoparticules d'or se trouvant dans le même état d'agrégation pour les deux lignées mais avec une accumulation préférentielle dans les cellules MDA-MB-231 pour lesquelles le double-traitement par AuNP et irradiation perturbe l'impédance cellulaire, nous avons cherché à optimiser les conditions d'exposition pour augmenter l'entrée des nanoparticules et possiblement augmenter la probabilité de mettre en évidence un effet-Z.

e. Exposition prolongée aux nanoparticules d'or de 32nm

Nous avons choisi de prolonger l'exposition des lignées tumorales mammaires T47D et MDA-MB-231 aux nanoparticules de 32 nm afin de possiblement prolonger le temps d'internalisation. Au cours de 5 jours d'exposition aux AuNP, les culots cellulaires prennent progressivement macroscopiquement une teinte rouge rubis caractéristique des propriétés optiques des nanoparticules d'or ce qui suggère une accumulation intra-cellulaire (Figure 51.A).

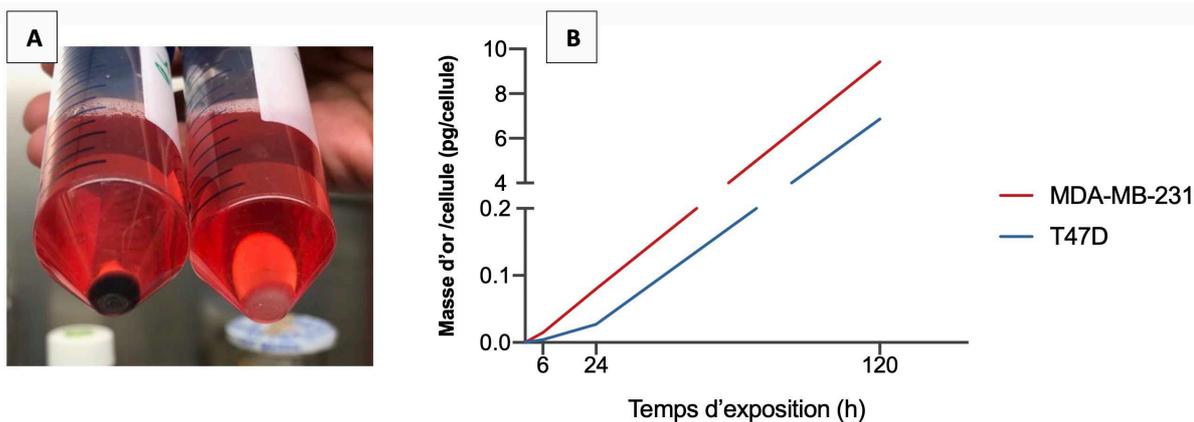


Figure 51 : (A) Photographie de culots cellulaires de MDA-MB-231 exposée (gauche) ou non (droite) aux AuNP-NH₂ à 32µg/cm² pendant 120 heures. (B) Dosage par spectrométrie de masse de l'or internalisé dans les lignées T47D et MDA-MB-231 suite à une exposition de 6, 24 et 120 heures.

Les dosages réalisés par spectrométrie de masse confirment cette accumulation progressive des AuNP. Le passage de 24 à 120 heures d'exposition permet ainsi d'augmenter cent fois l'entrée des nanoparticules d'or dans les MDA-MB-231 tout en maintenant quasiment constant le différentiel d'entrée avec les cellules T47D (Figure 51.B).

Ces conditions prolongées d'exposition aux nanoparticules d'or ne sont pas associées à une augmentation de la cytotoxicité (Figure 52) : le simple traitement par les AuNP n'impacte ni la survie ni la mortalité cellulaire des MDA-MB-231 et des T47D (courbes vertes).

Le pré-traitement prolongé des MDA-MB-231 est à l'origine d'un effet radio-sensibilisant qui intervient précocement en réponse à l'irradiation. En effet, on observe à la fois une diminution de la survie et une augmentation de la mortalité cellulaires six jours après l'irradiation (courbes oranges). Toutefois, l'augmentation de l'internalisation des AuNP ne suffit pas à induire un effet radio-sensibilisant sur les cellules épithéliales T47D.

L'effet radio-sensibilisant des MDA-MB-231 est associé à des modifications morphologiques des cellules qui sont plus étoilées, moins denses et moins contrastées (figure 53) confirmant une importante mortalité et une diminution de la prolifération cellulaire par rapport aux cellules simplement irradiées. Ainsi, l'effet radio-sensibilisant est bien confirmé pour les cellules MDA-MB-231 et il est en effet dépendant de la quantité de AuNP internalisées, il demeure cependant de faible ampleur. L'effet radio-sensibilisant n'a été observé qu'une seule fois en objectivant un délai à la reprise de croissance sur la lignée T47D et n'est par conséquent pas très robuste.

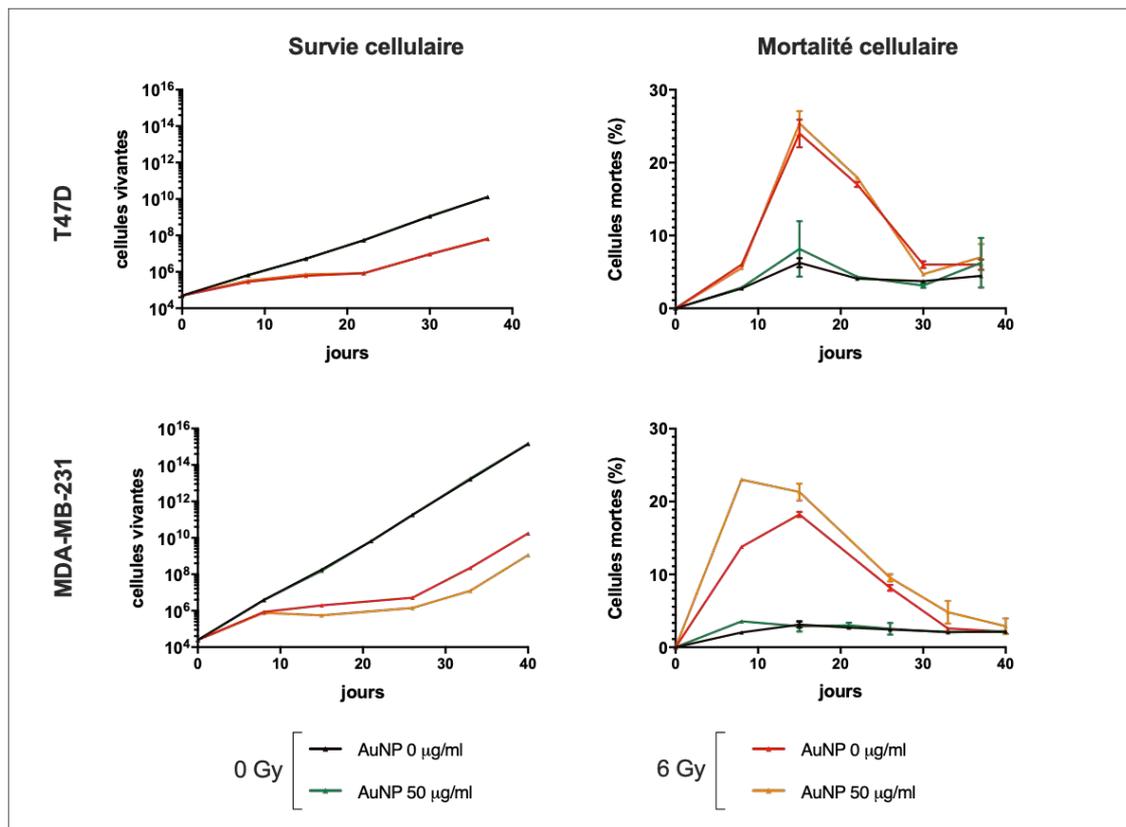


Figure 52 : Courbes de survie et de mortalité cellulaires des lignées T47D et MDA-MB-231 exposées 120 heures aux AuNP-NH₂ à 32 μg/cm² (correspondant à 50 μg/ml) avant une irradiation à 6 Gy.

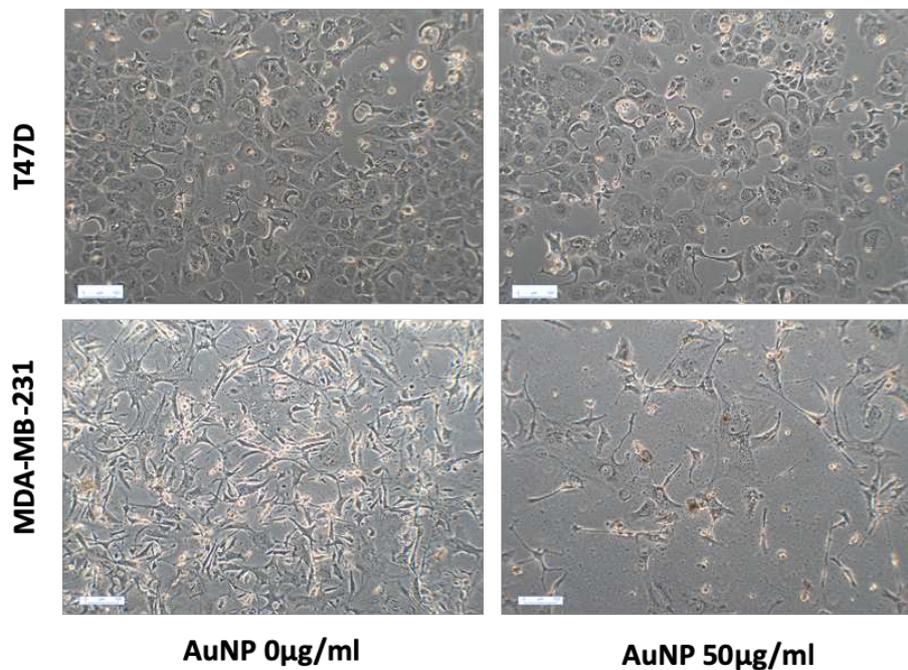


Figure 53 : Photomicrographies des cellules T47D et MDA-MB-231 9 jours après irradiation à 6 Gy suite à un prétraitement ou non par AuNP-NH₂ à la concentration de 32 μg/cm² (correspondant à 50 μg/ml).

Ces différences peuvent bien sûr provenir de la radio-sensibilité/radio-résistance intrinsèque des lignées cellulaires, à leur nature épithéliale/mésenchymateuse en lien avec leurs systèmes spécifiques d'adaptation au stress oxydant et à la prise en charge des dommages à l'ADN.

1.3 Étude du potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules d'or *in vivo*

Le potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules d'or est difficile à caractériser *in vitro* et nous n'observons des effets modérés que sur une seule des deux lignées testées. De plus, dans la littérature l'effet-Z est initialement décrit *in vivo*. Pour poursuivre nos recherches, nous avons donc étudié le potentiel des nanoparticules d'or de 32 nm en association avec des rayonnements ionisants sur des modèles murins de tumeurs mammaires. Suite aux constats d'interactions différentielles des nanoparticules d'or avec les cellules T47D et les cellules MDA-MB-231, il a semblé intéressant de travailler *in vivo* sur des tumeurs de type épithélial ou mésenchymateux.

a. Xénogreffes de lignées tumorales mammaires humaines

Pour comparer les observations faites *in vitro* avec celles du *vivo*, nous avons dans un premier temps greffé nos lignées tumorales mammaires humaines sur des modèles de souris immuno-déficientes.

Le premier écueil que nous avons rencontré fut relatif à la prise de greffe des cellules tumorales épithéliales. En effet, le faible pouvoir tumorigène des cellules T47D n'a pas permis d'obtenir des tumeurs palpables, quel que soit le nombre de cellules injectées (1 ou 5 millions) et quel que soit leur conditionnement en suspension dans une solution saline (PBS) ou dans du matrigel pour une meilleure cohésion.

A l'opposé, la prise de greffe des cellules tumorales mésenchymateuses MDA-MB-231 était rapide et indépendante du nombre de cellules injectées. L'injection de 5 millions de cellules provoque une croissance tumorale trop rapide qui ne permet pas d'évaluer l'effet de l'irradiation seule. Les tumeurs obtenues suite à l'injection d'1 million de cellules nous ont permis de d'analyser la réponse à une irradiation X localisée de 10Gy au SARRP (*small animal radiation research platform*).

Les tumeurs développées après l'injection de cellules en matrigel semblent atteindre une limite de prolifération en l'absence même d'irradiation ce qui rend ces conditions non pertinentes pour la poursuite de l'étude (Figure 54). Les tumeurs issues d'injections de cellules en PBS poursuivent leur croissance exponentielle en l'absence d'irradiation et leur volume double tous les sept jours (Figure 54 courbe bleue). Une irradiation de 10 Gy permet de retarder la croissance tumorale de 23 jours avant

Résultats

une reprise de croissance exponentielle (courbe rouge). Dans ces conditions, le doublement du volume tumoral n'intervient que 27 jours après l'irradiation. Dans ces conditions expérimentales, la progression tumorale, suite au traitement par des rayonnements ionisants à la dose de 10 Gy, libère une fenêtre d'observation pour la mise en évidence d'un effet surajouté d'un traitement préalable par des nanoparticules de haut-Z.

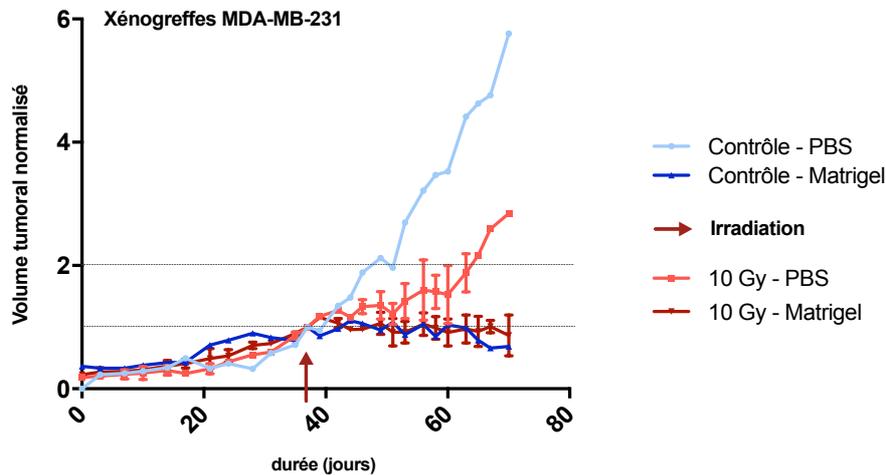


Figure 54 : Volume tumoral normalisé au moment de l'irradiation à 10 Gy (flèche rouge) des tumeurs obtenues par xénogreffe d'un million de cellules MDA-MB-231 humaines sur des souris immuno-déficientes.

Ainsi, ces conditions d'injection sous-cutanée d'un million de cellules MDA-MB-231 en suspension dans du PBS permettent donc d'établir rapidement des tumeurs palpables, au volume mesurable. Une fois ces conditions expérimentales établies, nous nous sommes rendus compte que la densité des tumeurs développées était forte et associée à une pression intra-tumorale élevée rendant très problématique l'injection des nanoparticules par voie intra-tumorale (IT). En effet, la pression intra-tumorale est telle que le volume de nanoparticules injecté manuellement ou plus lentement à l'aide d'un pousse seringue électrique ressort instantanément. Il n'est donc pas possible, pour ces tumeurs, de maîtriser la quantité de nanoparticules administrée.

Les résultats de ces expériences préliminaires nous ont conduit à considérer un autre modèle de tumeurs mammaires *in vivo*.

b. Radio-sensibilisation de tumeurs mammaires murines

Le modèle murin MMTV-PyMT développe spontanément des tumeurs mammaires dont la diversité reflète les différents stades de la carcinogenèse humaine. Ce modèle murin est immunocompétent et peut être utilisé pour étudier la progression tumorale mammaire et le développement de métastases pulmonaires.

Le développement de tumeurs mammaires est multiple chez les MMTV-PyMT et peut théoriquement atteindre les cinq paires de glandes mammaires (cervicales, thoraciques, abdominales et inguinales). Nous avons pu dénombrer jusqu'à sept tumeurs simultanément par souris mais avec une hétérogénéité de taille, de localisation et de vitesse de prolifération. Les tumeurs sont des masses souples dont la pression intra-tumorale est compatible avec une injection par cette voie.

Pour tester la pertinence de ce modèle, étudier la potentialisation de l'irradiation par les AuNP et étudier la répartition des AuNP au sein de la tumeur, nous avons tout d'abord injecté 75 µg d'AuNP de 32 nm suspendu dans une solution saline isotonique. Il est possible d'observer en microscopie en champ clair et en champ sombre la localisation/répartition de ces nanoparticules sur des coupes histologiques de tumeurs. En microscopie optique à fond clair, les nanoparticules apparaissent sous forme de points noirs et denses optiquement. La microscopie à fond noir permet de confirmer la présence de nanoparticules car celles-ci diffusent la lumière et se détachent en clair du fond noir.

Quarante-huit heures après l'injection, les nanoparticules semblent réparties de manière diffuse dans le cœur de la tumeur où elles ont été injectées sans suggérer de localisation cellulaire préférentielle (Figure 55).

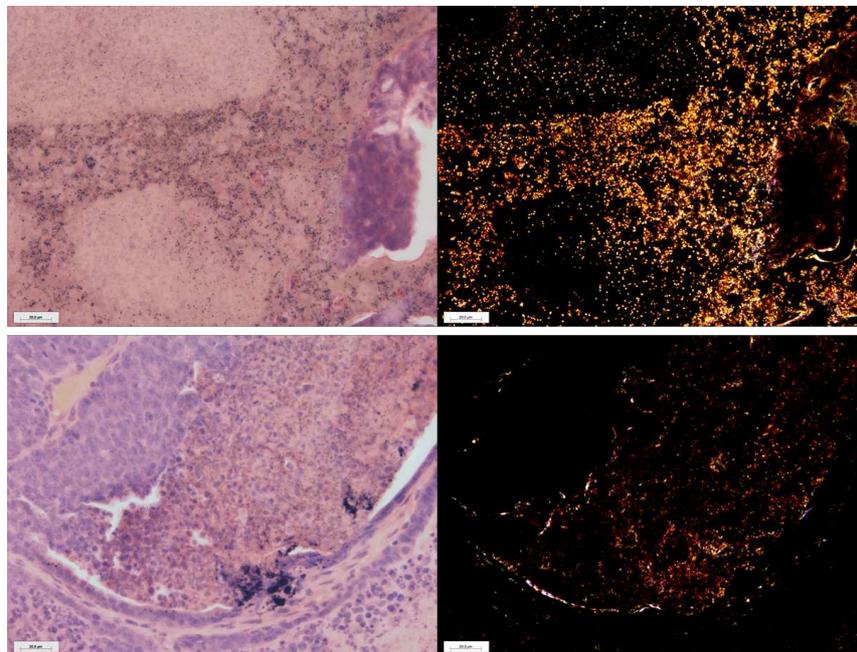


Figure 55 : Coupes histologiques d'une tumeur MMTV-PyMT 48 heures après l'injection de 75 µg d'AuNP colorées à l'hématoxyline-éosine et observées en microscopie optique à fond clair (gauche) et en microscopie à fond noir (droite).

Résultats

Quinze jours après l'injection, la distribution des nanoparticules a évolué et apparaît plus hétérogène. Les nanoparticules se trouvent soit en périphérie, dans le stroma tumoral (Figure 56 A, B, D), soit accumulées dans des structures cellulaires pouvant s'apparenter à des monocytes, à proximité de lumières ou de colloïdes (Figure 56 C, E, F).

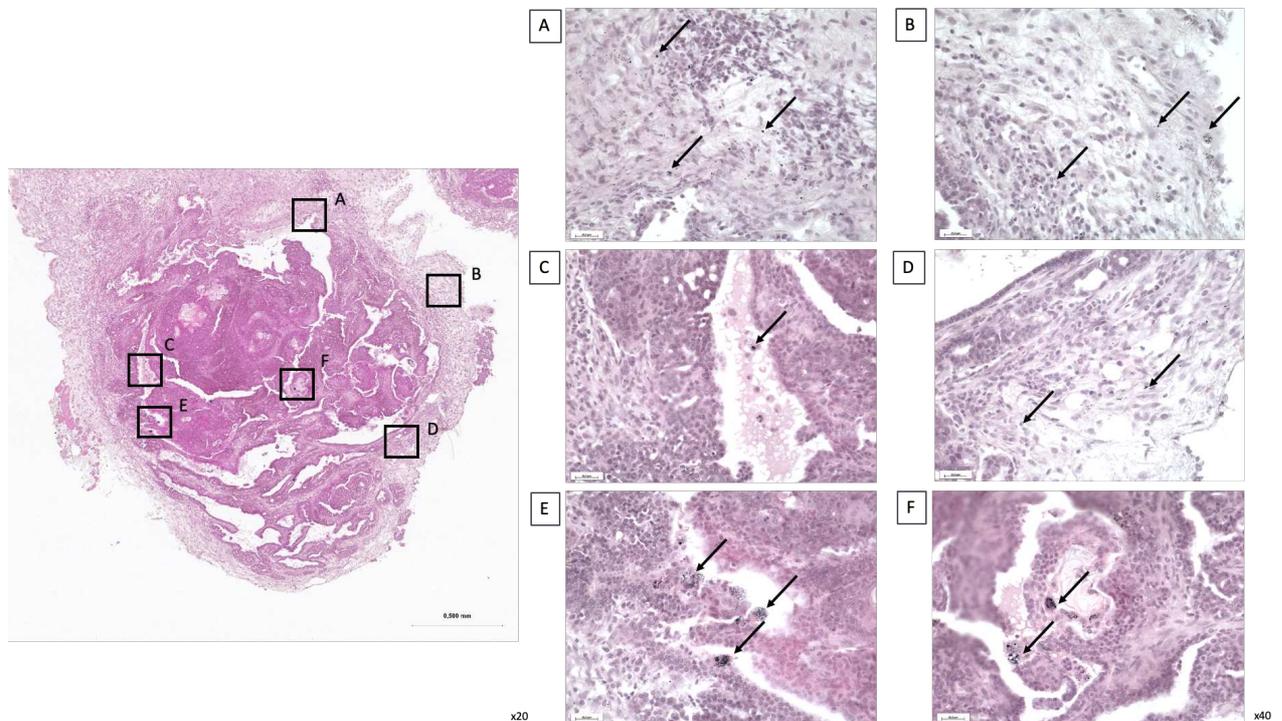


Figure 56 : Coupe histologique d'une tumeur MMTV-PyMT 15 jours après l'injection de 75 µg d'AuNP. La coupe est colorée à l'hématoxyline-éosine et observée en microscopie optique à fond clair.

Suite à l'injection intra-tumorale d'AuNP, nous avons mené une étude préliminaire afin de déterminer si ces nanoparticules pouvaient avoir un potentiel radio-sensibilisant *in vivo*. Nous avons donc irradié les tumeurs préalablement injectées d'AuNP dans les conditions d'irradiation définies avec les xénotransplantes de MDA-MB-231, à 10 Gy localement déposés à la tumeur par l'irradiateur X SARRP. Quatorze à dix-sept jours après le traitement, les tumeurs injectées avec les AuNP présentent une couleur noire (Figure 57).

Macroscopiquement, l'irradiation semble limiter la croissance tumorale et l'injection seule par les AuNP ne pas avoir d'effet. Le pré-traitement avec les AuNP semble potentialiser les effets de l'irradiation pour trois des quatre tumeurs doublement traitées (Figure 57).

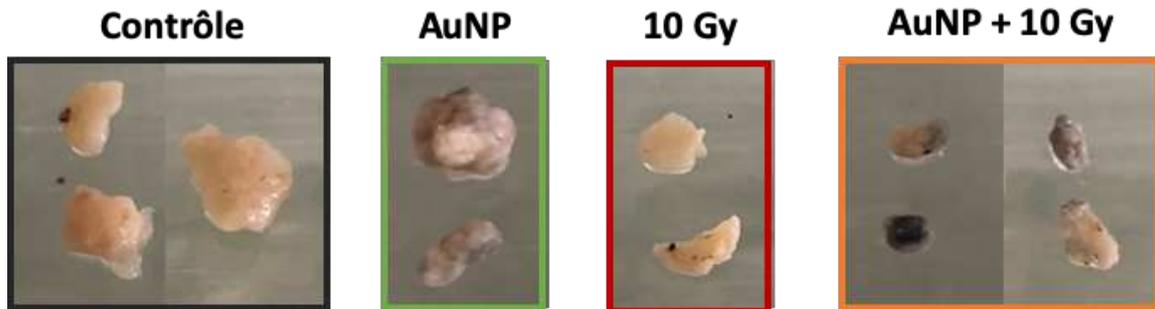


Figure 57 : Tumeurs mammaires cervicales quinze jours après leur traitement par AuNP et/ou leur irradiation localisée à 10 Gy au SARRP.

Le suivi des volumes tumoraux des souris non traitées (courbes noires) illustre l'hétérogénéité de la croissance tumorale chez ce modèle murin (Figure 58).

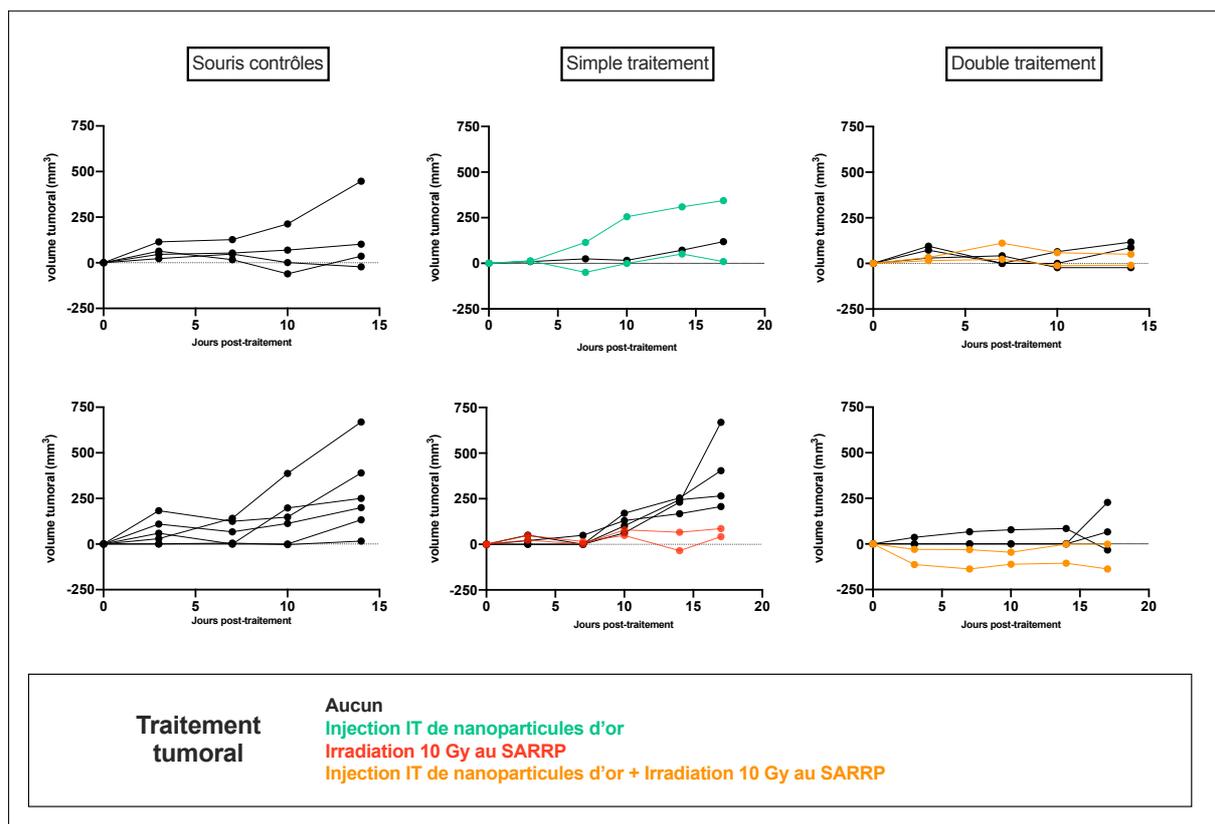


Figure 58 : Suivi des volumes tumoraux des souris contrôles, traitées par irradiation X à la dose de 10 Gy et/ou par injection intra-tumorale d'AuNP. Mesures bi-hebdomadaires réalisées au pied à coulisse.

L'irradiation des tumeurs à une dose de 10 Gy limite localement la croissance tumorale (courbes rouges) sans affecter la croissance des autres tumeurs portées par l'animal. L'injection intra-tumorale des nanoparticules d'or a un effet équivoque sur la croissance du volume tumoral (courbes vertes). Le

Résultats

double-traitement par les nanoparticules et l'irradiation provoque une stagnation ou une régression du volume tumoral (courbes oranges). Par ailleurs, les tumeurs non irradiées et non injectées, présentes sur les souris ayant reçu localement un double-traitement, n'évoluent pas non plus en terme de volume.

Comme pour les tumeurs simplement injectées, deux semaines après le double-traitement par les AuNP et l'irradiation, les nanoparticules se trouvent accumulées dans le stroma tumoral et dans des cellules de type phagocytaire qu'il reste à identifier. Les amas de nanoparticules sont optiquement denses et visibles en microscopie optique sur les coupes présentées figure 59. Ils sont le reflet d'une réorganisation active des nanoparticules au sein de la tumeur au cours du temps.

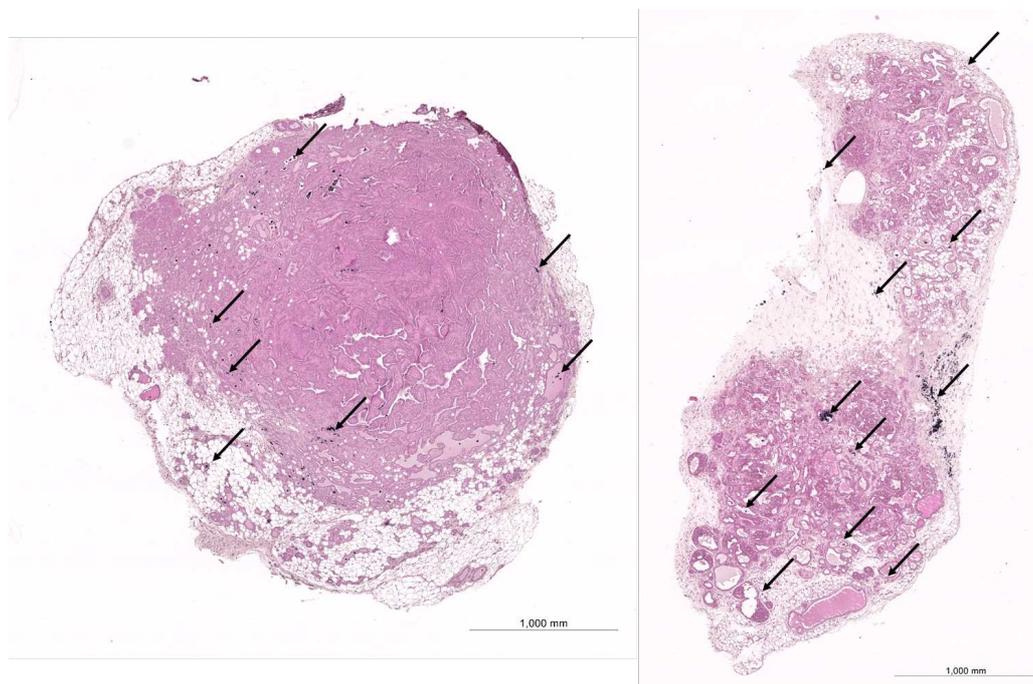


Figure 59 : Coupe histologique des tumeurs MMTV-PyMT 15 jours après un traitement par 75 μ g d'AuNP et une irradiation de 10 Gy. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline-éosine et observée en microscopie à fond clair. Les flèches désignent des structures où s'accumulent les AuNP.

Si l'on considère que la quantité de nanoparticules et leur répartition tumorale peuvent avoir un impact sur le potentiel radio-sensibilisant, comprendre leurs interactions avec les différentes populations cellulaires pour optimiser les plans de traitement se révèle alors déterminant.

Ainsi sur ce modèle de tumeurs mammaires murines, nous avons mis en évidence un effet potentialisateur des nanoparticules sur une irradiation X de 10 Gy. De manière intéressante, cet effet du double-traitement pourrait entraîner un effet abscopal possiblement médié par des acteurs de l'inflammation anti-tumorale puisque les tumeurs d'une même souris non injectées non irradiées semblent ne plus progresser.

2. Différentiel d'internalisation des nanoparticules

Comme nous l'avons expliqué, nous avons préalablement mis en évidence un différentiel d'entrée des nanoparticules d'or de 32 nm entre les cellules T47D de type épithélial et les cellules MDA-MB-231 de type mésenchymateux. Dans cette seconde partie, nous chercherons donc à comprendre les l'origine ou les raisons de ce différentiel. Dans la littérature, l'internalisation des nanoparticules est le plus souvent rattachée à leurs propriétés physico-chimiques. Nos premières observations nous montrèrent que le type cellulaire jouait manifestement un rôle important. L'objectif de cette seconde partie du travail a été de qualifier et quantifier l'internalisation intra-cellulaire des différentes nanoparticules selon la nature plus ou moins différenciée des cellules tumorales mammaires.

2.1 Étude du différentiel d'entrée des nanoparticules selon la nature épithéliale ou mésenchymateuse des cellules tumorales

a. Généralisation du différentiel d'entrée aux différentes nanoparticules

Afin de nous assurer que nos observations initiales d'entrée différentielle des AuNP dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses n'étaient pas spécifique des nanoparticules d'or de 32nm, nous avons quantifié l'entrée de nanoparticules présentant des propriétés physico-chimiques différentes : des nanoparticules de platine (PtNP) dont la taille primaire est de 4,5 nm et la charge de surface de -16mV, des nanoparticules de dioxyde de titane anatase (NM100) dont la taille primaire est de 110 nm et la charge de surface de -25 mV.

Sur une cinétique d'exposition de 2, 6 et 24 heures aux PtNP à une concentration de 0,5 mM, on observe une internalisation progressive des nanoparticules de platine dans les cellules MDA-MB-231 et T47D. Quel que soit le temps d'exposition, on observe une internalisation préférentielle des PtNP dans la lignée mésenchymateuse MDA-MB-231 (Figure1 de l'article PtNP).

Sur une gamme de 0 à 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, équivalent 0 à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, on observe également une internalisation croissante en fonction de la concentration en nanoparticules de dioxyde de titane NM100, les nanoparticules s'accumulant plus dans les cellules MDA-MB-231 que dans les cellules T47D. Quelle que soit la concentration de NM100, on observe toujours un différentiel d'entrée et d'internalisation préférentielles des nanoparticules dans la lignée mésenchymateuse MDA-MB-231 en comparaison à la lignée épithéliale T47D (Figure 60).

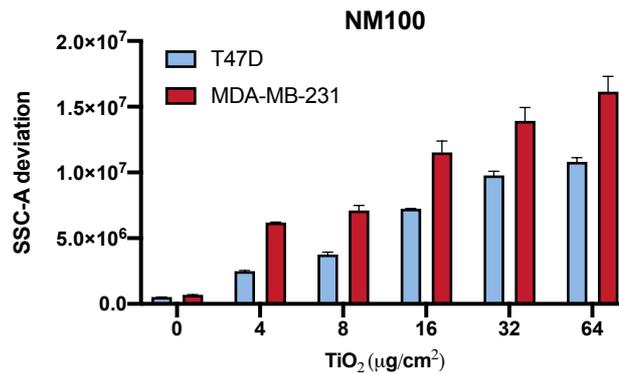


Figure 60 : Gamme d'internalisation des nanoparticules de dioxyde de titane NM100 par les cellules T47D et MDA-MB-231 après 24 heures d'exposition. La déviation du signal SSC en cytométrie de flux est une valeur moyenne calculée sur 10 000 cellules. Elle est proportionnelle à la quantité de nanoparticules internalisées ou fortement liées aux cellules.

A la lumière de ces observations nous montrant que cette internalisation différentielle entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses n'était spécifique ni de la taille ni de la composition chimique des NP, nous avons étudié si cela était spécifique du couple T47D/MDA-MB-231. Ainsi, nous avons quantifié par ICP-MS la masse d'or internalisée après exposition à des AuNP 32 nm de 8 lignées tumorales mammaires de nature plus ou moins différenciée : 4 lignées tumorales épithéliales (T47D, SKBR3, MCF-7, HMLE.E) et 4 lignées mésenchymateuses (MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-436, HMLE.M) (Figure 61).

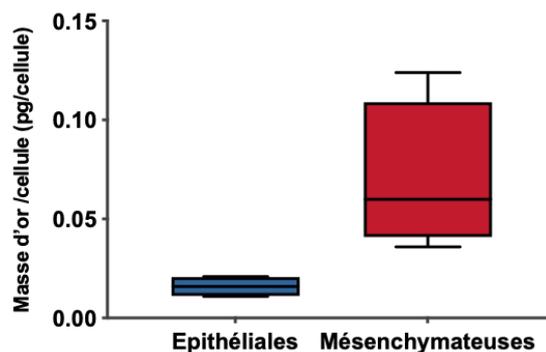


Figure 61 : Masse d'or internalisée par les lignées tumorales mammaires épithéliales (T47D, MCF-7, HMLE.E, SKBR3) et mésenchymateuses (MDA-MB-231, MDA-MB-157, HMLE.M, MDA-MB-436) suite à leur exposition à des AuNP-NH₂ de 32 nm à une concentration de 50 µg/ml. Les dosages sont réalisés par spectrométrie de masse.

b. Validation du différentiel sur des modèles cellulaires de transitions épithélio-mésenchymateuses induites *in vitro*

Suite au constat d'une entrée différentielle des nanoparticules d'or de 32 nm, de platine de 4,5 nm et de titane de 110 nm entre les lignées tumorales mammaires épithéliales et mésenchymateuses, nous avons cherché à confirmer l'impact de la nature épithéliale ou mésenchymateuse des cellules sur la quantité de nanoparticules internalisée, en éliminant tous biais qui seraient liés à des mutations ou des fonds génétiques particuliers dans les cellules épithéliales par rapport aux cellules mésenchymateuses. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles de cellules tumorales mammaires capables d'entreprendre une TEM *in vitro* en réponse à une exposition au TGF- β : les lignées cellulaires HMLE.E et MCF10-A. Ainsi pour étudier l'internalisation des nanoparticules en fonction du degré de différenciation des cellules tumorales, nous disposons de deux couples HMLE.E/HMLE.M et MCF10-A.E et MCF10-A.M, chacun des couples E et M ayant le même fond génétique.

L'utilisation de HMLE.E pour étudier la TEM *in vitro* est initialement décrite par le groupe de Weinberg. En réponse à une exposition à 5 ng/ml de TGF- β , les cellules épithéliales mammaires immortalisées perdent leur capacité d'adhérence, acquièrent des propriétés de mobilité et d'invasivité associées à des changements morphologiques (Figure 62.A) et phénotypiques.

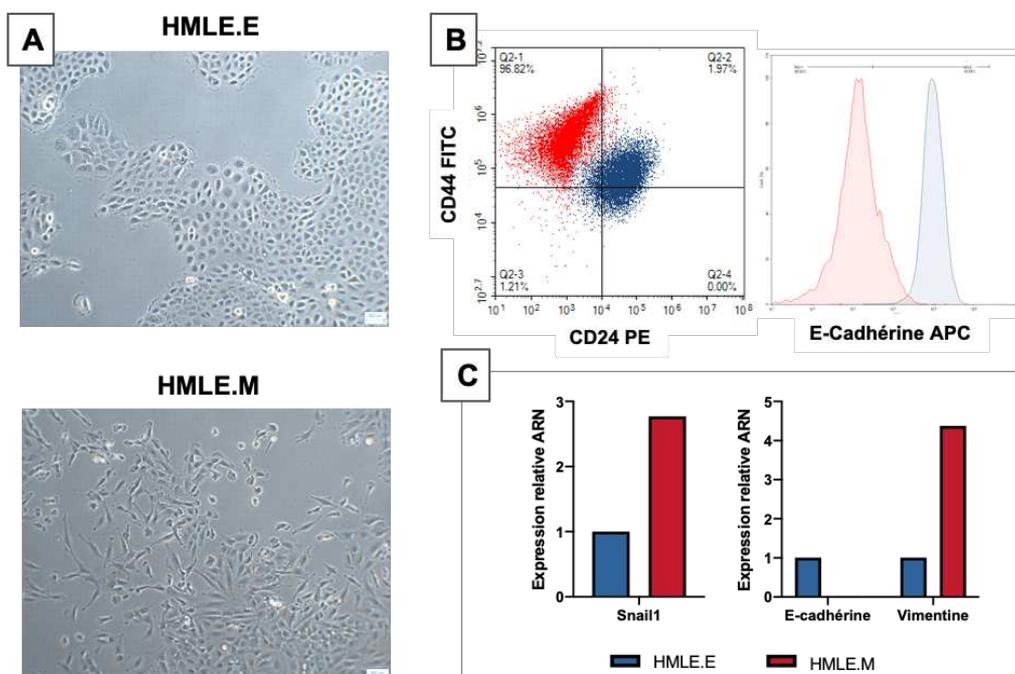


Figure 62 : **Transition épithélio-mésenchymateuse induite sur la lignée épithéliale mammaire HMLE.**

(A) Photomicrographies des HMLE.E et HMLE.M.

(B) Phénotypage en cytométrie de flux par les anticorps anti-CD24, -CD44, -E-cadhérine.

(C) Expression relative des ARNm de Snail 1, de la E-cadhérine et de la vimentine des HMLE.M vis-à-vis de l'expression de ces ARNm dans les HMLE.E.

Résultats

Nous observons également une augmentation de l'expression relative de l'ARNm du facteur de transcription Snail1, de la vimentine ainsi qu'une diminution de l'expression relative de l'E-cadhérine qui sont caractéristiques de la TEM (Figure 62.C). Ainsi, suite à un tri cellulaire, il est possible de travailler avec les populations distinctes HMLE.E caractérisées par un phénotype CD24⁺/CD44^{low}, riche en E-cadhérine et HMLE.M caractérisées par un phénotype CD24⁻/CD44⁺ pauvre en E-cadhérine (Figure 62.B).

Suite à l'exposition de ces deux populations cellulaires à une gamme de concentration de TiO₂ NM100, nous observons une entrée graduelle des nanoparticules dans les deux types cellulaires. Comme pour l'exposition des lignées T47D et MDA-MB-231, on observe un différentiel d'entrée en faveur du phénotype mésenchymateux de cette lignée tumorale mammaire (Figure 63).

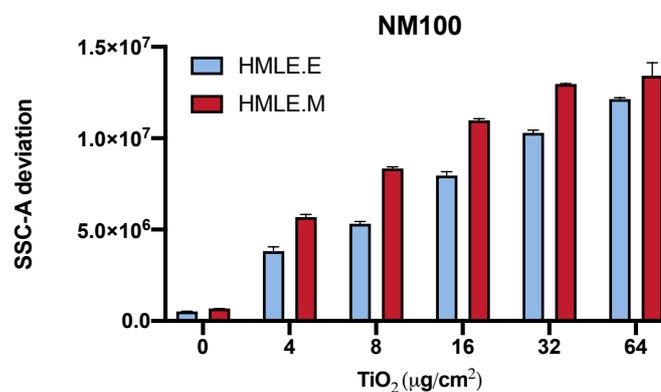


Figure 63 : Gamme d'internalisation des nanoparticules de dioxyde de titane NM100 par les cellules HMLE.E et HMLE.M. La déviation du signal SSC en cytométrie de flux est une valeur moyenne calculée sur 10 000 cellules. Elle est proportionnelle à la quantité de nanoparticules internalisées ou fortement liées aux cellules.

Nous avons également induit une EMT chez les cellules MCF10-A. Après dix jours de traitement par 10 ng/ml de TGF-β, la morphologie des MCF10A est totalement modifiée passant d'un aspect cuboïde à fibroblastique (Figure 64.A). Le traitement par TGF-β induit une légère augmentation de l'expression de CD24 et de CD44 membranaires ainsi qu'une diminution de l'expression de l'E-cadhérine (Figure 64.B).

Suite à ce traitement par TGF-β, nous observons une augmentation de l'expression relative de l'ARNm du facteur de transcription Snail1, de la vimentine ainsi qu'une diminution de l'expression relative de l'E-cadhérine qui sont caractéristiques de la EMT (Figure 64.C).

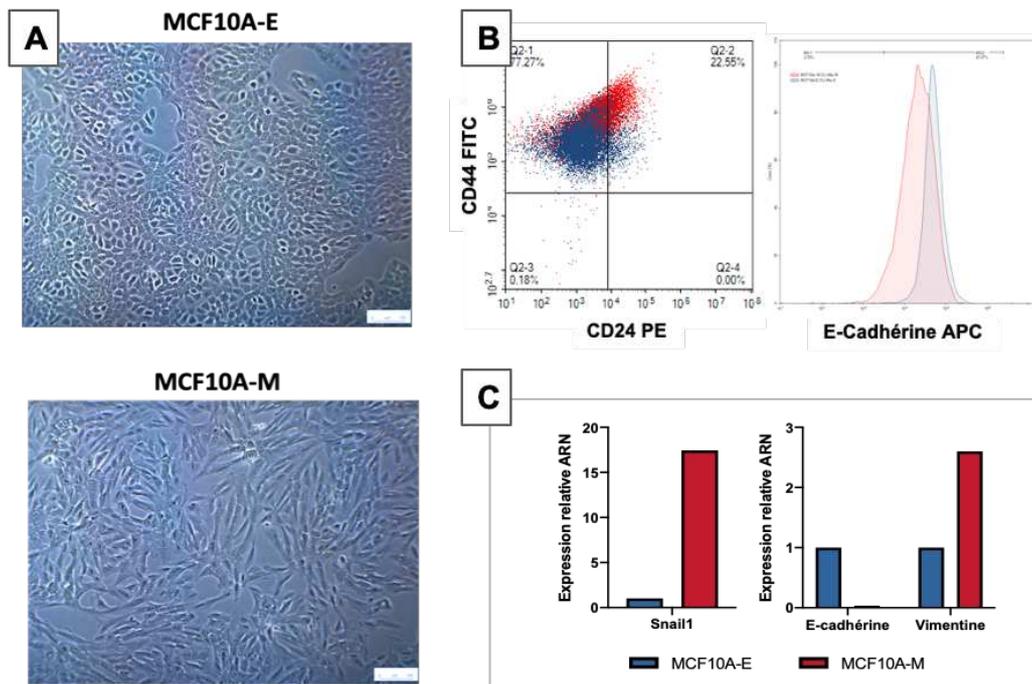


Figure 64 : Transition épithélio-mésenchymateuse induite sur la lignée épithéliale mammaire MCF10-A. (A) Photomicrographies des MCF10A-E et MCF10A-M après 10 jours de traitement par 10 ng/ml de TGF- β . (B) Phénotypage en cytométrie de flux par les anticorps anti-CD24, -CD44, -E-cadhérine. (C) Expression relative des ARNm de Snail 1, de la E-cadhérine et de la vimentine des MCF10A-M (après 13 jours de traitement par 10 ng/ml de TGF- β vis-à-vis de l'expression de ces ARNm dans les MCF10A-E).

Une fois, la transition épithélio-mésenchymateuse confirmée, nous avons exposé les phénotypes épithéliaux et mésenchymateux des MCF10A à deux nanoparticules de dioxyde de titane aux propriétés physico-chimiques différentes : NM100 et NM103 avec respectivement une taille primaire de 110 et de 25 nm. Nous pouvons observer que quelle que soit la nanoparticule, la déviation du signal SSC est majoré pour le phénotype mésenchymateux en comparaison au phénotype épithélial signant à nouveau un différentiel d'interaction de ces cellules avec les nanoparticules (Figure 65).

Le signal SSC reflétant la granularité des cellules excitées par un laser en cytométrie de flux, il est possible de quantifier la déviation de son faisceau en fonction de l'internalisation d'une nanoparticule donnée et donc de comparer pour une même nanoparticule l'internalisation dans différentes lignées cellulaires. Par contre, cette déviation étant très dépendante de la nature de la nanoparticule et n'apportant pas de mesure quantitative absolue des nanoparticules internalisées, il n'est pas possible de comparer les niveaux d'internalisation de nanoparticules différentes.

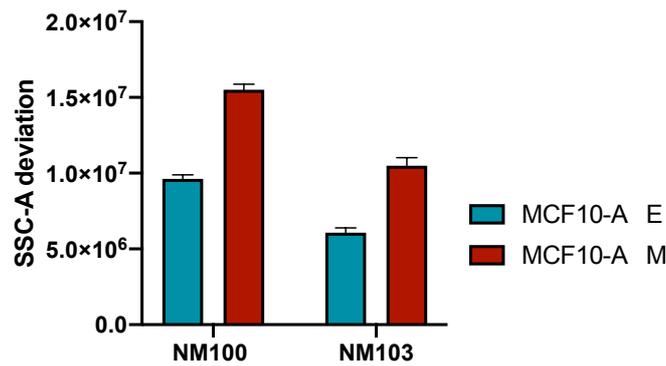


Figure 65 : Internalisation des nanoparticules de dioxyde de titane suite à l'exposition des cellules MCF10A-E et MCF10A-M à 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NM100 et NM103. La déviation du signal SSC en cytométrie de flux est une valeur moyenne calculée sur 10 000 cellules. Elle est proportionnelle à la quantité de nanoparticules internalisées ou fortement liées aux cellules.

Nous confirmons par ces dernières expériences, sur deux couples de cellules tumorales mammaires épithéliales/mésenchymateuses (chaque couple ayant le même fond génétique), que les nanoparticules entrent plus dans les cellules mésenchymateuses que dans les cellules épithéliales.

A ce point nos résultats soulignent que l'entrée différentielle des nanoparticules est fortement liée à la nature épithéliale ou mésenchymateuse des cellules tumorales mammaires, qu'elle n'est pas liée à des fonds génétiques spécifiques et que les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules ne sont pas les critères principaux gouvernant les mécanismes d'entrée, contrairement à ce qui est couramment admis dans la littérature.

2.2 Origines de l'internalisation différentielle des nanoparticules

a. Différences liées à la surface cellulaire

Dans un premier temps, nous avons écarté les hypothèses les plus triviales pouvant expliquer un différentiel d'entrée des nanoparticules. La surface cellulaire correspondant à l'interface d'interaction avec les nanoparticules, nous avons mesuré la surface apparente moyenne des paires cellulaires T47D/MDA-MB-231 et HMLE.E/M par l'imagerie des cellules vivantes. A faible confluence, on observe effectivement des différences de surface cellulaire exposée au sein des paires épithéliales/mésenchymateuses (Figure 66, 50%). L'imagerie en temps réel de ces cellules étant non destructive, il est possible de suivre l'évolution de la surface cellulaire moyenne au cours de la prolifération cellulaire. Ainsi, on observe qu'entre 50 et 90% de confluence, la surface cellulaire des lignées mésenchymateuses diminue progressivement alors que celle des lignées épithéliales est peu

impactée (Figure 66). A forte confluence, les surfaces cellulaires mesurées pour les différentes lignées sont alors comparables.

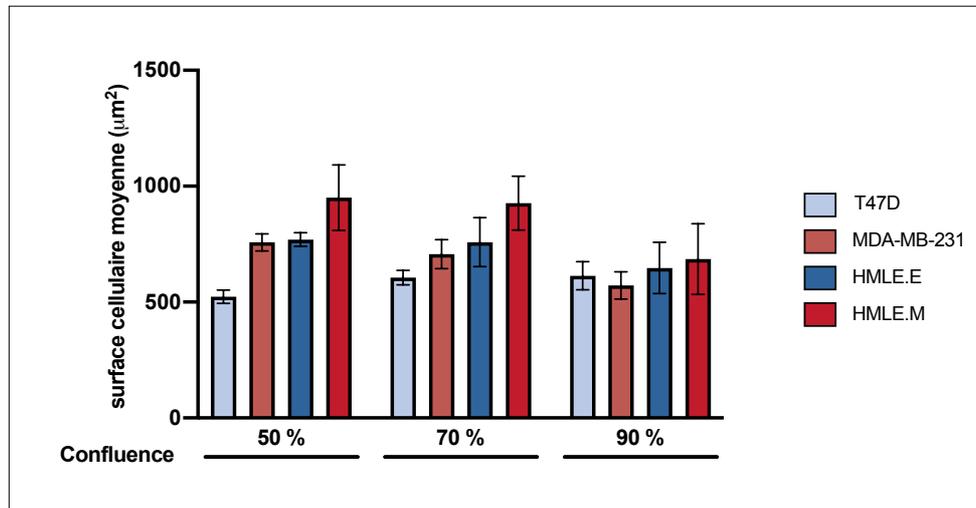


Figure 66 : Surface cellulaire moyenne des cellules épithéliales (T47D et HMLE.E) et mésenchymateuses (MDA-MB-231 et HMLE.M) selon leur degré de confluence en culture. La surface cellulaire moyenne correspond au quotient de la surface cellulaire totale par le nombre de noyaux comptés par champ en microscopie des cellules vivantes.

Face à ce constat, nous avons cherché à comprendre si la surface cellulaire, associée à une confluence cellulaire, participait au différentiel d'entrée des nanoparticules dans les modèles cellulaires épithéliaux et mésenchymateux. A ces fins, nous avonsensemencé les cellules HMLE.E et HMLE.M à des niveaux de confluence auxquels la différence entre les surfaces cellulaires est forte (50%), modérée (70%) et négligeable (90%) puis les avons exposées 24 heures aux nanoparticules de dioxyde de titane NM103 à une concentration de 16 µg/cm².

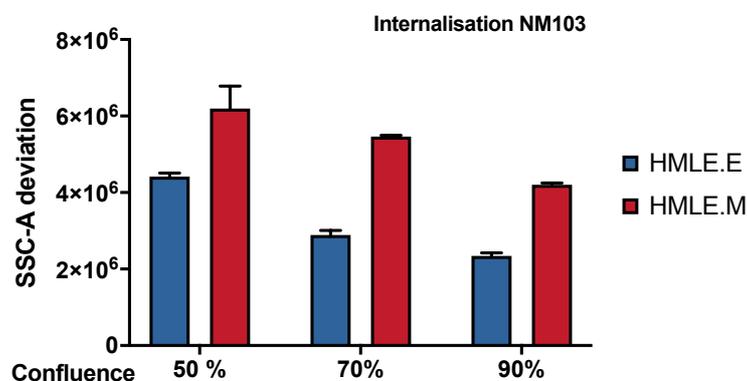


Figure 67 : Internalisation des nanoparticules de dioxyde de titane suite à l'exposition des cellules HMLE.E et HMLE.M,ensemencées à différents degrés de confluence, à une concentration de 16 µg/cm² de NM103. La déviation du signal SSC en cytométrie de flux est proportionnelle à la quantité de nanoparticules internalisées ou fortement liées aux cellules.

Quel que soit le modèle cellulaire, l'augmentation de la confluence diminue progressivement l'entrée des NM103 (Figure 67) mais le différentiel d'entrée dans les cellules HMLE.E et HMLE.M est présent quel que soit leur niveau de confluence, y compris à 90% pour lesquelles les surfaces cellulaires sont comparables.

Le différentiel d'entrée des nanoparticules persistant malgré des surfaces cellulaires comparables, nous retenons que les différences de surface membranaire entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses n'ont pas un rôle majeur pour expliquer l'interaction préférentielle des nanoparticules avec les cellules mésenchymateuses mammaires.

b. Différences liées à la dynamique d'internalisation

Au-delà de la surface membranaire à l'interface des cellules avec les nanoparticules, la dynamique des voies d'internalisation est susceptible d'influencer (différentiellement) l'entrée des nanoparticules.

Il est possible de limiter l'activation du métabolisme cellulaire en cultivant les cellules dans des conditions de température réduites, non optimales pour la mise en œuvre des mécanismes d'entrée actifs.

Nous avons donc abaissé la température durant l'exposition des HMLE.E et HMLE.M aux nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de la cyanine 5 fluorescente. Nous les avons exposées à 7°C sur une période limitée à deux heures au cours de laquelle il n'y a pas de surplus de mortalité. Pour les deux lignées cellulaires, on observe une réduction de l'intensité moyenne de fluorescence, relative à l'internalisation de ces nanoparticules (Figure 68). L'internalisation de la majeure partie des nanoparticules sur cette période résulte donc de la mise en œuvre de mécanismes actifs par les cellules épithéliales et mésenchymateuses. L'internalisation résiduelle des AuNP à 7°C peut être le reflet d'une entrée passive mais également d'une entrée active résiduelle.

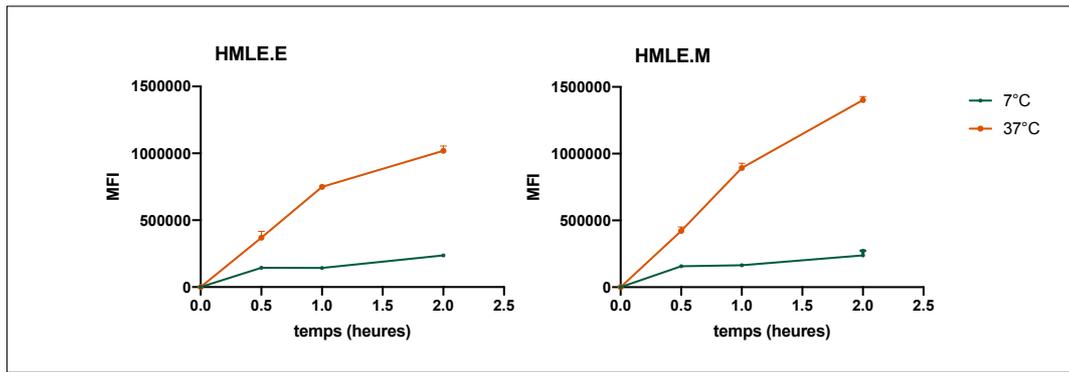


Figure 68 : Cinétique d'internalisation de 0 à 2 heures des AuNP@DTDTPA-Cya5 par les HMLE.E et HMLE.M en conditions métaboliques optimales (37°C) ou réduites (7°C). L'internalisation des nanoparticules est déterminée par l'intensité de fluorescence MFI en cytométrie de flux.

Les voies dépendantes de la clathrine et de la cavéoline font partie des mécanismes actifs d'endocytose. Nous avons donc cherché à savoir s'il existait des différences inhérentes dans l'expression des protéines de clathrine et la cavéoline 1 par les lignées mammaires épithéliales et mésenchymateuses. Nous avons mesuré en cytométrie de flux l'expression de ces protéines par immunofluorescence des paires de cellules T47D/ MDA-MB-231 et HMLE.E/M.

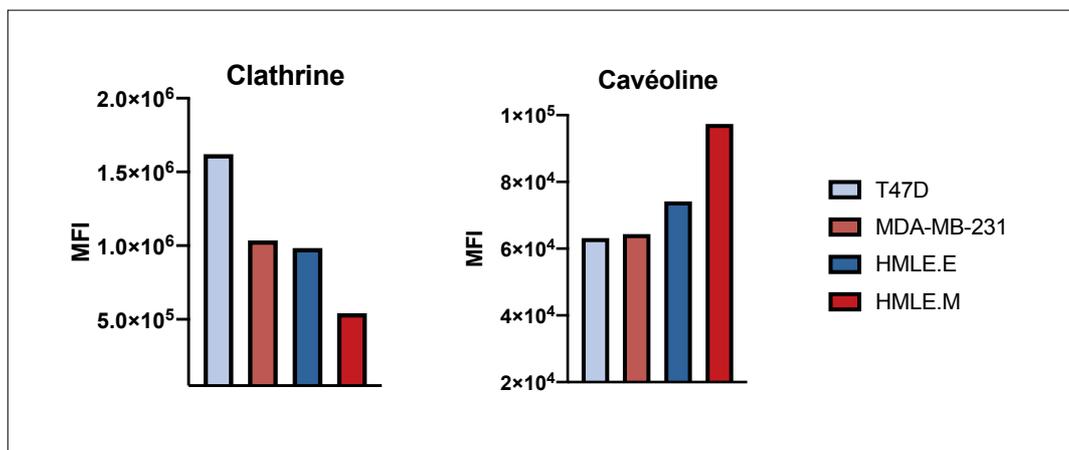


Figure 69 : Expression des protéines de clathrine et de la cavéoline dans les cellules tumorales T47D, MDA-MB-231, HMLE.E et HMLE.M. Les niveaux d'expression protéique sont donnés en intensité de fluorescence, mesurée par cytométrie en flux suite au marquage par immunofluorescence indirecte.

Pour chacune des paires cellulaires étudiées, le niveau d'expression des protéines de clathrine est en faveur des phénotypes épithéliaux T47D et HMLE.E (Figure 69). A l'inverse, on relève une expression plus importante de la cavéoline 1 dans les cellules HMLE.M que dans les cellules HMLE.E et une expression similaire dans les cellules T47D et MDA-MB-231.

L'expression basale des clathrines dans les cellules épithéliales et l'absence de différentiel d'expression des cavéolines entre les cellules T47D et MDA-MB-231 indiquent que ces voies d'endocytose ne

Résultats

peuvent pas être à l'origine du différentiel d'entrée en fonction de nature cellulaire épithéliale ou mésenchymateuse des cellules.

c. Différences liées aux capacités d'accumulation

Suite à l'entrée des nanoparticules, de meilleures capacités d'accumulation intra-cellulaire pourraient expliquer des différences quant aux quantités de nanoparticules internalisées.

Les observations faites en microscopie électronique à transmission sur les cellules MDA-MB-231 montrent une endocytose des nanoparticules de platine selon un mécanisme actif impliquant la formation de vésicules à la membrane plasmique (Figure 70.A). Les vésicules sont ensuite transportées « en grappe » jusqu'aux lysosomes, leurs organelles de destination (Figure 70.B et C).

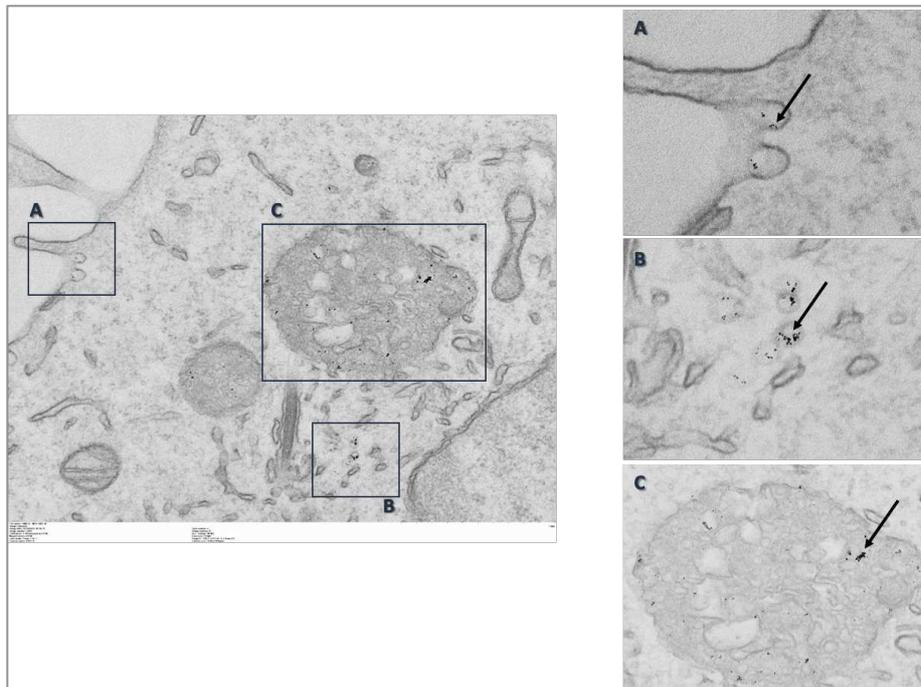


Figure 70 : Photomicrographie électronique de cellules MDA-MB-231 exposées 24 heures aux nanoparticules de platine.

L'accumulation lysosomale des nanoparticules est également observée en microscopie photonique à fluorescence suite à l'exposition des lignées T47D, MDA-MB-231, HMLE.E et HMLE.M aux nanoparticules d'or couplées à la cyanine 5. En effet, le lysotracker, qui permet d'imager les structures cellulaires acides, émet une fluorescence verte qui se superpose à la fluorescence rouge de la cyanine 5 pour les quatre modèles cellulaires (Figure 71). Il y'a donc co-localisation de ces nanoparticules avec des compartiments intra-cellulaires acides dont font partie les lysosomes.

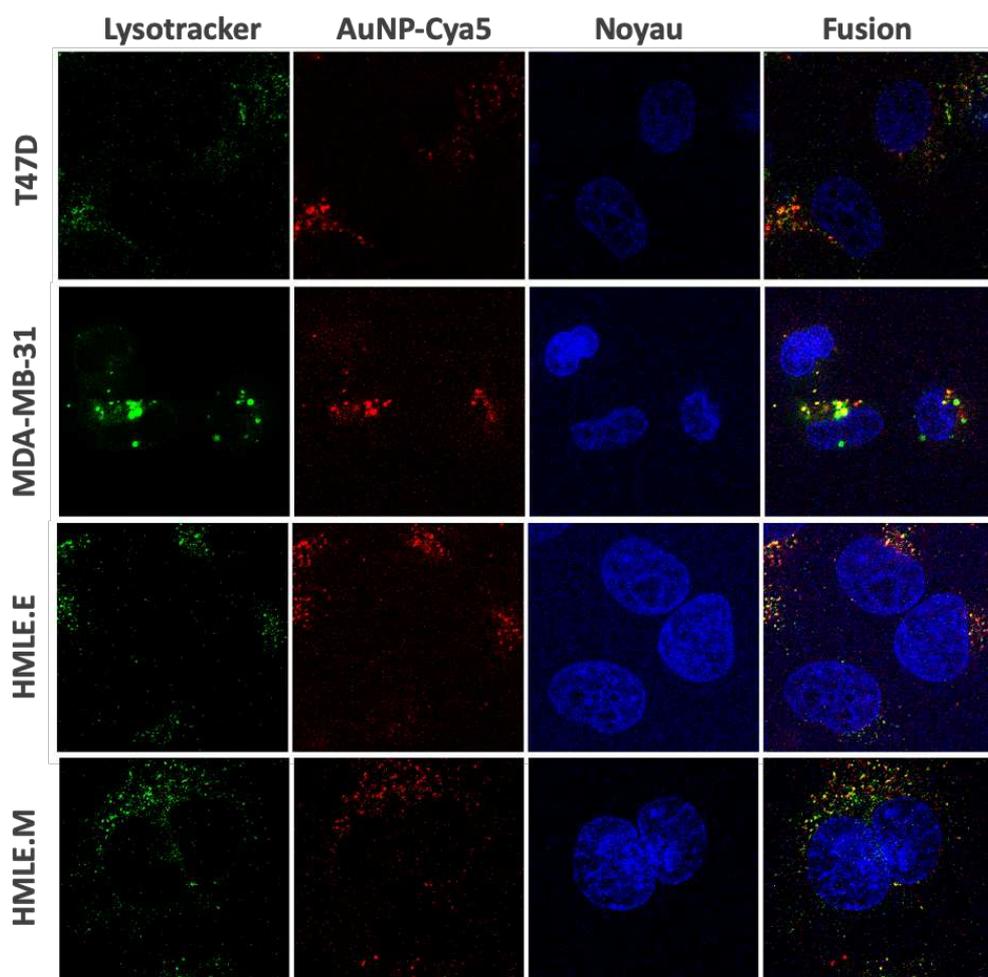


Figure 71 : Microphotographies en fluorescence des lignées T47D, MDA-MB-231, HMLE.E, HMLE.M exposées 24 heures aux AuNP@DTDTPA-Cya5 à une concentration équivalente de 25 µg/ml. Les lysosomes sont marqués au lysotracker vert (ex/em : 504/511 nm) et les noyaux au Hoechst 33342 (ex/em : 350/460 nm).

Sur ces microphotographies, on observe des différences dans la répartition en nombre et en intensité du lysotracker avec un aspect plus regroupé pour les cellules T47D et MDA-MB-231 que pour les lignées HMLE.E et HMLE.M.

Le marquage au lysotracker, permettant une analyse quantitative par cytométrie en flux, nous avons mesuré la quantité basale des lysosomes dans ces lignées cellulaires ainsi que leur potentielle induction en réponse à un traitement par des nanoparticules de dioxyde de titane NM100 et NM103.

A l'état basal, on ne retrouve pas de différentiel dans la quantité de lysosomes qui serait « généralisable » à la nature épithéliale ou mésenchymateuse cellulaire. En effet, les cellules T47D présentent une intensité de fluorescence supérieure aux cellules MDA-MB-231 et les cellules HMLE.M aux HMLE.E (Figure 72). Le nombre initial de lysosomes dans lesquels les nanoparticules se concentrent n'est pas lié aux capacités d'accumulation cellulaire de celles-ci.

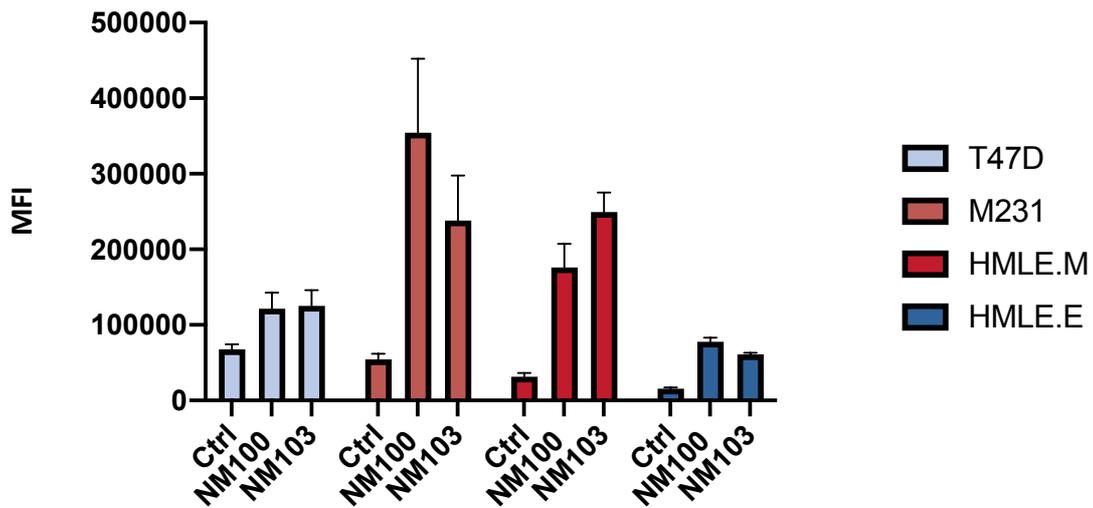


Figure 72 : Mesure quantitative des lysosomes dans les lignées T47D, MDA-MB-231, HMLE.E et HMLE.M exposées ou non 24 heures aux nanoparticules de dioxyde de titane NM100 et NM103 à une concentration de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La fluorescence du lysotracker est mesurée par cytométrie en flux et exprimée en intensité moyenne de fluorescence (MFI).

Vingt-quatre heures après l'exposition aux nanoparticules NM100 et NM03, on observe une induction du nombre de lysosomes dans toutes les lignées cellulaires. Cette induction est néanmoins beaucoup moins marquée dans les deux lignées tumorales épithéliales que dans les lignées tumorales mésenchymateuses qui voient leur nombre de lysosomes au moins quadrupler (Figure 72).

La dynamique d'induction des lysosomes dans les cellules mésenchymateuses pourraient alors soit causer soit résulter d'une internalisation préférentielle des nanoparticules.

d. Différences liées aux capacités d'exocytose

La quantité de nanoparticules internalisées à un instant t résulte d'un équilibre entre leur entrée et leur efflux. Ainsi, l'observation du différentiel que nous observons entre les lignées E et M pourrait résulter d'une plus grande adaptation des cellules tumorales épithéliales à leur microenvironnement. En effet, les cellules épithéliales pourraient mettre en œuvre des mécanismes de défense comme l'exocytose qui pourraient expliquer une plus faible accumulation intra-cellulaire.

Pour étudier l'efflux, nous avons quantifié les NP intra-cellulaires suite à 24h d'exposition puis après lavages et donc sevrage, nous avons suivi l'évolution de la quantité intra-cellulaire de NP au cours du temps. Ainsi, Suite à une exposition de 72 heures aux nanoparticules de dioxyde de titane NM103, les quantités de nanoparticules accumulées dans les cellules HMLE.E et HMLE.M atteignent un plateau à 24h reflétant un équilibre entre l'endocytose et l'exocytose des nanoparticules (Figure 73). Après 24

heures, la quantité de NM103 internalisée est donc quasi maximale, laissant une large marge pour la mise en évidence de possibles phénomènes d'efflux.

Après 24h d'exposition, un lot de cellules HMLE.E ou HMLE.M a été lavé et incubé dans du milieu de culture sans nanoparticules (sevrage indiqué par la flèche sur la figure 73. Dans les deux lignées cellulaires HMLE.E et HMLE.M on observe une diminution progressive de la quantité de nanoparticules : après 48 heures de sevrage les cellules HMLE.E et HMLE.M présentent respectivement 1,6 et 2 fois moins de nanoparticules NM103 (Figure 73).

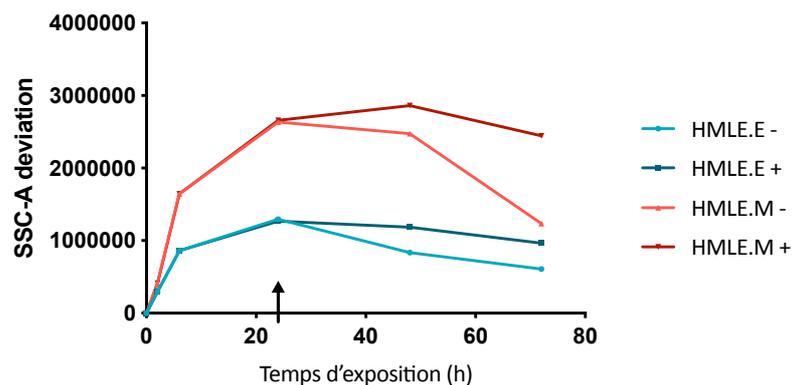


Figure 73 : **Cinétique d'internalisation et d'efflux des nanoparticules de dioxyde de titane NM103 dans les lignées HMLE.E et HMLE.M.** Les contrôles (HMLE.E + et HMLE.M +) sont exposés pendant 72 heures à une concentration de $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NM103. Les capacités d'efflux sont mesurées suite à une pré-exposition de 24 heures aux NM103 avant lavage (flèche noire) et donc sevrage des cellules en nanoparticules (HMLE.E - et HMLE.M -). La déviation du signal SSC en cytométrie de flux est une valeur moyenne calculée sur 10 000 cellules. Elle est proportionnelle à la quantité de nanoparticules internalisées ou fortement liées aux cellules.

Le temps de doublement des deux lignées cellulaires étant similaire, environ 24 heures, la moindre diminution de la quantité de nanoparticules dans les cellules E n'est pas le reflet d'une répartition des nanoparticules dans moins de cellules filles par rapport aux cellules mésenchymateuses. Par conséquence, la diminution de la quantité de nanoparticules dans les cellules HMLE.E est moins importante que celle des HMLE.M. Ces observations écartent ainsi l'hypothèse d'une exocytose préférentielle des nanoparticules dans les modèles cellulaires épithéliaux.

Nous avons mis en évidence une différence d'entrée de nanoparticules de différentes natures chimiques, tailles et charges de surface entre les lignées épithéliales et mésenchymateuses mammaires, en excluant des spécificités qui seraient liés à un fond génétique particulier. Comme ni la surface cellulaire, ni les capacités d'internalisation préexistantes ou induites au cours de l'exposition aux nanoparticules, ni les capacités d'efflux semblent expliquer ce différentiel, nous avons formulé une hypothèse, moins fonctionnelle mais plus structurelle, qui place la matrice extracellulaire au cœur des interactions des cellules tumorales mammaires avec les nanoparticules.

2.3 Étude du rôle de la matrice extra-cellulaire dans l'internalisation des nanoparticules

a. Étude de la réponse transcriptomique

Pour nous orienter sur les voies d'entrée des nanoparticules mises en jeu dans les cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules épithéliales, nous avons réalisé une étude transcriptomique sur le modèle de cellules épithéliales mammaire HMLE capable d'entreprendre une transition épithélio-mésenchymateuse en réponse au TGF- β exogène. Si l'expression du phénotype des cellules HMLE.E (CD24⁺/CD44^{low}) et HMLE.M (CD24⁻/CD44⁺) diffère, les cellules partagent un même fond génétique.

Pour nous affranchir d'une réponse transcriptomique différentielle qui serait liée à une nanoparticule donnée, nous avons exposé chacune des cellules épithéliales et mésenchymateuses à 4 nanoparticules de nature, taille et surface différentes (Figure 74.A) et avons analysé le transcriptome après 24 et 48h d'exposition. Nous avons recherché les gènes dont l'expression était comparable pour chacune des lignées quelle que soit la particule mais dont le profil était différentiel entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses (Figure 74.B).

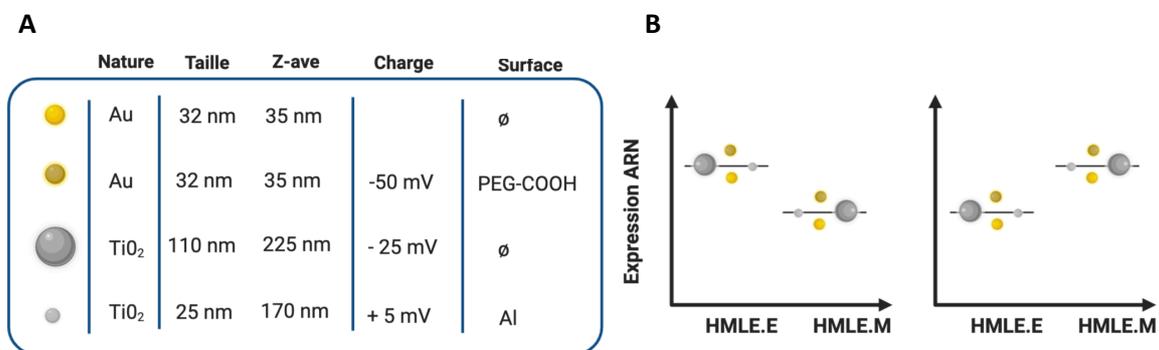


Figure 74 : **Conception de l'étude transcriptomique.** (A) Principales propriétés physico-chimiques des nanoparticules étudiées pour leur réponse transcriptomique sur les lignées HMLE.E et HMLE.M. (B) Profil de sélection des gènes ayant une réponse transcriptomique commune aux différentes nanoparticules et différentielle entre les lignées HMLE.E et HMLE.M.

La recherche des gènes dont le niveau d'expression est commun en réponse aux différentes nanoparticules après 24 et 48 heures d'exposition pour chacune des lignées, puis la comparaison des deux listes a permis d'établir une liste de 526 gènes présentant un différentiel de niveau d'expression entre les HMLE.E et HMLE.M. Parmi eux, l'analyse de l'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA)

permet d'effectivement identifier l'enrichissement dans le module définissant la transition épithélio-mésenchymateuse pour les cellules HMLE.M en comparaison aux cellules HMLE.E (Figure 75).

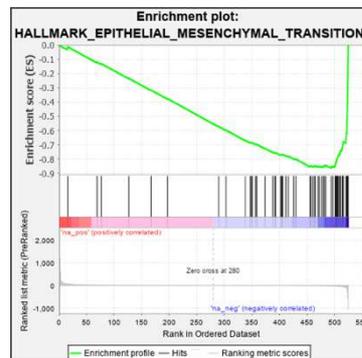


Figure 75 : Analyse de l'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) pour les caractéristiques de la transition épithélio-mésenchymateuse. La dérégulation est négative (bleue) pour le ratio HMLE.E/HMLE.M, en faveur d'un enrichissement dans les cellules HMLE.M traitées aux nanoparticules.

Le regroupement GSEA des gènes dérégulés en ontologie identifie principalement un enrichissement du compartiment de la matrice extra-cellulaire (MEC) ainsi que des voies et processus biologiques associés à son organisation pour les cellules HMLE.M en comparaison aux cellules HMLE.E (tableau 9). Cet enrichissement significatif semble en partie lié aux voies relatives à la structuration de la MEC et notamment des protéoglycanes et du collagène.

Pour les cellules HMLE.E, nous observons plutôt un enrichissement relatif dans les modules en lien avec les structures de jonctions cellulaires dont font partie les desmosomes, le développement épithélial et la différenciation des épithéliums en structures matures. Ces résultats sont cohérents avec la nature épithélio-mésenchymateuse différentielle des lignées HMLE.E et soulignent l'importance du compartiment extra-cellulaire dans la réponse spécifique des cellules mésenchymateuses mammaires aux nanoparticules quelles que soient leurs propriétés physico-chimiques.

Parallèlement, on relève l'enrichissement dans la signature en lien avec la fixation cellulaire de substrats pour les cellules HMLE.M exposées aux nanoparticules en comparaison aux cellules HMLE.E. Cette analyse renforce ainsi nos observations préalables d'une interaction préférentielle des nanoparticules avec les cellules de nature mésenchymateuses peu différenciée et sur l'importance du compartiment extra-cellulaire dans la différence d'interactions cellulaires des nanoparticules.

Résultats

Tableau 9 : Analyse de l'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) pour l'ontologie des gènes en termes de compartiments cellulaire (GO cellular component), de processus biologiques (GO biological process), ainsi que de voies biologiques décrites dans la base de données Reactome.

HMLE.M					
	Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes in Overlap (k)	p-value	FDR q-value
GO cellular component	EXTRACELLULAR_MATRIX	A structure lying external to one or more cells, which provides structural support, biochemical or biomechanical cues for cells or tissues.	39	8.64 e-37	5.64 e-34
	COLLAGEN_CONTAINING_EXTRACELLULAR_MATRIX	An extracellular matrix consisting mainly of proteins (especially collagen) and glycosaminoglycans (mostly as proteoglycans) that provides not only essential physical scaffolding for the cellular constituents but can also initiate crucial biochemical and biomechanical cues required for tissue morphogenesis, differentiation and homeostasis. The components are secreted by cells in the vicinity and form a sheet underlying or overlying cells such as endothelial and epithelial cells.	36	1.13 e-36	5.64 e-34
Reactome	EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION	Extracellular matrix organization	29	1.25 e-30	1.88 e-27
	COLLAGEN_FORMATION	Collagen formation	13	1.24 e-16	9.3 e-14
	ECM_PROTEOGLYCANS	ECM proteoglycans	12	6.19 e-16	3.09 e-13
GO Biologic Process	BIOLOGICAL_ADHESION	The attachment of a cell or organism to a substrate, another cell, or other organism. Biological adhesion includes intracellular attachment between membrane regions.	49	9.1 e-31	6.69 e-27
	EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION	A process that is carried out at the cellular level which results in the assembly, arrangement of constituent parts, or disassembly of structures in the space external to the outermost structure of a cell. For cells without external protective or external encapsulating structures this refers to space outside of the plasma membrane, and also covers the host cell environment outside an intracellular parasite.	32	1.86 e-30	6.85 e-27
HMLE.E					
	Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes in Overlap (k)	p-value	FDR q-value
GO cellular component	CELL_CELL_JUNCTION	A cell junction that forms a connection between two or more cells in a multicellular organism; excludes direct cytoplasmic junctions such as ring canals.	15	4.44 e-12	4.45 e-9
	DESMOSOME	A cell-cell junction in which: on the cytoplasmic surface of each interacting plasma membrane is a dense plaque composed of a mixture of intracellular anchor proteins; a bundle of keratin intermediate filaments is attached to the surface of each plaque; transmembrane adhesion proteins of the cadherin family bind to the plaques and interact through their extracellular domains to hold the adjacent membranes together by a Ca2+-dependent mechanism.	6	9.09 e-11	4.09 e-8
Reactome	FORMATION_OF_THE_CORNIFIED_ENVELOPE	Formation of the cornified envelope	13	8.58 e-17	1.29 e-13
	KERATINIZATION	Keratinization	13	8.12 e-14	6.09 e-11
	DEVELOPMENTAL_BIOLOGY	Developmental Biology	18	3.46 e-9	1.73 e-6
GO Biologic Process	EPIDERMIS_DEVELOPMENT	The process whose specific outcome is the progression of the epidermis over time, from its formation to the mature structure. The epidermis is the outer epithelial layer of an animal, it may be a single layer that produces an extracellular material (e.g. the cuticle of arthropods) or a complex stratified squamous epithelium, as in the case of many vertebrate species.	24	2.67 e-23	1.96 e-19
	EPITHELIUM_DEVELOPMENT	The process whose specific outcome is the progression of an epithelium over time, from its formation to the mature structure. An epithelium is a tissue that covers the internal or external surfaces of an anatomical structure.	33	2.22 e-22	8.16 e-19

b. Synthèse différentielle de l'acide hyaluronique

Confortés dans l'hypothèse d'un rôle de la MEC dans le différentiel observé de l'entrée des nanoparticules selon la nature épithélio-mésenchymateuse cellulaire, nous avons donc formulé l'hypothèse que l'acide hyaluronique pourrait être un acteur clef impliqué dans les interactions différentielles des nanoparticules avec les cellules épithéliales ou mésenchymateuses. En effet, dans la recherche d'une compréhension mécanistique, ce composant majeur de la matrice extra-cellulaire est le principal ligand de CD44, marqueur emblématique des cellules mésenchymateuses mammaires et non exprimé dans les cellules épithéliales.

Ainsi, dans un premier temps pour expliquer le différentiel d'entrée, nous suggérons que, quelles que soient leurs propriétés physico-chimiques, l'entrée des nanoparticules serait opportuniste via une interaction avec l'acide l'hyaluronique en lien avec son récepteur CD44 (Figure 76).

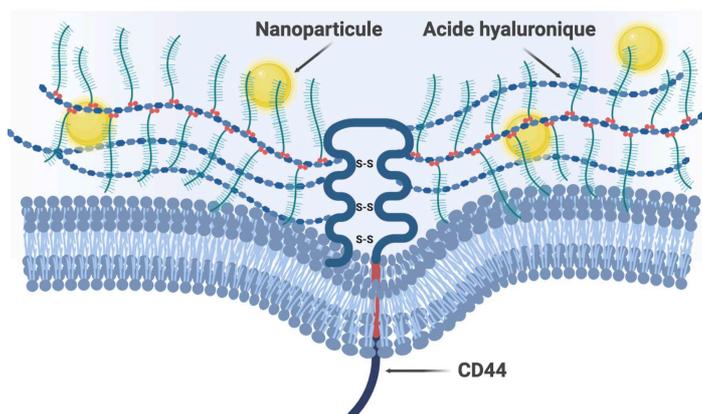


Figure 76 : Hypothèse d'une entrée opportuniste des nanoparticules dans les cellules tumorales mésenchymateuses mammaires en lien avec leur interaction avec l'acide hyaluronique lié à CD44. Réalisé avec BioRender.

Sur la base de l'analyse du transcriptome, nous avons recherché l'expression du gène HAS2 qui code pour la Hyaluronane Synthase de type 2, impliquée dans la synthèse d'acide hyaluronique. Le niveau d'expression de HAS2 est inférieur dans les HMLE.E par rapport aux HMLE.M (Figure 77.A). Suite à l'exposition aux différentes nanoparticules, l'abondance relative des transcrits de HAS2 est comparable au sein de chaque lignée quelle que soit la nanoparticule et le temps d'exposition (Figure 77.B). Nous avons ensuite validé par RT-qPCR l'expression différentielle du gène HAS2 en mesurant l'abondance relative de ses transcrits dans 3 lignées épithéliales et 3 lignées mésenchymateuses. L'expression de HAS2 est homogène dans les lignées épithéliales T47D, ZR75-1 et HMLE.E. A l'inverse, l'expression de cette enzyme est 800 fois plus élevée dans les lignées mésenchymateuses HMLE.M, MDA-MB-231, MDA-MB-157 que dans la lignée HMLE.E (Figure 77.C).

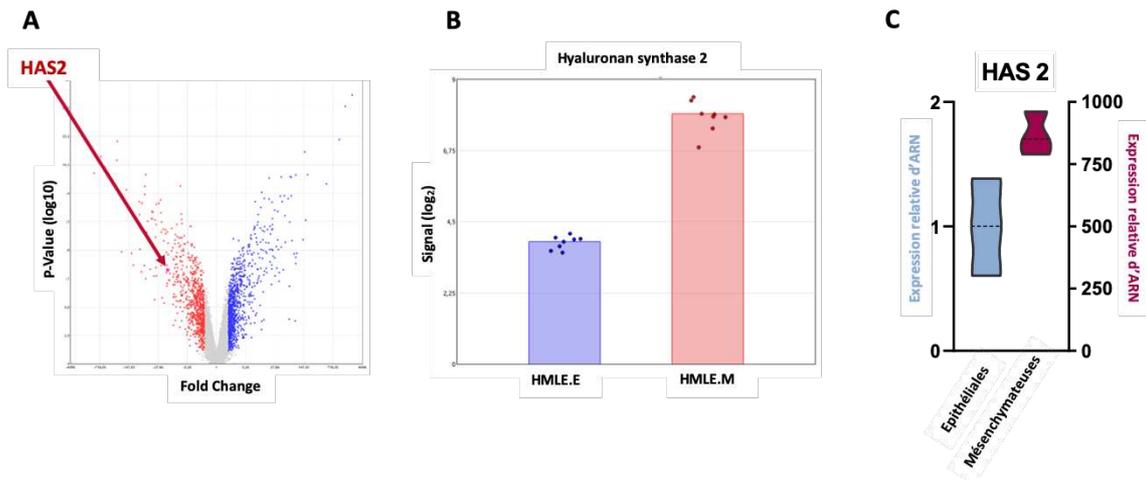


Figure 77 : **Expression différentielle des transcrits de la hyaluronane synthase de type 2 par les cellules HMLE.E et HMLE.M.** (A) Transcriptome :Volcano plot du ratio HMLE.E/HMLE.M, illustrant la dérégulation négative (rouge) ou positive (bleue) de l'expression des gènes en réponse à l'exposition aux nanoparticules. (B)Transcriptome : abondance relative des transcrits de HAS2 dans les cellules HMLE exposées 24 et 48 heures aux nanoparticules.(C) RT-qPCR : expression relative des transcrits de HAS2 par les lignées épithéliales T47D, ZR75-1 (axe Y gauche) et les lignées mésenchymateuses HMLE.M, MDA-MB-231, MDA-MB-157 (axe Y droit) vis-à-vis de l'expression de ces transcrits par HMLE.E en RT-qPCR.

Nous avons cherché si l'expression différentielle de cette enzyme, impliquée dans la synthèse d'acide hyaluronique, était à l'origine d'une production différentielle d'acide hyaluronique dans les modèles cellulaires plus ou moins différenciés. La protéine de liaison à l'acide hyaluronique (HABP pour *hyaluronic acid binding protein*) couplée à la biotine permet ainsi d'imager l'acide hyaluronique en fluorescence *via* sa reconnaissance par de la streptavidine couplée à un Alexa Fluor.

En fluorescence, on observe une abondance et une répartition différentes de l'acide hyaluronique dans les quatre lignées cellulaires. En comparant les lignées T47D/MDA-MB-231 et HMLE.E/M deux à deux, on observe un marquage plus intense dans les lignées mésenchymateuses (Figure 78.A). Dans les lignées HMLE, le marquage de l'acide hyaluronique est réduit à quelques points pour le phénotype épithélial alors qu'il semble associé à des fibres pour le phénotype mésenchymateux. Ces observations sont confirmées par la reconstruction en trois dimensions des images acquises dans le volume cellulaire (Figure 78.B). Dans les cellules T47D et MDA-MB-231, si le différentiel quantitatif est en faveur de la lignée mésenchymateuse, le différentiel qualitatif de la structure du marquage est plus difficile à exprimer. On observe le marquage de fibres courtes dans les T47D, d'une structure intermédiaire entre celui des lignées HMLE.E et HMLE.M. Pour MDA-MB-231, l'intensité du marquage ne permet pas de distinguer des structures particulières ni en 2 ni en 3 dimensions.

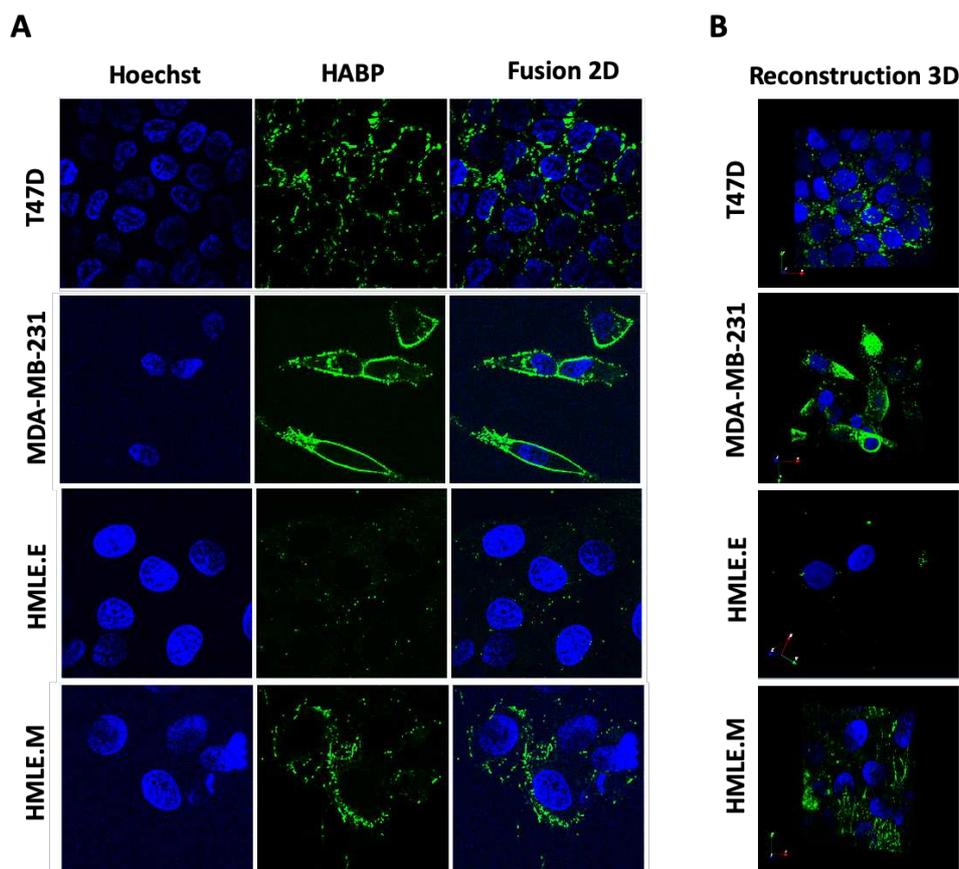


Figure 78 : Expression de l'acide hyaluronique : microphotographie en fluorescence des lignées T47D, MDA-MB-23A, HMLE.E et HMLE.M colorées au Hoechst 33342 colorant les noyaux cellulaires (ex/em : 350/460 nm) et à l'HABP (Hyaluronic acid binding protein) couplée à la biotine reconnue par la streptavidine-AlexaFluor488 (ex/em : 490/520 nm) permettant d'imager l'acide hyaluronique. (A) Microphotographies confocales. (B) Reconstruction en trois dimensions des acquisitions confocales à différents niveaux cellulaires.

c. Expression différentielle du récepteur à l'acide hyaluronique

L'expression de l'enzyme HAS2 ainsi que la production d'acide hyaluronique semblent donc différentielles selon la nature épithélio-mésenchymateuse cellulaire. Le principal récepteur membranaire de l'acide hyaluronique est le cluster de différenciation CD44. Son expression à la surface des cellules tumorales mammaire est également un marqueur de la nature mésenchymateuse mammaire. En effet, le phénotypage membranaire de huit lignées tumorales mammaires nous permet de discriminer les phénotypes épithéliaux ($CD24^+/CD44^{low}$) T47D, SKBR3, ZR75-1, MCF7, HMLE.E des phénotypes mésenchymateux ($CD24^{low}/CD44^+$) MDA-MB-157, MDA-MB-436, MDA-MB-231, SUM159PT et HMLE.M (Figure 79). Si la nature épithéliale ou mésenchymateuse des MCF10A a pu être montrée sur la figure 64.C par l'activation de facteurs de transcription et l'expression de protéines

Résultats

emblématiques de la transition épithélio-mésenchymateuse, le phénotype CD24/CD44 ne permet pas de classer ce modèle.

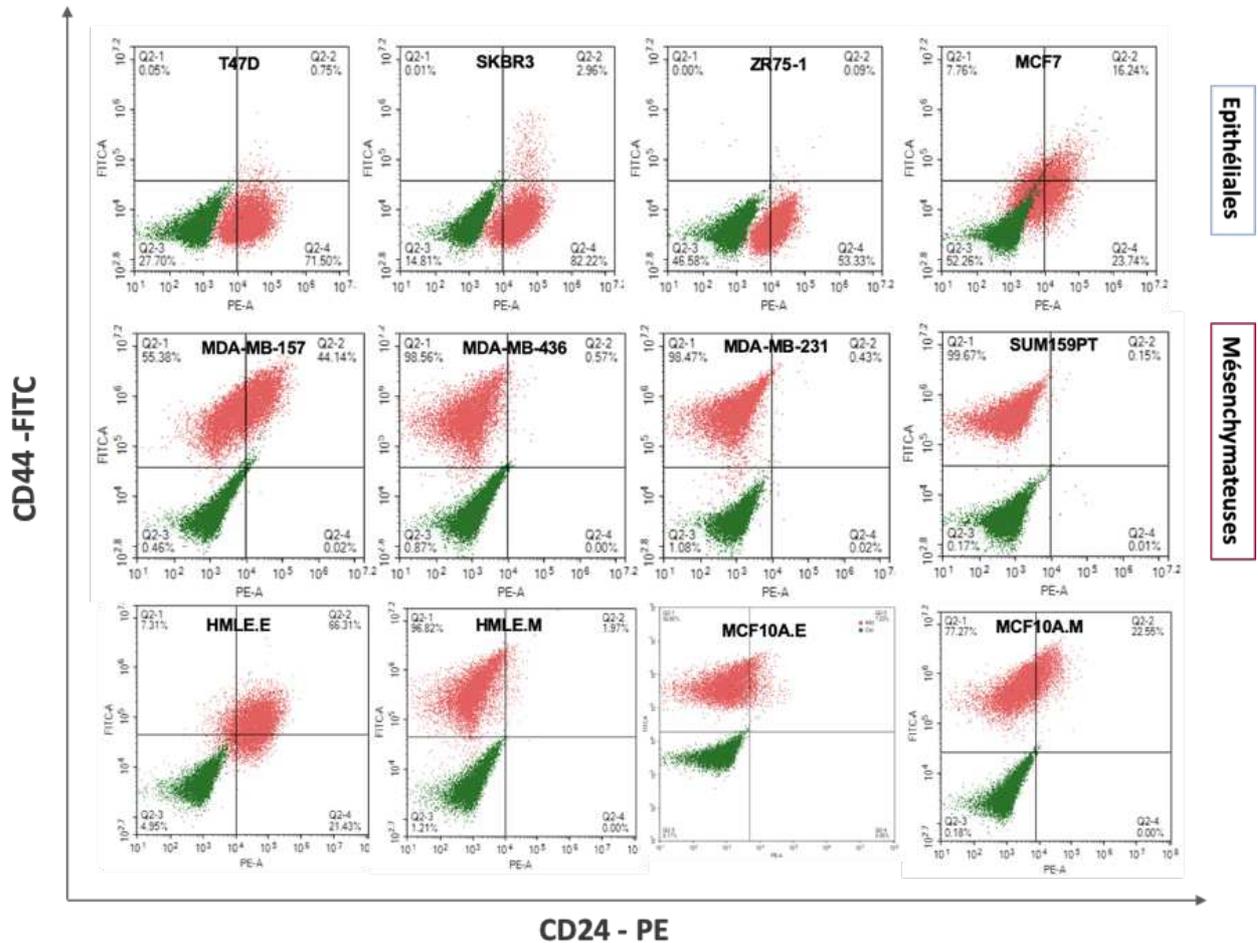


Figure 79 : Phénotypage membranaire d'un panel de lignées tumorales épithéliales et mésenchymateuses mammaires. Le phénotypage est réalisé en cytométrie en flux suite aux marquages de CD44 par un anticorps couplé au FITC et de CD24 par un anticorps couplé au PE.

L'expression du transcrite de CD44 est différentielle entre les lignées épithéliales et mésenchymateuses mais celle-ci est hétérogène avec une expression de CD44_{total} dans cellules mésenchymateuses allant de 1 à 7 fois celle de la lignée HMLE.E (Figure 80). Néanmoins, si l'on regarde l'expression spécifique du variant « s » issu de l'épissage alternatif de CD44, on observe un différentiel beaucoup plus net avec 12 à 100 fois plus de transcrits dans les lignées mésenchymateuses que dans la lignée HMLE.E (Figure 80).

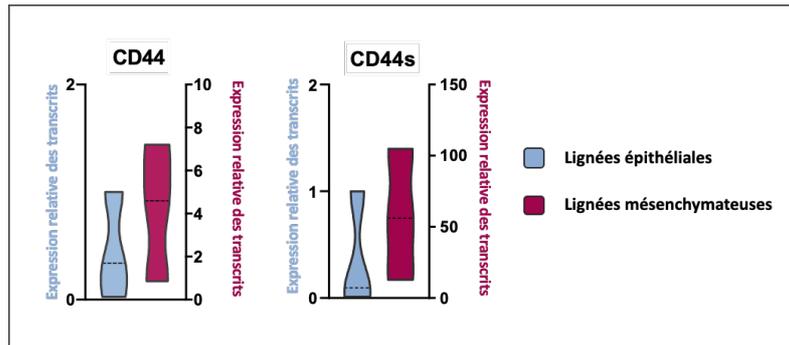


Figure 80 : Expression relative des transcrits de CD44 total et de son isoforme standard CD44s par les lignées épithéliales T47D, ZR75-1 (axe Y gauche) et les lignées mésenchymateuses HMLE.M, MDA-MB-231, MDA-MB-157 (axe Y droit) vis-à-vis de l'expression de ces transcrits par HMLE.E en RT-qPCR.

Face à cette expression différentielle de l'acide hyaluronique, de l'enzyme responsable de sa synthèse ainsi que de son récepteur à la surface des cellules mésenchymateuses, nous avons cherché à mettre en lien l'entrée préférentielle des nanoparticules avec cette voie. Pour cela, nous avons regardé s'il existait une relation entre l'expression de CD44 et l'internalisation des nanoparticules après exposition aux nanoparticules de dioxyde de titane NM100 et NM103 des différentes lignées tumorales mammaires de nature plus ou moins différenciée (l'expression de CD44 pour chacune des lignées est présentée figure 79 et les données de quantification des NM100 et NM103 sont principalement présentées figures 60, 63, et 65 .

Quelle que soit la nanoparticule, on observe une tendance croissante à leur internalisation lorsque la quantité de CD44 membranaire augmente (Figure 81).

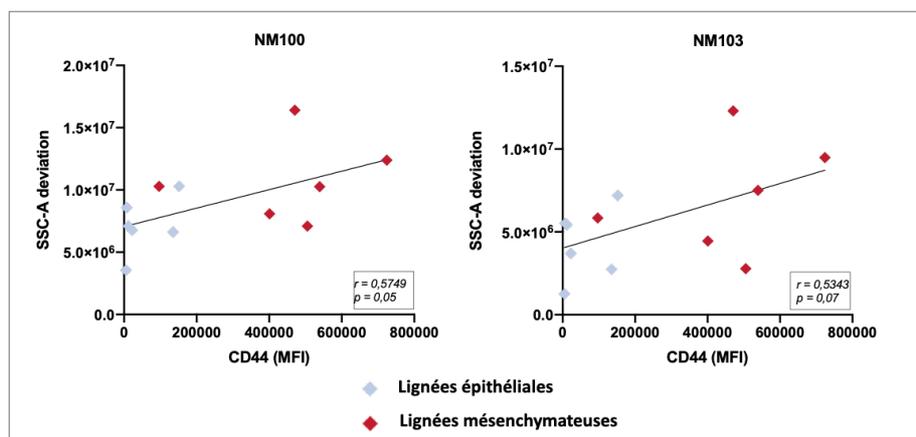


Figure 81 : Relation entre l'internalisation des nanoparticules de dioxyde de titane NM100 et NM103 (évaluée par la déviation du signal SSC-A en cytométrie de flux) et l'expression de la protéine CD44 mesurée par l'intensité de fluorescence en cytométrie en flux en fonction de la nature de nature épithéliale (T47D, SKBR3, ZR75-1, HMLE.E, MCF10A.E en bleu) et mésenchymateuse (MDA-MB-157, MDA-MB-436, MDA-MB-231, SUM159PT, HMLE.M, MCF10A.M en rouge). Le coefficient de corrélation r de Pearson est calculé par le logiciel Prism.

Résultats

Le coefficient de corrélation de Pearson est supérieur à 0,5 pour les deux nanoparticules ce qui suggère une corrélation positive, cependant au seuil de 5%, cette relation n'est pas significative. Cette analyse ne nous renseigne pas sur un éventuel lien de causalité et nous devons donc tester si cette relation existe par une approche fonctionnelle.

d. Influence de l'acide hyaluronique sur l'internalisation des nanoparticules

Nous avons donc évalué si des interactions différentielles des nanoparticules avec l'acide hyaluronique, en lien avec une surexpression de CD44 à la surface des cellules tumorales mammaires pouvaient expliquer, au moins en partie, le différentiel d'entrée des nanoparticules dans ces cellules. Pour cela, nous avons analysé l'effet d'un pré-traitement des cellules par une hyaluronidase sur l'internalisation des nanoparticules de dioxyde de titane NM100 et NM103. Pour les lignées épithéliales T47D et HMLE.E, on n'observe pas de différence d'entrée de ces nanoparticules suite au pré-traitement des par la hyaluronidase, par contre, le pré-traitement à la hyaluronidase des cellules mésenchymateuses réduit l'internalisation des nanoparticules NM100 et NM103 (Figure 82).

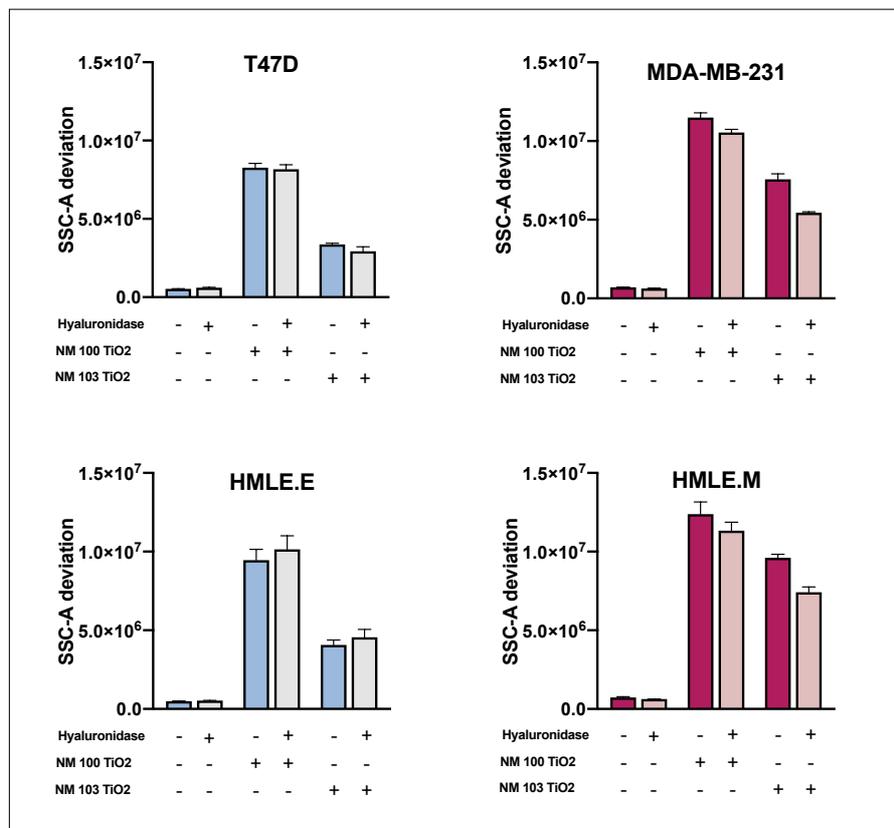


Figure 82 : Internalisation des nanoparticules de dioxyde de titane NM100 et NM103 par les lignées T4D, MDA-MB-231, HMLE.E et HMLE.M prétraitées ou non à la hyaluronidase. La déviation du signal SSC en cytométrie de flux est une valeur moyenne calculée sur 10 000 cellules. Elle est proportionnelle à la quantité de nanoparticules internalisées ou fortement liées aux cellules.

Discussion

1. Contexte général de l'hétérogénéité tumorale mammaire

Le cancer du sein est à la fois le plus fréquent et le plus léthal chez la Femme, représentant 25% des cas de cancers et 15 % de la mortalité mondiale par cancer (INCa, 2019). Les stratégies thérapeutiques sont adaptées selon l'évaluation clinique initiale, la description anatomo-pathologique tumorale ainsi que le diagnostic moléculaire et génomique. Dans tous les cas, les modalités de traitement visent à éradiquer la tumeur tout en préservant les tissus sains à proximité. Pour le cancer du sein, les traitements locaux par chirurgie et radiothérapie se sont généralisés (Cottu & Delalogue, 2019).

La radiothérapie consiste en l'exposition à des rayonnements ionisants (RI) afin de générer des dommages létaux à l'ADN et d'ainsi bloquer les capacités de multiplication des cellules tumorales. Les effets attendus de la radiothérapie sont directs, issus des interactions RI avec la matière ou indirects, issus du stress oxydatif généré par la radiolyse de l'eau. Néanmoins, ces effets ne sont pas spécifiques du tissu tumoral et il existe une fenêtre thérapeutique contrainte par la balance bénéfique/risque. Selon la localisation de la tumeur, la dose nécessaire à sa stérilisation peut être supérieure à la dose de tolérance des organes vitaux présents dans le champ d'irradiation. Le contrôle tumoral pour la dose maximale tolérée sera alors insuffisant, exposant les patientes à un risque de progression tumorale et de rechute.

Le contrôle de la progression tumorale est encore complexifié par l'existence d'une hétérogénéité intra-tumorale, caractérisée par la présence de clones cellulaires présentant des altérations moléculaires et des niveaux différents de radio-sensibilité. Cette hétérogénéité peut être spatiale, avec l'établissement de métastases à distance de la tumeur primaire, et temporelle sous la pression de sélections immune et/ou en réponse aux traitements (Zardavas et al., 2015). Deux mécanismes majeurs participent à l'établissement de cette hétérogénéité et produisent, dans le cas spécifique du cancer du sein, une population cellulaire caractérisée par le même phénotype membranaire CD24⁻/CD44⁺.

D'une part, les cellules souches cancéreuses (CSC) constituent une sous-population cellulaire à capacité d'auto-renouvellement et dont le potentiel tumorigène régénère de nouvelles masses tumorales différenciées (Shibue & Weinberg, 2017). Les CSC forment également une population radio-résistante du fait de leur capacité accrue à réparer leur ADN ainsi que par le maintien d'un état de

Discussion

quiescence dont résulte une activité métabolique réduite et un faible niveau de stress oxydatif endogène (Arnold et al., 2020).

D'autre part, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un mécanisme de reprogrammation épigénétique au cours duquel des cellules épithéliales différenciées perdent progressivement leurs propriétés d'adhésion cellulaire et leur polarité au profit de l'acquisition de nouvelles propriétés telles que la migration et l'invasivité. L'EMT est un mécanisme réversible impliqué dans les étapes précoces de la cascade métastatique et le phénomène inverse, de transition mésenchymo-épithéliale (MET), participe à l'implantation finale de métastases. La dédifférenciation cellulaire résulte de l'activation des facteurs de transcription tels que Snail1 ou ZEB1 conduisant à la perte progressive des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, cytokératines) et au gain de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine ou la fibronectine (Ponnusamy et al., 2019). Dans le cancer du sein, l'EMT génère des cellules aux propriétés souches et la population cellulaire marquée par le phénotype membranaire CD24⁻/CD44⁺ est alors doublement impliquée dans la radio-résistance et dans l'établissement de métastases. Ainsi, afin d'étudier la réponse aux traitements par radiothérapie sur des modèles de cancer du sein qui tiennent compte de l'hétérogénéité intra-tumorale, nous avons principalement travaillé avec plusieurs lignées tumorales mammaires (Figure 79) et notamment avec la lignée T47D (CD24⁺/CD44⁻) caractéristique du type luminal A et la lignée MDA-MB-231 (CD24⁻/CD44⁺) du type triple-négatif (Dai et al., 2017). Par ailleurs, pour nous affranchir de tous biais d'interprétation qui seraient liés à des mutations ou à des fonds génétiques particuliers de ces lignées, nous avons aussi analysé la réponse au traitement de deux modèles de cellules épithéliales mammaires immortalisées HMLE (Figure 62) et MCF10-A (Figure 64), chacun capable d'entreprendre une EMT *in vitro* en réponse à une exposition au TGF- β . Ces modèles nous ont permis d'étudier une réponse différentielle aux traitements selon une expression phénotypique épithéliale ou mésenchymateuse.

Comme plus de 90 % de la mortalité associée aux cancers est liée à la présence de métastases, il apparaît primordial que les traitements ciblent principalement les cellules mésenchymateuses à l'origine de la cascade métastatique (Y. Zhang & Weinberg, 2018). Ces cellules étant associées à une radio-résistance accrue, leur éradication nécessiterait une augmentation de la dose déposée. Cependant, comme l'escalade de dose est contrainte par la toxicité des RI aux tissus sains environnants, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour accentuer le différentiel de dose reçue entre les tissus tumoraux et les tissus sains. Plusieurs approches sont alors envisageables : d'une part tirer parti des évolutions technologiques pour améliorer la précision du dépôt de dose et ainsi pouvoir envisager d'augmenter la dose totale délivrée tout en limitant la toxicité aux tissus sains, d'autre part augmenter localement l'efficacité de la radiothérapie.

Les premières approches bénéficient du développement de modalités d'irradiation guidées ou couplées à l'imagerie pour une meilleure définition du volume à irradier. Les possibilités de moduler le volume cible et l'intensité du faisceau d'irradiation au cours du temps permettent notamment de limiter la dose reçue par les tissus sains présents dans le champ d'irradiation (Balaji et al., 2016). L'utilisation clinique de nouvelles sources d'irradiation vise également à améliorer la précision du dépôt de dose. Dans le cadre de l'hadronthérapie, le haut transfert d'énergie linéique des particules chargées provoque un dépôt de dose localisé au pic de Bragg ce qui réduit la toxicité en aval de la tumeur irradiée. Néanmoins, de telles approches ont principalement démontré une réduction de la toxicité aux tissus sains mais ne suffisent pas, à elles seules, à surpasser la radio-résistance tumorale (Thariat et al., 2019).

Les approches combinées sont donc considérées pour lutter contre la radio-résistance tumorale en potentialisant localement les effets de l'irradiation (radio-sensibilisation). La radio-résistance a longtemps été attribuée au degré d'oxygénation en supposant que le manque d'oxygène au sein de la masse tumorale limitait la mise en œuvre de la phase radiochimique et donc l'efficacité de la radiothérapie. Les premières stratégies de radio-sensibilisation visaient donc à modérer l'hypoxie locale par l'usage d'anti-anaérobies comme les nitro-imidazolés ou en augmentant la quantité d'oxygène par l'utilisation d'oxygène hyperbare ou d'érythropoïétine (Overgaard 2007). Néanmoins, la radio-résistance est multifactorielle et ne semble pas restreinte à la seule hypoxie. En effet, les CSC mammaires ne sont pas plus radio-résistantes si elles sont cultivées *in vitro* en conditions hypoxiques (Lagadec et al., 2012). La radio-résistance serait également liée à des facteurs cellulaires tels que l'activité mitotique, les capacités de réparation de l'ADN et à des facteurs environnementaux relatifs à la réponse inflammatoire et à l'immuno-tolérance.

L'approche que nous avons choisi de développer, afin de lutter contre la radio-résistance des cellules tumorales mammaires, repose sur un principe, a priori physique, de radio-sensibilisation par l'utilisation de nanoparticules de haut numéro atomique (haut-Z).

Tel que décrit dans la littérature, l'effet-Z résulterait de la différence d'absorption massique entre les nanoparticules de haut-Z et les tissus mous, conduisant à augmentation localisée de la dose déposée. Il est particulièrement décrit pour les nanoparticules d'or ($Z=79$), d'oxyde d'hafnium ($Z=72$), de gadolinium ($Z=68$) mais aussi de platine ($Z=78$) aux énergies de leur k-edges. L'interaction des photons avec les nanoparticules conduit dans un premier temps à des réactions physiques d'excitation/ionisation principalement par les effets photo-électriques et Compton qui provoquent l'éjection d'électrons. La désexcitation des atomes lourds produit alors un réarrangement de leur cortège électronique qui s'accompagne de l'émission de photons de fluorescence X et

Discussion

d'électrons Auger secondaires (Kuncic & Lacombe, 2018). Dans un second temps, la concentration locale en électrons secondaires induit directement, ou indirectement en générant des radicaux libres (Figure 83), des lésions aux protéines, aux lipides et aux acides nucléiques (C. Verry et al., 2019). Les dommages biologiques causés résulteraient alors de la potentialisation des effets de l'irradiation et se traduiraient par une augmentation des cassures de l'ADN et, selon les capacités cellulaires de réparation, par un arrêt prolongé dans le cycle cellulaire ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire (Rosa et al., 2017).

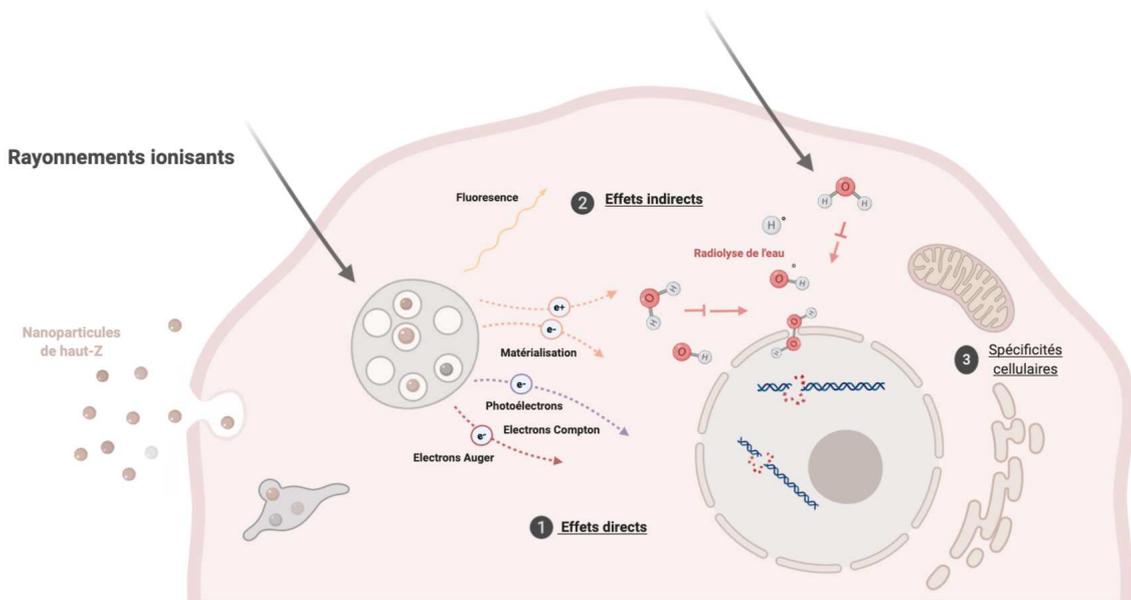


Figure 83 : Principe de la radio-sensibilisation avec des nanoparticules. Réalisé avec BioRender.

L'intérêt d'utiliser des nanoparticules pour cette approche de radio-sensibilisation est double : la prédominance des effets de surface en regard de la masse favorise quantitativement la production d'électrons par les nanoparticules par rapport à un matériau brut et la taille nanoparticulaire facilite les interactions biologiques avec les cellules favorisant ainsi leur internalisation (Butterworth et al., 2012).

Dans ce contexte, nous avons cherché à évaluer *in vitro* le potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules de haut-Z et à expliquer leurs mécanismes d'action sur des modèles tumoraux mammaires de natures plus ou moins différenciées. Pour cela, nous avons sélectionné des nanoparticules précédemment décrites comme prometteuses sur d'autres modèles : des nanoparticules d'or (AuNP) de 6 et 32nm et des nanoparticules de platine (PtNP) de 4 nm (Butterworth

et al., 2016), (Sicard-Roselli et al., 2014) et (Salado-Leza et al., 2020). L'un des enjeux de ce travail de thèse fut d'identifier les conditions d'exposition optimales pour obtenir une accumulation suffisante des nanoparticules de haut-Z dans les cellules tumorales et particulièrement dans les cellules radio-résistantes au phénotype mésenchymateux (CD24⁻/CD44⁺) afin d'augmenter leur radio-sensibilité.

2. Internalisation des nanoparticules dans les cellules tumorales

Le principe de radio-sensibilisation avec des nanoparticules reposant sur un différentiel d'absorption massique, il est nécessaire de pouvoir concentrer les nanoparticules au niveau tumoral.

D'un point de vue systémique, la biodistribution des nanoparticules dépend à la fois de la voie d'administration et des propriétés physico-chimiques des nanoparticules. La taille des nanoparticules est l'un des paramètres principaux conditionnant le choix de la voie d'administration. En théorie l'augmentation de la perméabilité et de la rétention (EPR), résultant de l'hyper-vascularisation et d'une hypo-clairance sanguine et lymphatique, favorise l'accumulation tumorale passive des nanoparticules jusqu'à 200 nm de diamètre lorsque celles-ci sont administrées par voie intraveineuse (Blanco et al., 2015). Cependant, si la voie intraveineuse couplée à un EPR est considérée comme moins invasive que la voie intra-tumorale, elle ne permet une accumulation tumorale que très partielle (<1%) de la quantité totale de nanoparticules initialement injectée (Wilhelm et al., 2016). En pratique, elle est donc privilégiée pour les nanoparticules dont la taille (<6 nm) est compatible avec une clairance rénale (Soo Choi et al., 2007) comme c'est le cas pour les nanoparticules à base de gadolinium AGuiX® de 3 nm. Pour les nanoparticules de plus grande taille, la voie d'injection intra-tumorale est actuellement utilisée en clinique pour l'administration des nanoparticules d'oxyde d'hafnium (HfO₂, NBTXR3) de 50 nm. Compte tenu de ces éléments et afin de maîtriser au mieux la quantité de nanoparticules d'or de 32 nm présentes au moment de l'irradiation, nous privilégions donc la voie d'injection intra-tumorale dans nos modèles *in vivo*.

D'un point de vue cellulaire, l'entrée des nanoparticules procède d'une étape d'adhésion cellulaire suivie de leur internalisation (Lesniak et al., 2013). Plusieurs grandes voies d'entrée sont alors impliquées dans l'endocytose des nanoparticules et elles sont généralement attribuées aux mécanismes de phagocytose et de pinocytose. La phagocytose intervient principalement dans l'internalisation de larges particules par des cellules compétentes (monocytes, macrophages) et la pinocytose est utilisée par toutes les types cellulaires afin de capter des solutés et/ou des petites

Discussion

molécules : elle regroupe des mécanismes dépendant de la clathrine, de la cavéoline ou indépendants de ces voies (Kou et al., 2013).

Les voies d'entrée schématisées sur la figure 84 requièrent la formation de vésicules membranaires selon des mécanismes actifs. Suite à cela, la majorité des nanoparticules se retrouve dans le compartiment endo-lysosomal. C'est notamment le cas des nanoparticules NBTRX3 (Maggiorella et al., 2012) et des AGuiX (Štefančíková et al., 2014) utilisées pour leur potentiel radio-sensibilisant en clinique.

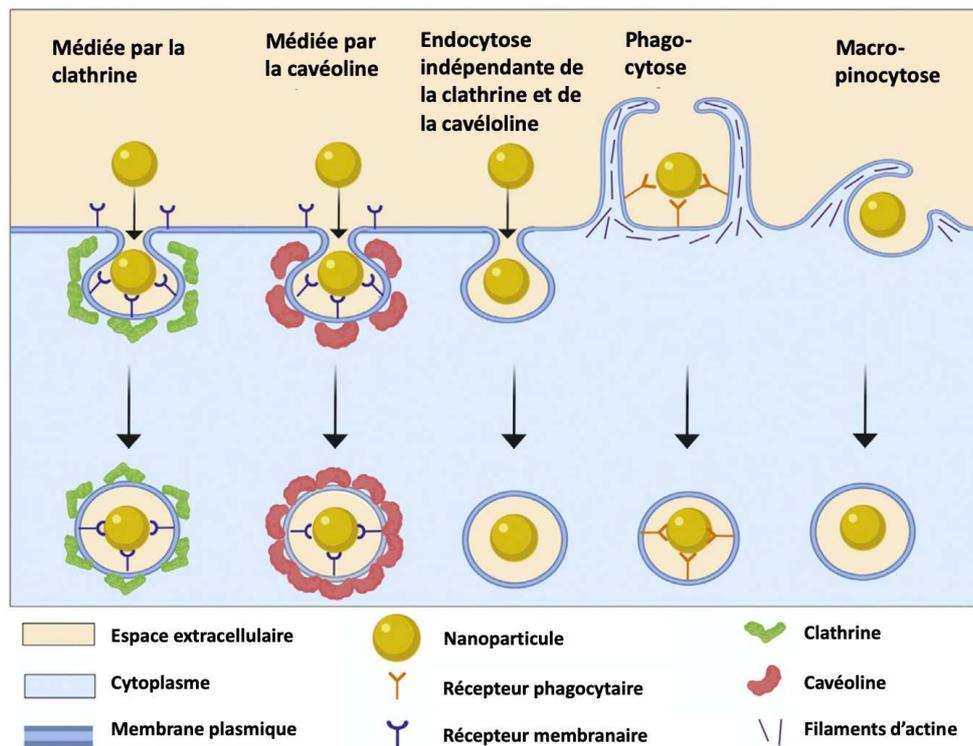


Figure 84 : Principales voies d'endocytose des nanoparticules. D'après Donahue, Acar et Wilhelm (Donahue et al., 2019).

Les observations réalisées sur nos modèles cellulaires mammaires convergent également vers des mécanismes actifs d'entrée des nanoparticules (TiO_2 dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses figure 68) et leur co-localisation avec les lysosomes (AuNP figure 71). Par ailleurs nous confirmons, par microscopie électronique à transmission, l'accumulation des PtNP dans le compartiment lysosomal (Figure 70) ainsi que l'absence de nanoparticules dans le cytoplasme, le noyau ou tout autre compartiment intra-cellulaire. Quelle que soit la nanoparticule testée et/ou la nature cellulaire, nous observons systématiquement le même compartiment de destination.

Néanmoins, en étudiant la réponse des cellules tumorales mammaires en tenant compte de leur hétérogénéité, nous avons mis en évidence un différentiel quantitatif dans l'internalisation des nanoparticules, quelle que soit leur nature chimique et leur taille, par les cellules épithéliales T47D et mésenchymateuses MDA-MB-231. En effet, suite à 24 heures d'exposition, les dosages par spectrométrie de masse montrent que les quantités de PtNP et d'AuNP internalisées par les cellules MDA-MB-231 sont en moyenne trois fois plus importantes que celles internalisées par les cellules T47D (Figure 1 de l'article PtNP et Figure 49). La comparaison quantitative de l'internalisation des nanoparticules de TiO₂ est rendue possible par l'analyse de la déviation du signal SSC qui nous renseigne sur la complexité et la granulosité cellulaire en cytométrie de flux (Zucker et al., 2010). Nous faisons ainsi le même constat d'une entrée préférentielle à 24 heures des TiO₂ NM100 dans les cellules MDA-MB-231 et ce quelle que soit la concentration d'exposition (Figure 60).

Dans la compréhension des interactions cellulaires des nanoparticules, la plupart des études se concentrent uniquement sur l'influence des paramètres physico-chimiques des nanoparticules afin d'expliquer des différences quantitatives ou qualitatives dans leur internalisation. L'influence majeure de la taille des nanoparticules est généralement admise pour la mise en œuvre de la phagocytose (> 200 nm), la macro-pinocytose (> 1 μm), l'endocytose médiée par la clathrine (~120 nm), l'endocytose médiée par la cavéoline (~60 nm) et l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline (~90 nm) (Yameen et al., 2014). Néanmoins, ces voies d'entrées ne sont pas exclusives les unes des autres et la question de l'internalisation des nanoparticules ne peut pas être réduite au seul paramètre de taille (Jiang et al., 2015). L'influence des autres paramètres physico-chimiques des nanoparticules est par ailleurs régulièrement documentée, étudiant le rôle de la forme, de la charge, de l'hydrophobicité, de la fonctionnalisation et de la rigidité des nanoparticules dans leur internalisation cellulaire (Behzadi et al., 2017) et (Sabourian et al., 2020). Toutefois, l'identité synthétique des nanoparticules ne reflète pas entièrement leurs propriétés physico-chimiques une fois en contact de milieux biologiques. En effet, la formation d'une couronne bio-moléculaire ou « corona » par l'adsorption instantanée des molécules de l'environnement à la surface des nanoparticules, en modifie l'identité biologique qui peut alors se traduire par une taille, une charge ou une chimie de surface différentes (Monopoli et al., 2012).

Ces modifications peuvent avoir des conséquences sur le comportement biologique des nanoparticules : en perturbant leur stabilité en suspension, la formation de la corona peut entraîner l'agglomération des nanoparticules et en modifier la nature d'entrée (Halamoda-Kenzaoui et al., 2017). La formation d'une couronne bio-moléculaire a également des conséquences sur la quantité de nanoparticules internalisée : la greffe de polyéthylène glycol (PEG) pour limiter l'adsorption de bio-

Discussion

molécules à la surface des nanoparticules diminue par exemple les interactions cellulaires et l'entrée des nanoparticules (Nicol et al., 2018).

Cette identité biologique est à la fois le reflet des propriétés physico-chimiques intrinsèques des nanoparticules mais également de leur micro-environnement biologique (composition protéique, pH, température, force ionique, etc.) (Charbgo et al., 2018). Elle amène donc à considérer des paramètres extrinsèques dans la mesure de l'internalisation cellulaire des nanoparticules et à être particulièrement vigilants sur les conditions d'expérimentation et d'interprétation des données expérimentales quantitatives.

En effet, des modifications de la stabilité des nanoparticules ont des conséquences sur leur vitesse de sédimentation et donc sur leurs interactions cellulaires. Par exemple, si le tapis cellulaire est situé au dessus de la suspension de nanoparticules (exposition selon un mode un inversé), la quantité de nanoparticules internalisées par les cellules est plus faible que lorsque le tapis cellulaire est situé sous la suspension (Halamoda-Kenzaoui et al. 2017). Afin de prendre en compte ce paramètre de suspension colloïdale et de sédimentation, il est nécessaire d'exprimer la concentration des nanoparticules par un rapport surfacique et non volumique, ce qui permettra de comparer quantitativement les données obtenues sur différents modèles cellulaires et avec différents supports de culture.

Par ailleurs, la méthode d'exposition des nanoparticules influence la formation de la corona et le fait d'administrer les nanoparticules dans une suspension concentrée, pré-mélangée ou mélangée *in vitro* aura des conséquences sur l'homogénéité de leur distribution et donc sur leurs interactions cellulaires (Figure 85).

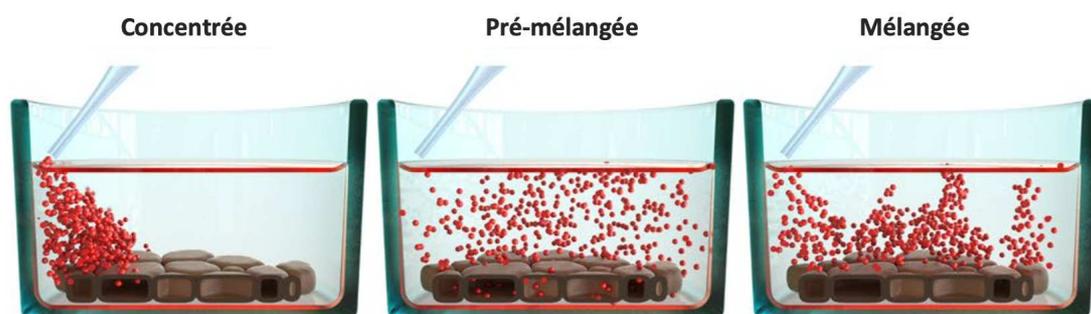


Figure 85 : **Méthodes d'administration des nanoparticules in vitro.** Des suspensions concentrées, pré-mélangées ou mélangées dans les puits de culture par aspiration/refoulement n'auront pas la même homogénéité de distribution. D'après Moore (Moore et al., 2019).

L'inhomogénéité de la distribution des nanoparticules sur le tapis cellulaire peut alors être un biais dans l'interprétation quantitative de l'internalisation cellulaire. Le temps d'observation peut

également influencer l'interprétation des données d'internalisation. L'évolution temporelle de la quantité intra-cellulaire de nanoparticules dépend en effet de la quantité de nanoparticules au contact de la surface cellulaire mais aussi de leur dynamique d'entrée/sortie.

Enfin, des paramètres relatifs aux conditions de culture cellulaires peuvent également influencer l'interprétation quantitative de l'entrée des nanoparticules. Par exemple, une confluence trop importante du tapis cellulaire et l'adhérence des membranes peuvent entraîner le piège de nanoparticules dans ces jonctions cellulaires, empêchant alors leur internalisation par les cellules impliquées dans ces jonctions (Yue et al., 2019).

Nos observations réalisées dans les mêmes conditions d'exposition biologique, avec des nanoparticules aux propriétés physico-chimiques différentes, sur les lignées tumorales mammaires T47D et MDA-MB-231 soulignent l'importance de la nature cellulaire dans la quantité de nanoparticules internalisées. Par ailleurs, nous avons étendu ces observations en généralisant le différentiel d'entrée des nanoparticules à un panel de cellules tumorales mammaires de nature épithéliale ou mésenchymateuse : 8 lignées pour les AuNP de 32 nm (Figure 61) et 12 lignées pour les TiO₂ de 25 et 110 nm (Figure 81). Nous avons par la suite attribué ce différentiel d'entrée des nanoparticules à l'expression cellulaire d'un phénotype épithélial ou mésenchymateux en observant une entrée préférentielle des nanoparticules de TiO₂ dans les formes HMLE.M et MCF10A-M, respectivement issues de l'EMT induites *in vitro* dans les lignées HMLE.E et MCF10A-E (Figures 63 et 65).

Au-delà des propriétés physico-chimiques intrinsèques des nanoparticules, des conditions biologiques et expérimentales d'exposition, nous mettons aussi en évidence l'importance de la nature cellulaire dans l'interface entre les nanoparticules et les systèmes biologiques. Nous proposons ainsi de passer d'une démarche « nano-centrée » à une interprétation basée sur un tryptique « nanoparticule/ environnement biologique/ cellule » pour comprendre l'internalisation des nanoparticules dans les cellules.

3. Compréhension du différentiel d'entrée des nanoparticules

Le constat d'une entrée préférentielle des nanoparticules dans les cellules tumorales mésenchymateuses, associées à un phénotype plus radio-résistant et impliquées dans les phénomènes

Discussion

de métastase, est particulièrement avantageux dans un contexte thérapeutique et notamment pour les approches de radio-sensibilisation que nous cherchons à développer.

La compréhension des paramètres cellulaires en lien avec cette internalisation préférentielle des nanoparticules devrait permettre d'optimiser la chimie des nanoparticules pour l'optimisation de leurs interactions cellulaires.

Indépendamment de la nature épithéliale ou mésenchymateuse, plusieurs paramètres cellulaires généraux sont susceptibles d'influencer les interactions cellulaires des nanoparticules. Théoriquement, plus la surface cellulaire est grande, plus la surface d'adhésion pour les nanoparticules est élevée. Ainsi, l'internalisation des nanoparticules devrait être augmentée dans des cellules présentant une plus grande surface. De fait, nous observons qu'en conditions de croissance exponentielle, l'EMT induite *in vitro* sur les cellules HMLE s'accompagne d'une augmentation de la surface cellulaire. De même, nous observons que la surface moyenne des cellules tumorales mésenchymateuses MDA-MB-231 est supérieure à celle des cellules tumorales épithéliales T47D (Figure 66). Néanmoins, nous observons toujours une différence dans la quantité de nanoparticules de TiO₂ internalisée par les HMLE.E/M (Figure 67) lorsque la confluence cellulaire augmente et que donc la surface cellulaire moyenne des paires de cellules épithéliales/mésenchymateuses devient équivalente. La surface cellulaire ne suffit donc pas à expliquer la différence quantitative d'entrée des nanoparticules entre ces phénotypes épithéliaux et mésenchymateux. L'influence du paramètre de surface cellulaire est rarement étudiée sur l'entrée des nanoparticules : une étude décrit l'indépendance de l'hétérogénéité d'internalisation des nanoparticules vis-à-vis de la surface cellulaire (Johnston et al., 2020) alors que d'autres montrent une augmentation de l'internalisation cellulaire moyenne par les cellules de plus grande surface (X. Wang et al., 2016) et (Khetan et al., 2019). Ces dernières études attirent néanmoins l'attention sur la nécessité de considérer d'autres paramètres membranaires comme la tension de membrane ou la densité en récepteurs impliqués dans la reconnaissance et l'entrée des nanoparticules. Par exemple, l'augmentation de la surface cellulaire peut augmenter la tension membranaire et donc produire une résistance à la déformation nécessaire pour la formation de vésicules d'internalisation. Dans les faits, si les cellules de surface supérieure internalisent plus de nanoparticules, l'entrée des nanoparticules par unité de surface pourrait en fait être réduite (X. Wang et al., 2016).

Au niveau de la membrane, l'internalisation des nanoparticules peut être conditionnée par la densité de facteurs nécessaires à l'endocytose et par les capacités dynamiques d'internalisation qui y sont associées. En effet, le nombre de nanoparticules par endosome serait indépendant de la concentration et de la durée d'exposition aux nanoparticules mais le nombre d'endosomes contenant des

nanoparticules est susceptible de varier dans le temps (Rees et al., 2019). Nous avons donc recherché si les cellules mésenchymateuses pouvaient présenter plus de « facteurs » prédisposant à l'endocytose tels que la clathrine et la cavéoline. En fait, nous observons que la quantité moyenne de clathrines mesurée en immunofluorescence est supérieure dans les cellules épithéliales T47D et HMLE.E respectivement vis-à-vis des cellules mésenchymateuses MDA-MB-231 et HMLE.M (Figure 69) ce qui est en contradiction avec nos mesures d'internalisation. En revanche nous observons effectivement une quantité plus importante de cavéoline 1 dans les cellules HMLE ayant réalisé une EMT mais cette observation n'est pas vérifiée pour la paire de cellules T47D/MDA-MB-231. La capacité à former des vésicules de clathrine ou de cavéoline ne semble donc pas être un point déterminant pour expliquer le différentiel d'entrée entre le phénotype épithélial ou mésenchymateux.

La matrice extra-cellulaire (MEC) est une structure à l'interface des différents types cellulaires avec les nanoparticules. C'est d'ailleurs la structure principale qui ressort de notre étude transcriptomique comparant les cellules HMLE exprimant un phénotype épithélial ou mésenchymateux et exposées à des nanoparticules aux propriétés physico-chimiques différentes. En effet, la signature de 526 gènes différentiellement exprimés selon la nature épithéliale ou mésenchymateuse cellulaire, tout en s'affranchissant d'une réponse transcriptomique qui serait spécifique d'une nanoparticule donnée, présente un enrichissement dans les gènes impliqués dans la structure et l'organisation de la MEC (tableau 9).

La MEC est un réseau tridimensionnel dynamique de macromolécules dont la nature et l'abondance varient selon les différents tissus. Elle est principalement composée de glycoprotéines (dont la fibronectine et la laminine), de fibres (dont les collagènes et l'élastine), de glycosaminoglycanes (acide hyaluronique), de protéoglycanes (décorine, syndécane, versicane, etc.) mais aussi de facteurs de croissance et d'enzymes de remodelage (métalloprotéases de la matrice ou MMP) (Theocharis et al., 2016). La MEC supporte de nombreuses fonctions physiologiques selon des mécanismes physiques pour le maintien de la structure et l'organisation tissulaire mais aussi biochimiques par la régulation de la disponibilité des facteurs de croissance pour l'activation de voies de signalisation impliquées dans la croissance, la prolifération, la survie, la migration ou la différenciation cellulaire (Pickup et al., 2014). Les structures extra-cellulaires participent également à l'acquisition des propriétés tumorales spécifiques ainsi qu'au maintien des propriétés souches (Nallanthighal et al., 2019). Ces structures dynamiques sont en constant remodelage, régulées par l'équilibre entre l'action des protéases extra-cellulaires (MMP) et leurs inhibiteurs. La dérégulation de cette homéostasie conduit à un remodelage pathologique qui participe au développement tumoral (Yuzhalin et al., 2018). Ainsi dans l'évolution du cancer du sein, on observe une désorganisation de la membrane basale, une augmentation

Discussion

progressive de la rigidité des tissus en lien avec l'augmentation des fibres, de protéines extra-cellulaires ainsi que des enzymes de remodelage (Insua-Rodríguez & Oskarsson, 2016).

L'importance de la MEC comme structure différentielle entre les phénotypes épithéliaux et mésenchymateux de nos modèles cellulaires exposés aux nanoparticules, était évidemment attendue en regard de l'interrelation entre la matrice extra-cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse. D'une part, les cellules utilisent la MEC pour exécuter le programme d'EMT, en conditionnant les capacités cellulaires à recevoir et transduire des signaux (Corallino et al., 2015). D'autre part, on observe un remodelage progressif de la MEC au cours de l'EMT. Dans les cellules épithéliales, la MEC est souple et principalement composée d'une lame basale qui participe au maintien de la polarisation baso-apicale (Scott et al., 2019). Dans les cellules mésenchymateuses, la MEC est plus rigide ; les interactions avec les intégrines membranaires favorisent les forces de traction et les protéases extra-cellulaires participent à un remodelage propice à la migration en préparant le tissu à une invasion cellulaire (Bill & Christofori, 2015). L'EMT s'accompagne donc à la fois d'un remodelage des membranes, du cytosquelette et de la MEC. Ainsi les marqueurs mésenchymateux sont des protéines transmembranaires (N-cadhérine), des filaments intermédiaires (vimentine) ou et des fibres de la MEC (fibronectine).

L'acide hyaluronique (AH) étant à la fois l'un des composants majeurs de la MEC et le ligand principal de CD44, biomarqueur des CSC mammaires, nous avons recherché si ce glycosaminoglycane était exprimé plus abondamment dans les cellules mésenchymateuses. En effet, nous observons une quantité supérieure d'AH à la surface des cellules MDA-MB-231 et HMLE.M en comparaison aux cellules T47D et HMLE.E (Figure 78). Ces observations sont en accord avec la concentration accrue d'AH dans les tissus à remodelage rapide, dans un contexte d'inflammation et/ou de progression tumorale (Moustakas & Heldin, 2014). L'AH est un polymère constitué d'une unité récurrente disaccharidique et dont la taille conditionne l'activité biologique. Sa production est ubiquitaire mais les formes de haut poids moléculaire (>1000 kDa) sont plutôt associées à des conditions physiologiques et les formes de plus faibles poids moléculaires à des situations pathologiques (Monslow et al., 2015). Sur les microphotographies en fluorescence, nous observons un aspect différent dans la structure de l'AH sur la projection 3D des cellules épithéliales et mésenchymateuses mais, comme il a déjà été rapporté, l'immunofluorescence ne permet pas de mettre en évidence une fragmentation différentielle de l'AH (Witschen et al., 2020).

La taille des fragments d'AH résulte d'un équilibre entre la synthèse d'acide hyaluronique par les hyaluronanes synthases (HAS) à la membrane cellulaire et leur dégradation par les hyaluronidases

(HYAL) dans le milieu extra-cellulaire. Il existe 3 isoformes d'HAS qui sont toutes exprimées dans le cancer du sein. Sur la base de notre analyse transcriptomique, l'isoforme HAS2 est exprimée préférentiellement dans les cellules HMLE.M, indépendamment de la nature et de la durée du traitement par les nanoparticules. Ce différentiel d'expression semble associé aux natures épithéliales et mésenchymateuses cellulaires puisque l'expression relative des transcrits de HAS2, mesurée par RT-qPCR, montre une expression 800 fois plus élevée dans les lignées mésenchymateuses en comparaison aux lignées tumorales épithéliales (Figure 77). Ces observations concordent avec l'interdépendance de l'expression de HAS2 avec l'EMT *in vitro* : celle-ci semble nécessaire à la réalisation de l'EMT induite par le TGF- β (Moustakas & Heldin, 2014) et son expression est régulée par les facteurs tels que le TGF- β sécrété au cours de la progression tumorale. Par ailleurs, la surexpression de HAS2 est déjà décrite comme associée aux cellules tumorales mammaires les plus invasives *in vitro* (Udabage et al., 2005).

Suite au constat de l'augmentation de HAS2, synthétisant l'acide hyaluronique, ainsi que de l'acide hyaluronique à la surface des cellules mésenchymateuses, nous nous sommes intéressés à l'expression et la fonction du principal récepteur auquel l'AH est adressé une fois extrudé.

La structure transmembranaire de CD44 lui confère plusieurs fonctions physiologiques. Son domaine extra-membranaire participe à la régulation des interactions cellule-cellule et cellule-MEC par la liaison de plusieurs ligands tels que le versicane, la fibronectine ou l'ostéopontine. L'AH reste néanmoins son ligand le plus spécifique et sa liaison provoque un changement conformationnel du domaine cytoplasmique de CD44 qui participe à l'activation des voies de signalisation impliquées dans la croissance, la survie, l'invasion ou la différenciation cellulaire (Chen et al., 2018). Nos lignées cellulaires mésenchymateuses expriment toutes la protéine CD44 à leur surface (Figure 79) et l'analyse quantitative des transcrits de CD44 total montre une expression moyenne 4,5 fois supérieure dans les cellules mésenchymateuses en comparaison aux cellules épithéliales. Le différentiel d'expression relative par les cellules mésenchymateuses s'étend à 50 fois l'expression épithéliale lorsque l'on considère l'expression des transcrits de la forme standard CD44s (Figure 80). La forme standard CD44s est la plus petite forme de CD44 et ne comporte aucun exon variable. Elle est principalement produite conjointement à l'EMT, lorsque l'activation des facteurs de transcription Snail1, ZEB1 inhibe l'activité de la protéine régulatrice d'épissage ESRP1 impliquée dans l'épissage alternatif de CD44 (Heldin et al., 2014).

Au cours de l'EMT, nous observons donc une dérégulation des principaux acteurs du métabolisme de l'acide hyaluronique dans nos modèles. Par ailleurs, la quantité de nanoparticules de TiO₂ NM100 et NM103 internalisées corrèle partiellement avec l'expression protéique de CD44 (Figure 81) et nos

Discussion

études ont préalablement souligné l'importance des modifications de la matrice extra-cellulaire dans la recherche d'un mécanisme « transverse » qui expliciterait le différentiel d'internalisation des cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules épithéliales. Ainsi, nous proposons le modèle d'une internalisation opportuniste des nanoparticules dans les cellules mésenchymateuses présentant un phénotype CD24⁻/CD44⁺, qui serait en lien avec leur interaction avec l'acide hyaluronique et cela indépendamment de leurs propriétés physico-chimiques, (Figure 76).

Nous renforçons cette hypothèse par l'observation d'une diminution de l'entrée des nanoparticules de TiO₂ de 25 nm (NM103) et de 110 nm (NM100) suite au pré-traitement des lignées mésenchymateuses MDA-MB-231 et HMLE.M par la hyaluronidase (Figure 82).

L'hypothèse de cette voie d'entrée médiée par CD44 est un postulat nouveau car le plus souvent la présence de glycocalyx est associée à une barrière supplémentaire limitant les interactions cellulaires des nanoparticules (Patel et al., 2019). En effet, une matrice dense, chargée en acide hyaluronique est plutôt associée à une résistance aux traitements par son opposition à la diffusion chimique. Cet effet est par exemple observé en immunothérapie pour laquelle la co-administration de hyaluronidase a des effets bénéfiques en permettant une meilleure imprégnation tumorale du traitement (Clift et al., 2019).

Néanmoins, cette voie d'endocytose est pertinente aux vues des travaux récemment publiés par l'équipe de R. Rodriguez qui décrivent une endocytose du fer médiée par CD44 dans les lignées tumorales mammaires, y compris suite à une EMT induite chez les HMLE.E *in vitro* (Müller et al., 2020).

Sans lien avec des nanoparticules, quelques études se sont intéressées à l'internalisation de l'acide hyaluronique par son récepteur CD44. Ces études révèlent notamment que le niveau d'expression de CD44s est associé à une augmentation de la quantité d'acide hyaluronique à la surface de lignées tumorales (Birzele et al., 2015) et que la quantité d'AH internalisée est fonction de l'expression membranaire de CD44 (Spadea et al., 2019). En effet, il est estimé que 30 % des récepteurs membranaires CD44 sont recyclés toutes les 24 heures (Misra et al., 2015) et que le recyclage s'accompagne de l'endocytose de l'AH qui y est attaché (Knudson et al., 2002). Néanmoins, toutes les cellules CD44⁺ n'expriment pas le même niveau de CD44 et toutes les formes de CD44 n'internalisent pas la même quantité d'AH (CD44s > CD44v) suggérant une affinité différente selon l'isotype de CD44 (Spadea et al., 2019). De plus, même si les cellules expriment CD44 synthétisent et fragmentent généralement de l'AH, la quantité de AH synthétisée peut bien sûr varier et CD44 peut être plus ou moins activé (Witschen et al., 2020).

L'existence de différents états d'activation de CD44, qui se traduit par la capacité à lier l'acide hyaluronique, ou l'insuffisance de la production d'AH pourraient alors en partie expliquer l'absence de significativité de la corrélation entre l'internalisation des NM100 et NM103 et l'expression membranaire de CD44 (Figure 81).

L'activation de CD44 est régulée dans l'espace et dans le temps par des modifications post-traductionnelles (glycosylation, acylation, etc.) en réponse à des stimuli cytokiniques ou des facteurs de croissance (Rios de la Rosa et al., 2018). Dans une étude menée sur 34 biopsies tumorales et sur leurs tissus sains adjacents, il a été montré que l'expression de CD44 est ubiquitaire. Cependant, de façon prometteuse pour l'accumulation intra-cellulaire des nanoparticules médiées par cette voie, l'activation de CD44 dans les tissus normaux est négligeable en regard de celle des tissus tumoraux (Figure 86).

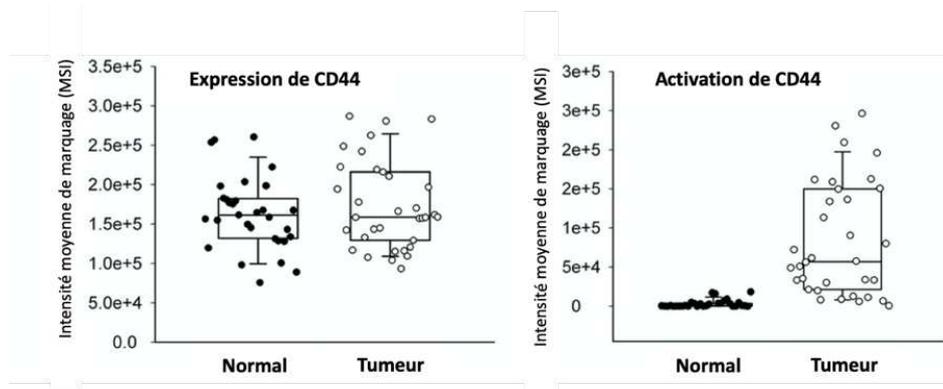


Figure 86 : Niveau d'expression et d'activation de CD44 selon la nature des tissus mammaires tumoraux ou normaux adjacents. 34 échantillons. Déterminés en immunohistochimie D'après Yang (C. Yang et al., 2015).

En plus d'un potentiel d'entrée différentielle des nanoparticules entre les cellules tumorales et les cellules normales, l'accumulation préférentielle des particules au sein des cellules les plus invasives, associées à un potentiel métastatique est recherchée. Cette différence d'internalisation est observée pour des cellules originaires de tumeurs prostatiques primaires et métastatiques avec une internalisation 5 fois plus importantes de microparticules de polystyrène de 2,4 μm dans les cellules métastatiques (Brill-Karniely et al., 2020). Suivant le même raisonnement, les cellules tumorales MDA-MB-231 internalisent 25 fois plus de nanoparticules d'or de 15 nm que des fibroblastes en culture *in vitro* (Bromma et al., 2020).

A l'exception d'une entrée préférentielle des nanoparticules d'or de 100 nm dans les formes M2 et M1 des macrophages par rapport aux monocytes moins différenciés (MacParland et al., 2017), l'internalisation différentielle des nanoparticules en regard de l'état de différenciation cellulaire est le plus souvent en faveur d'une entrée des nanoparticules dans les modèles cellulaires les moins

Discussion

différenciés *in vitro*. En effet, des liposomes de 150 nm sont préférentiellement internalisés dans des myoblastes en comparaison aux myotubes (Guglielmi et al., 2019), les nanoparticules d'oxyde d'hafnium de 50 nm dans les lignées mésenchymateuses mammaires en comparaison aux lignées épithéliales (Marill et al., 2014), les nanoparticules de TiO₂ de 25 et 110 nm (Song et al., 2015) et les nanoparticules de CeO₂ de 70 nm dans la forme dédifférenciée de la lignée intestinale Caco-2 (Vila et al., 2018).

Conformément à nos observations, les nanoparticules semblent donc interagir préférentiellement avec les cellules les moins différenciées. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude montrant le rôle de la plasticité et de l'EMT sur l'internalisation des nanoparticules par des cellules de nature plus ou moins différenciées aux fonds génétiques communs. Nos expériences menées sur un panel de lignées tumorales mammaires, y compris deux modèles de cellules épithéliales mammaires immortalisées HMLE et MCF10-A, chacun capable d'entreprendre une EMT *in vitro*, nous permettent de généraliser les observations d'une entrée préférentielle des nanoparticules indépendamment de leurs propriétés physico-chimiques dans les formes mésenchymateuses les moins différenciées. L'une des explications pourrait être une endocytose médiée par CD44 suite aux interactions non spécifiques des nanoparticules avec l'acide hyaluronique qui y est attaché.

Le récepteur CD44 étant surexprimé à la surface des cellules tumorales mammaires doublement impliquées dans les phénomènes de résistance à la radio-thérapie et dans le développement de métastase, l'internalisation des nanoparticules par ce biais constitue une opportunité remarquable pour espérer radio-sensibiliser les cellules les plus radio-résistantes.

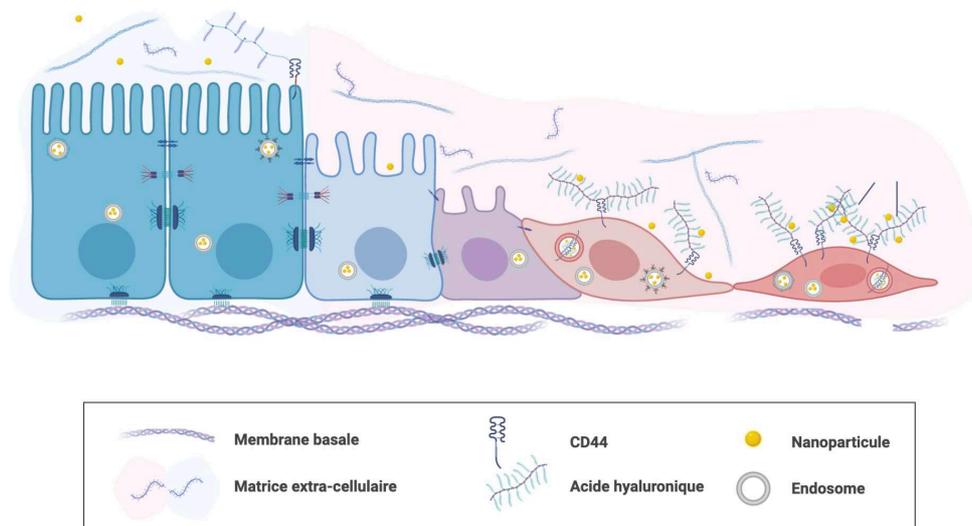


Figure 87 : Schéma résumant l'entrée préférentielle des nanoparticules dans les cellules tumorales mésenchymateuses en lien avec l'expression de CD44 membranaire et l'internalisation de l'acide hyaluronique qui y est attaché. Réalisé avec BiorRender.

4. Potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules de haut-Z

La radio-sensibilisation avec des nanoparticules de numéro atomique élevé est décrite selon un mode d'action principalement physique. En effet, la densité électronique de ces nanoparticules augmente la probabilité d'interaction des RI avec la matière et le dépôt d'énergie qui y est associé. L'effet photo-électrique consiste en l'absorption totale d'un photon incident suivie par l'éjection d'un photo-électron d'énergie égale au différentiel entre l'énergie du photon incident et l'énergie de liaison de l'électron arraché. L'origine la plus probable du photo-électron éjecté est la couche K, la plus fortement liée. La lacune laissée lors de cette ionisation est ensuite comblée par la réorganisation du cortège électronique qui génère une désexcitation se traduisant par l'émission d'un photon X à l'origine soit d'une fluorescence X d'énergie caractéristique soit d'un électron Auger de faible énergie. La section efficace de l'effet photo-électrique varie selon Z^{3-5} et justifie l'usage de nanoparticules de haut-Z pour leur absorption massique différentielle avec les tissus mous. L'effet radio-sensibilisant devrait alors pouvoir être observé quel que soit le matériau de haut-Z irradié et ainsi augmenter le dépôt de dose physique aux énergies de leurs k-edges. L'étude princeps décrivant cet effet « *enhancer* » a été réalisée *in vivo* sur des souris porteuses de xénogreffes tumorales mammaires sous-cutanées, successivement traitées par des AuNP de 1,9 nm et irradiées localement à 30 Gy par un tube X de 250 kV (Hainfeld et al., 2004). Depuis, le potentiel radio-sensibilisant de nanoparticules à base d'or, de platine, d'argent, de gadolinium, de fer et d'hafnium est régulièrement examiné (Liu et al., 2018) *in vitro*, *in vivo* et *in silico*.

Dans le cancer du sein, plusieurs sous-populations tumorales coexistent et présentent des réponses différentielles aux traitements que ce soit à l'irradiation ou à l'exposition à des nanoparticules. En effet, des travaux menés dans notre laboratoire montrent que la population mésenchymateuse marquée par le phénotype membranaire CD24⁻/CD44⁺, suite à une EMT induite *in vitro*, est plus radio-résistante que son équivalent épithélial au phénotype CD24⁻/CD44⁺ (Konge et al., 2018). Par ailleurs, nous venons de montrer que cette même population CD24⁻/CD44⁺ internalisait préférentiellement les nanoparticules. Ainsi, nous avons supposé que la réponse au double-traitement par les nanoparticules et une irradiation pouvait également différer selon la nature épithéliale ou mésenchymateuse cellulaire. Afin de documenter cette potentielle hétérogénéité de réponse, nous avons systématiquement comparé les comportements des lignées tumorales T47D et MDA-MB-231 représentatives de ces différents phénotypes.

Discussion

Les effets du double-traitement par les nanoparticules de haut-Z et les RI sont hétérogènes *in vitro*. Ainsi, nous n'observons pas d'effet radio-sensibilisant des PtNP en termes de survie clonogénique ni des AuNP de 32 nm en termes de survie/mortalité sur les lignées T47D et MDA-MB-231 (Figure 45) car l'effet retard sur la reprise de la prolifération des T47D illustré figure 45 n'a pas été reproduit avec les autres lots de nanoparticules expérimentés. Néanmoins, lorsque nous nous intéressons à la réponse globale de ces lignées par la mesure de l'impédance cellulaire en réponse aux simple- ou au double-traitement, nous observons un effet différentiel entre T47D et MDA-MB-231. En réponse à une irradiation de 6 Gy, les cellules épithéliales cessent toute prolifération et la cytotoxicité est telle qu'il n'est pas possible d'évaluer un potentiel radio-sensibilisant. A l'inverse, les cellules mésenchymateuses irradiées poursuivent leur prolifération pendant 5 jours jusqu'à une chute brutale de l'index cellulaire pour les cellules préalablement exposées aux nanoparticules (Figure 46). Cette observation est reproduite quel que soit le lot d'AuNP testé et n'est pas attribuable à une augmentation de la mortalité cellulaire (Figure 47). Les modifications des signaux d'impédances cellulaires n'étant pas relatives à un mécanisme biologique unique, il n'est pas possible à ce point de déterminer par quel mécanisme agit le double-traitement. Néanmoins, de manière concomitante au décrochage des courbes d'impédance cellulaire, nous observons une perturbation du cycle cellulaire (Figure 48) des cellules MDA-MB-231 en réponse au double-traitement nanoparticules et irradiation en comparaison à une irradiation seule.

En optimisant les conditions d'exposition pour maximiser les quantités d'AuNP internalisées au moment de l'irradiation (jusqu'à 10 pg/cellule MDA-MB-231 sans occasionner de cytotoxicité) (figure 51), nous observons un effet radio-sensibilisant des AuNP se traduisant principalement par des modifications morphologiques (Figure 53) et une augmentation de mortalité cellulaire 6 et 14 jours après l'irradiation à 6 Gy (Figure 52). Malgré l'augmentation conséquente de la quantité de nanoparticules internalisées par les cellules T47D, nous n'objectivons pas d'effet radio-sensibilisant des AuNP dans ces conditions. Si l'application du principe physique de la radio-sensibilisation avec des nanoparticules de haut-Z est relatif à une augmentation du dépôt de la dose indépendamment du système cellulaire considéré, nous mettons ici en lumière l'importance de la nature cellulaire dans cette réponse. Les spécificités cellulaires semblent jouer un rôle primordial dans la production d'un effet radio-sensibilisant au-delà d'une simple différence d'internalisation. En effet, l'ampleur de l'effet radio-sensibilisant des AuNP de 1,9 nm couplées à une irradiation X (160 kV) sur des cellules MDA-MB-231 ne semble pas corrélée à la différence d'entrée des AuNP observée pour les lignées tumorales L132 (pulmonaire) et DU145 (prostatique) (Jain et al., 2011). Par ailleurs, pour des quantités similaires d'AuNP de 28 nm internalisées, il n'est pas observé d'effet radio-sensibilisant dans les cellules tumorales mammaires MCF10-A et MCF7 en comparaison à MDA-MB-231 suite à une irradiation X par un tube à 160 kV (Nicol et al., 2018).

Les effets observés suite une irradiation gamma au césium 137 (^{137}Cs) sont donc moindres en présence d'AuNP et absents en présence de PtNP sur nos modèles cellulaires *in vitro*. Nous avons donc initié une étude de modélisation pour estimer le gain potentiel attendu sur la base d'effets physiques dans nos conditions expérimentales. Comme de nombreuses études de modélisation Monte Carlo sont réalisées selon des hypothèses trop simplistes qui conduisent à un biais dans l'estimation du *Dose Enhancement Factor* (DEF), nous avons cherché à calculer un DEF plus réaliste au regard des paramètres physiques implémentaux et des paramètres biologiques expérimentaux.

En effet, la simplification qui conduit à considérer un flux mono-énergétique de photons (à 662 keV dans le cas du ^{137}Cs) comme unique espèce interagissant avec le volume cible modélisé, néglige la contribution des espèces secondaires produites au cours de l'équilibre électronique et qui participent à la dose déposée dans le volume modélisé. La DEF étant calculée par le rapport de l'énergie déposée dans un volume contenant une nanoparticule par l'énergie déposée dans un même volume autour d'une molécule d'eau, si l'on néglige l'énergie déposée à proximité de l'eau, la DEF augmente mathématiquement (Rabus et al., 2019).

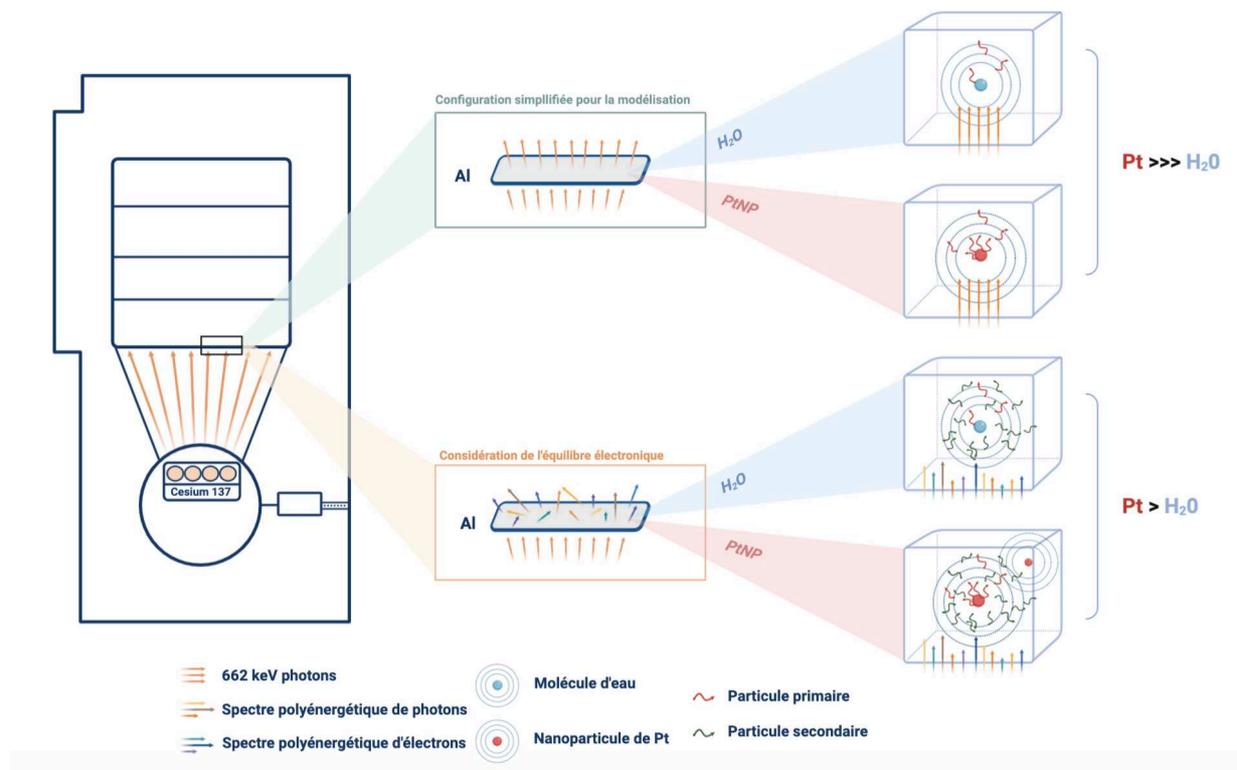


Figure 88 : Schéma illustrant la nécessité de la prise en compte de l'équilibre électronique préalable à la modélisation des interactions des rayonnements gamma avec les nanoparticules pour la mesure d'une Dose Enhancement Factor (DEF) réaliste. Réalisé avec BioRender.

Discussion

En tenant compte de ces considérations, les modélisateurs avec lesquels nous collaborons ont calculé les spectres de photons et d'électrons, résultant de l'équilibre électronique, et susceptibles d'interagir avec les PtNP ou l'eau dans les volumes modélisés (Figure 88). Dans ces conditions plus réalistes, nous obtenons un DEF localisé de 3,1 qui aurait été 10 fois surestimé dans les conditions simplifiées sus-décrites (Figure 8 de l'article PtNP). Les spectres nous indiquent que la majeure partie des électrons contributifs au DEF sont des électrons Auger de faible énergie et dont le parcours moyen est limité à 200 nm autour des PtNP. Le modèle de DEF localisé à la surface des nanoparticules de platine que nous obtenons est cohérent avec ceux calculés pour les nanoparticules d'oxyde d'hafnium (Maggiorella et al., 2012) et écarte un peu plus l'hypothèse d'une augmentation globale de la dose telle qu'initialement proposée.

Les observations expérimentales par microscopie électronique de la localisation (Figure 70) et de l'état d'agrégation des nanoparticules par sp-ICPMS (Figure 50) telles que nous les apportons, sont déterminantes pour rendre les hypothèses de modélisation plus vraisemblables. En effet, les phénomènes d'auto-absorption sont susceptibles de limiter le DEF si les nanoparticules sont agglomérées (Byrne et al., 2019). A l'inverse, la connaissance physique de l'énergie et de la distance moyenne parcourue par les électrons secondairement émis a d'autant plus d'importance pour le Biologiste que les nanoparticules sont le plus souvent localisées dans des structures endo-lysosomales, à distance du noyau. Compte tenu de l'absence de nanoparticules dans le compartiment nucléaire et de la faible énergie des électrons produits secondairement aux interactions des RI avec les nanoparticules, un effet génotoxique direct des électrons Auger est peu probable. D'ailleurs, nous n'observons ni l'augmentation du nombre initial, ni la persistance des foci H2AX en réponse au double traitement par PtNP et irradiation gamma à 6 Gy en comparaison à une irradiation seule (Figure 6 de l'article PtNP). Néanmoins, le confinement des nanoparticules dans des structures endosomales ne semble pas s'opposer à un potentiel radio-sensibilisant puisque les AuNP de 1,9 nm localisées dans les lysosomes radio-sensibilisent des MDA-MB-231 à différents niveaux d'énergie, sans lien avec une augmentation des cassures double-brins (Jain et al., 2011).

La théorie centrée autour d'un mécanisme d'action ciblant principalement l'ADN est initialement construite sur la prédiction d'une augmentation globale de la dose déposée du fait du différentiel d'absorption massique des nanoparticules de haut-Z. Or, comme les effets principalement recherchés en réponse à la radiothérapie sont les cassures double-brins de l'ADN et qu'elles ont lieu de façon proportionnelle à la dose déposée, l'augmentation globale de la dose devait résulter en une augmentation de l'intensité des effets propres à la radiothérapie. Dans ce contexte, le potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules a régulièrement été exploré sur des modèles moléculaires tels que des

plasmides sur lesquels il est possible de mesurer le nombre de cassures de l'ADN en réponse au double-traitement par irradiation et par exemple, par des PtNP (Porcel et al., 2010) ou par des AuNP (Brun et al., 2009). L'augmentation proportionnelle des cassures double-brins sur ces modèles a alors renforcé la « vision » génotoxique de la radio-sensibilisation par des nanoparticules.

Cependant, le changement de paradigme vers la validation des modèles d'augmentation localisée de la dose à la surface des nanoparticules ne permet plus de supporter la relation entre le DEF et l'effet génotoxique. D'un point de vue physique, une autre étude de modélisation, basée sur des quantités empiriques d'AuNP internalisées, montre un effet radio-sensibilisant minimal de ces nanoparticules aux méga voltages et cet effet est indépendant d'une atteinte à l'ADN (Heuskin et al., 2017). D'un point de vue biologique, E. Pagáčová ne relate également pas d'augmentation du nombre de foci H2AX/53BP1 en comparaison à une irradiation gamma à 6 Gy par le double-traitement avec différentes nanoparticules (AuNP de 2,4 nm, des PtNP de 2,6 nm ou des GdNP de 2 nm) (Pagáčová et al., 2019).

Dans la recherche d'une meilleure compréhension de l'effet radio-sensibilisant, les collaborations entre biologistes, physiciens et chimistes devraient permettre de développer des outils de modélisation plus sophistiqués pour prendre en compte la géométrie de l'irradiation, en particulier en considérant l'équilibre électronique dans les études micro-dosimétriques, et pour intégrer des paramètres biologiques expérimentaux tels que la quantité de nanoparticules internalisées mais aussi le pH ou la température. Les efforts placés dans la réduction des temps de calculs permettent par ailleurs d'introduire de nouvelles espèces radicalaires pour une modélisation plus fidèle de la phase radiochimique et devraient faciliter le raisonnement sur le comportement paradoxal des nanoparticules de haut-Z vis-à-vis du stress oxydatif.

En effet, face à la difficulté à imputer le potentiel radio-sensibilisant observé *in vitro* à des lésions de l'ADN, le rôle du stress oxydatif est régulièrement suggéré pour expliquer les effets radio-sensibilisants liés aux nanoparticules (N. N. Cheng et al., 2012) (Penninckx et al., 2020). Néanmoins, la mesure directe du stress oxydatif est complexifiée par l'absence de méthodes robustes. Les sondes fluorescentes disponibles ne sont spécifiques que de certaines espèces réactives et sont extrêmement sensibles aux paramètres expérimentaux avec une faible stabilité de leur fluorescence (Howard et al., 2020). Nous avons choisi d'utiliser la sonde dihydroéthidium (DHE), spécifique du radical hydroxyle et dont la stabilité de la forme oxydée semble supérieure aux autres sondes telles que DCFDA, grâce à son intercalation dans l'ADN. Si la réduction de la sonde DHE n'est a priori pas possible, cette sonde reste délicate à manipuler par son extrême sensibilité à la lumière. Elle nous permet néanmoins de mettre en évidence une production de stress oxydatif dépendante de la dose d'irradiation (Figure 43) mais également du type cellulaire (Figure 5 de l'article PtNP).

Discussion

Cependant, les mécanismes à l'origine d'une augmentation du stress oxydatif médié par la présence des nanoparticules ne sont pas seulement liés à une augmentation localisée de la dose en lien avec l'augmentation de la radiolyse de l'eau. En effet, l'interface des nanoparticules n'est pas inerte et les nanoparticules peuvent présenter des propriétés catalytiques et cela d'autant plus que leur surface spécifique augmente. Le stress oxydatif produit dépend alors du type de métal, de la taille mais aussi de la chimie de surface des nanoparticules (Howard et al., 2020). Suite à l'exposition des lignées T47D et MDA-MB-231 aux PtNP de 4 nm, nous mettons en évidence une augmentation de l'oxydation de la sonde DHE en l'absence d'irradiation. A l'inverse, en conditions pro-oxydantes suite à l'exposition à de la ménadione, les PtNP montrent un potentiel anti-oxydant déjà décrit pour d'autres PtNP de 5 et 20 nm sur le modèle cellulaire THP1 (Gatto et al., 2018). Ce double effet suggère que les PtNP ont non seulement la capacité de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) à leur surface mais aussi à les capter dans le milieu environnant. Il en résulte un équilibre entre les ROS libres, mesurables par la sonde, et les ROS piégées par les PtNP. Cet équilibre dépend à la fois de la quantité de PtNP, de leur chimie de surface et se traduit par une quantité stable de sonde DHE oxydée dans les cellules ayant été préalablement exposées aux PtNP, indépendamment d'une irradiation (Figure 5 de l'article PtNP). Compte tenu de la complexité de ces effets, nous ne sommes pas en mesure d'objectiver une augmentation du stress oxydatif en réponse au double-traitement et suggérons d'ajouter les spécificités cellulaires à la multitude des paramètres susceptibles d'influencer la survenue d'un effet radio-sensibilisant.

Pour commencer, l'EMT, qui est une des raisons de l'hétérogénéité intra-tumorale dans le cancer du sein, génère des cellules mésenchymateuses au métabolisme oxydatif différent et plus riche en défenses anti-oxydantes que celui des cellules épithéliales (Luo et al., 2018). Cela s'illustre dans nos modèles cellulaires avec taux de stress oxydatif basal plus important dans les cellules T47D épithéliales. A ces capacités anti-oxydantes différentes, s'ajoutent des meilleures capacités de réparation de l'ADN en lien avec le caractère souche croisé pour le phénotype CD24⁻/CD44⁺ (Schulz et al., 2019) et une internalisation préférentielle des nanoparticules telle que nous l'avons préalablement décrite.

Les singularités liées aux modèles cellulaires et aux différents types de nanoparticules ne permettent pas de conclure sur un mode d'action qui serait général aux nanoparticules de haut-Z quant à leur potentiel radio-sensibilisant. Les possibilités d'inter-comparaisons des études sont alors très limitées (Her et al., 2017) d'autant plus que les résultats négatifs sont rarement publiés. En pratique, un potentiel radio-sensibilisant peut être observé *in vitro* pour des conditions spécifiques liées à une nanoparticule, une énergie et un type cellulaire sans qu'aucun de ces 3 paramètres ne puisse être seul garant d'un effet radio-sensibilisant dans des nouvelles conditions ou un des paramètres du triptyque serait modifié. A l'inverse, l'absence d'effet radio-sensibilisant d'une nanoparticule de haut-Z dans un

système cellulaire *in vitro* ne suffit pas à écarter son potentiel thérapeutique *in vivo* comme nous l'observons avec les AuNP de 32 nm pour lesquelles les expériences préliminaires menées sur les modèles murins de carcinogenèse mammaires PYMT sont prometteuses alors même que nous n'observons pas d'effet franc *in vitro*.

En effet, nous avons réalisé une étude très préliminaire sur des souris MMTV-PyMT qui développent spontanément des tumeurs mammaires (jusqu'à 7 tumeurs simultanément dans notre panel) en injectant des AuNP PEGylées de 32 nm par voie intra-tumorale et/ou en irradiant localement à 10 Gy les deux tumeurs cervicales par un micro-irradiateur X SARRP. Bien que l'étude ne soit limitée qu'à quelques souris et que la cinétique de développement tumoral soit hétérogène aux vues de la taille de l'échantillon, nous observons comme attendu un arrêt de la croissance tumorale en réponse à l'irradiation alors que le volume des tumeurs non irradiées continue de croître (Figure 58). Le traitement préalable des tumeurs par les AuNP conduit soit à la régression du volume tumoral irradié soit à sa stagnation. Les conditions de l'étude et notamment son arrêt prématuré après deux semaines de suivi, ne permettent pas d'atteindre la reprise de la croissance des tumeurs irradiées et d'ainsi pouvoir objectiver un délai de la progression tumorale qui signerait un effet radio-sensibilisant. Néanmoins, nous observons un effet qui semble différentiel entre les tumeurs non injectées-non irradiées des souris ayant reçu un simple traitement par irradiation ou le double-traitement avec des nanoparticules. Dans le premier cas, les tumeurs non irradiées poursuivent indifféremment leur croissance ; dans le second, les tumeurs non irradiées-non injectées semblent avoir ralenti ou arrêté de proliférer. Bien que limitée dans le temps et dans le nombre de souris, cette étude produit des résultats encourageants qui s'inscrivent dans la lignée des résultats récemment publiés pour décrire l'effet radio-sensibilisant des nanoparticules d'oxyde d'hafnium NBTXR3 *in vivo* (Zhang et al., 2020). De fait, les auteurs explorent la réponse différentielle de tumeurs colorectales xénogreffées sur chaque flanc de souris Balb/c en comparant la croissance des tumeurs ayant reçu une injection intra-tumorale de NBTXR3 préalablement à une irradiation de 12 Gy délivrée en 3 fractions, aux tumeurs situées sur le flanc opposé des souris qui ont reçu un simple- ou un double-traitement localisé. Similairement à nos observations, l'ampleur de la réponse anti-tumorale à l'irradiation localisée ne laisse pas de fenêtre pour l'objectivation d'un éventuel surajouté de nanoparticules en termes de croissance tumorale. Néanmoins, les tumeurs non injectées-non irradiées, situées à distance du champ d'irradiation, semblent bénéficier d'un effet abscopal avec une progression plus lente médiée par une infiltration de lymphocytes T cytotoxiques dans le cas d'un pré-traitement avec les nanoparticules.

L'effet abscopal, qui décrit une réponse anti-tumorale à distance médiée par l'activation du système immunitaire adaptatif, fait l'objet d'un nombre croissant de recherches ces cinq dernières années,

Discussion

notamment depuis la mise sur le marché des premiers inhibiteurs des points de contrôle immunitaire. Sa description participe à la compréhension des effets systémiques de la radiothérapie et mène à considérer plus largement la réponse anti-tumorale par ses composantes inflammatoires et immunes, et non plus restreintes aux seules étapes radiochimiques et à leurs conséquences génotoxiques. Dans ce contexte, les nanoparticules pourraient agir à deux niveaux pour augmenter la réponse anti-tumorale immune : soit en participant directement à l'activation des cellules présentatrices d'antigènes par la captation d'antigènes tumoraux à leur surface (Morales-Orue et al., 2019) soit indirectement en augmentant la mort cellulaire immunogénique, le relargage de cytokines inflammatoires et l'infiltration de cellules immunitaires. L'activation de la voie cGas/Sting, faisant suite au relargage d'ADN cytoplasmique en réponse à l'irradiation des cellules tumorales colorectales exposées à NBTXR3 *in vitro*, oriente davantage sur l'hypothèse d'une mort immunogénique augmentée (Marill et al., 2019).

La fréquence des effets abscopaux étant rare en clinique, de nouvelles approches thérapeutiques sont développées afin de stimuler l'immunité anti-tumorale par la combinaison d'agents immunomodulateurs avec la radiothérapie et désormais avec des nanoparticules. Par ailleurs, ces effets sont difficiles à objectiver et extrêmement dépendants du type de rayonnement, du transfert d'énergie linéique, du volume irradié mais surtout de la dose délivrée et du schéma de fractionnement (Sun et al., 2014). Ils nécessitent donc la compréhension des mécanismes individuels et croisés pour favoriser le dialogue entre les différents acteurs nanoparticules/irradiation/système immunitaire et ainsi accumuler les effets délétères selon une séquence de traitements optimale. L'utilisation de modèles précliniques immunocompétents est alors indispensable et la caractérisation de modèles tels que les souris MMTV-PyMT, qui présentent spontanément des tumeurs mammaires dont l'évolution est représentative de la carcinogenèse humaine jusqu'aux étapes tardives de métastase pulmonaire (Attalla et al., 2020) apparaît être une piste prometteuse nous permettant à la fois d'explorer un effet radio-sensibilisant médié par le système immunitaire mais également de considérer les tumeurs mammaires dans leur hétérogénéité.

Conclusions et Perspectives

Dans le contexte du cancer du sein, l'hétérogénéité tumorale est à l'origine d'une réponse différentielle aux traitements et en particulier à la radiothérapie. La sous-population cellulaire identifiée par le phénotype membranaire CD24⁻/CD44⁺ a préalablement été décrite comme présentant à la fois des propriétés souches de radio-résistance couplée à une forte tumorigénicité mais aussi un phénotype mésenchymateux associé à un potentiel d'initiation de la cascade métastatique. L'objectif de notre étude était d'évaluer le potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules de haut-Z, décrites comme prometteuses pour potentialiser les effets d'une irradiation, tout en s'assurant de leur accumulation suffisante dans la population de cellules tumorales CD24⁻/CD44⁺.

En cherchant à évaluer *in vitro* le potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules de haut-Z sur nos modèles de cellules tumorales mammaires plus ou moins différenciées, nous avons mis en évidence et généralisé l'internalisation préférentielle des nanoparticules, indépendamment de leurs propriétés physico-chimiques, dans les cellules mésenchymateuses les moins différenciées. Grâce à ce travail, nous montrons que de nouveaux paramètres sont à considérer pour comprendre l'interaction des nanoparticules avec les cellules. Nous déplaçons ainsi le paradigme d'un raisonnement « nano-centré » vers la prise en considération de paramètres relatifs à l'environnement biologique et aux spécificités cellulaires dans la compréhension de l'interface cellulaire avec les nanoparticules. Nous mettons particulièrement en lumière l'importance de la matrice extra-cellulaire qui ne peut pas être réduite à une simple barrière physique inerte s'opposant à la diffusion des nanoparticules vers la membrane plasmique. Face au constat d'une dérégulation, à la fois de l'expression de l'enzyme HAS2 à l'origine de la synthèse de l'acide hyaluronique, mais aussi de son principal récepteur CD44 au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse, nous suggérons une possible internalisation des nanoparticules en lien avec l'endocytose de l'acide hyaluronique au cours du recyclage de CD44. Le récepteur CD44 étant surexprimé à la surface des cellules tumorales mammaires les plus radio-résistantes, ces observations sont particulièrement prometteuses pour les applications de radio-sensibilisation avec des nanoparticules pour lesquelles un dépôt de dose surajoutée est attendu dans les cellules ayant internalisé des nanoparticules.

L'augmentation de la dose déposée localement selon le principe physique du différentiel d'absorption massique est le plus souvent associée à des lésions génotoxiques directes et/ou indirectes, suite à l'augmentation du stress oxydatif. De plus, d'une manière générale l'effet radio-sensibilisant des nanoparticules de haut-Z n'est montré dans la littérature que dans des conditions singulières concernant la nature des nanoparticules, le modèle cellulaire considéré et l'énergie du faisceau de RI.

Globalement, nos résultats ne nous permettent pas de conclure à un effet surajouté des nanoparticules de platine de 4 nm ni à un effet franc des nanoparticules d'or de 32 nm sur les cellules épithéliales et mésenchymateuses mammaires en réponse à une irradiation au césium 137. Chaque situation semble particulière et le principe d'action physique ne semble pas prédominer. En effet, lorsqu'il existe, l'effet « *enhancer* » est parfois attribué à l'augmentation des dommages à l'ADN, parfois à du stress oxydatif mais aussi à une redistribution dans le cycle cellulaire vers des phases plus radio-sensibles ou à une altération des capacités de réparation de l'ADN. Ces dernières sont finalement plus en lien avec des spécificités cellulaires qu'avec des propriétés dépendantes de la nature des nanoparticules ou de l'énergie du rayonnement ionisant. Il semble alors plus robuste d'étudier parallèlement la réponse de plusieurs types cellulaires dans la recherche d'un mécanisme d'action. Cela est d'autant plus souhaitable que la réponse biologique résulte probablement de mécanismes physiques et chimiques complexes qui peuvent agir en synergie ou en antagonisme. Nous avons par exemple mis en lumière le potentiel oxydo-réducteur des nanoparticules de platine en lien avec leur surface catalytique. Selon la nature du stress oxydatif induit et la nature du test réalisé, les conclusions peuvent être erronées voire contradictoires.

Les études *in vitro* ne semblent donc pas être adaptées à la compréhension du potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules métalliques de haut-Z tel qu'initialement décrit *in vivo* et plus récemment tel qu'explicité au travers d'études *in vivo* suggérant l'importance de l'effet abscopal. Néanmoins, l'enrichissement mutuel des données de modélisation physique de la dose déposée en lien avec des paramètres expérimentaux (tels que la taille, la localisation, la quantité et l'état d'agrégation des nanoparticules) peut renseigner sur les paramètres limitants et/ou essentiels à l'obtention d'un différentiel de dépôt de la dose en lien avec la présence de nanoparticules intracellulaires. Ces études permettent pour le moment d'écarter la piste d'effets génotoxiques directs tels qu'initialement envisagés mais les mécanismes exacts de la radio-sensibilisation par les nanoparticules de haut-Z sont toujours recherchés.

L'activation du système immunitaire *in vivo* pour la mise en œuvre d'un effet abscopal est une piste prometteuse pour explorer l'effet radio-sensibilisant. Les études cliniques en cours pour étudier le potentiel de l'association « nanoparticules/radiothérapie/immunothérapie » témoignent de l'intérêt porté à cette approche. Néanmoins, cette approche est multiparamétrique et nécessite une optimisation de la nature des nanoparticules, de la nature des rayonnements, de leur énergie, des schémas thérapeutiques et la prise en considération de la dose et du débit de dose.

La prise en compte de la dose déposée est un paramètre primordial pour s'assurer de l'efficacité de la radiothérapie d'une part, particulièrement pour la compréhension des mécanismes de la réponse anti-tumorale immune qui est observée pour de faibles doses, et d'autre part pour satisfaire les exigences réglementaires de sûreté nucléaire. Néanmoins, la dose reçue *in situ* n'est jamais mesurée mais seulement calculée par des algorithmes couplés aux systèmes de planification du traitement. Jusqu'à présent, aucun consortium n'a effectué la démonstration de la mesure de la dose *in situ* mais les travaux menés pour optimiser l'internalisation des nanoparticules d'or dans les cellules tumorales mammaires au cours de cette thèse ont aussi participé à la démonstration d'une telle preuve de concept par l'adaptation de techniques de spectroscopie X.

En effet, la mesure de la dose délivrée *in situ* a été rendue possible grâce à un détecteur en Cadmium/Tellurium développé par l'Institut de Recherche sur les lois Fondamentales de l'Univers (IRFU, CEA), initialement destiné à capter la fluorescence X à l'infini et adapté afin de capter le signal de fluorescence X spécifique à l'or irradié. Avec une résolution de 1 keV, le capteur identifie la source et la quantité des photons de fluorescence qui peuvent être caractérisés en spectre X tels que présentés sur les figures 89.A et 89.B.

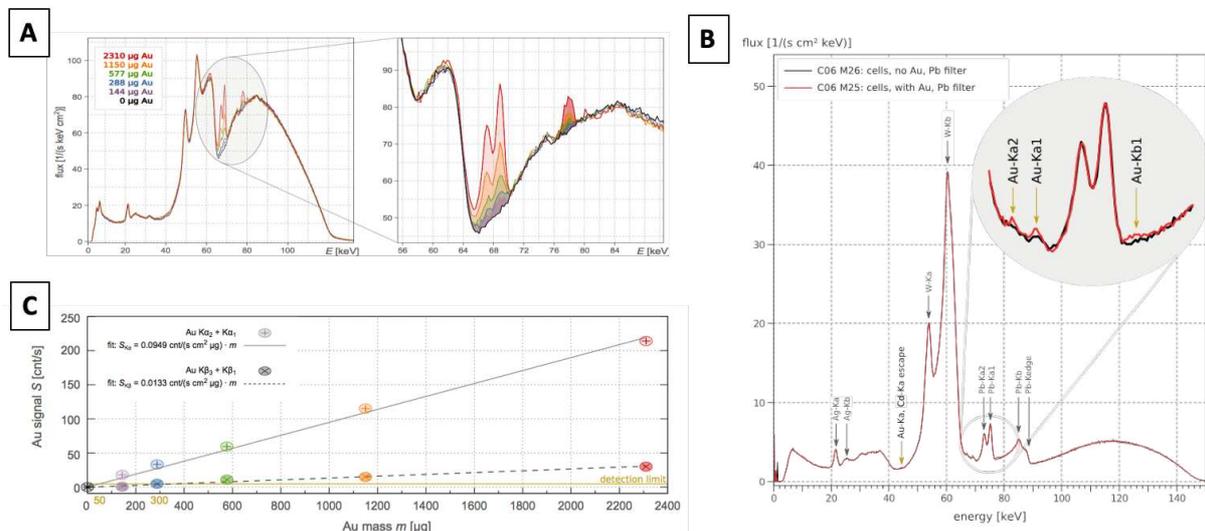


Figure 89 : Preuve de concept sur l'utilisation de nanoparticules d'or pour une de dosimétrie de l'irradiation *in-situ*
 (A) Spectre énergétique des photons diffusés suite à l'irradiation X d'une gamme de nanoparticules d'or de 32 nm ;
 (B) Spectre énergétique des photons diffusés suite à l'irradiation X de MDA-MB-231 préalablement traitées aux AuNP de 32 nm (courbe rouge) ou non (courbe noire). Agrandissement dans la région énergétique des Kα (69 keV) et Kβ (78 keV) de l'or ;
 (C) Gamme d'étalonnage du signal de fluorescence X en regard de la masse d'or.

Les nanoparticules d'or irradiées émettent des raies de fluorescence X aux énergies spécifiquement relatives à la réorganisation de leur cortège électronique (Kα=69 keV et Kβ=78keV). Comme présenté sur les figures 89.A et 89.C, les signaux de fluorescence détectés aux énergies des Kα et Kβ sont

proportionnels à la quantité d'or initialement présente en suspension. L'intégration du rapport de ces raies permet d'estimer l'atténuation du signal dans les tissus traversés et renseigne donc sur la profondeur du dépôt de dose. En connaissant le spectre initial, et la position des raies de fluorescences spécifiques du matériau irradié, il est alors possible de calculer le flux de photons au niveau des nanoparticules et donc la dose de RI localement déposée.

Par cette approche, nous sommes descendus à une sensibilité de détection mesurée de 50 μg d'or internalisés dans les cellules MDA-MB-231 (figure 89.B) ce qui pourrait refléter la sensibilité qui serait atteinte dans le cas d'une tumeur superficielle. Par extrapolation, nous estimons que nous pourrions atteindre une sensibilité de détection aux alentours d'une masse de 20 μg d'or (Figure 89.C).

Cette approche développée pour la mesure de la dose est novatrice et d'autant plus prometteuse qu'elle peut être optimisée pour que les nanoparticules irradiées aient un rôle théranostique : à la fois agent radio-sensibilisant mais aussi levier pour une mesure par spectroscopie X d'une part de la dose de RI délivrée au sein de la tumeur et d'autre part de la quantité de nanoparticules intra-tumorales.

Pour le moment la technique ne permettrait cette dosimétrie que dans des tumeurs superficielles. En effet, la perte de fluorescence X par absorption dans les milieux rencontrés est élevée. Afin de pouvoir traiter et spectro-imager des tumeurs plus en profondeur, il est donc nécessaire d'optimiser le matériau des nanoparticules pour une plus grande sensibilité de détection. Ce levier est envisageable par le développement de nanoparticules bi-métalliques pour lesquelles, la multiplicité des raies de fluorescence augmente d'autant la spécificité du signal et la sensibilité du rapport des raies. Plus les énergies des raies de fluorescence des matériaux choisis seront éloignées, plus la profondeur des tumeurs pour la mesure de la dose sera grande.

La grande polyvalence de la chimie de l'or ainsi que sa biocompatibilité en font un candidat idéal pour la synthèse de nanoparticules bi-métalliques, comprenant une coquille d'or et un cœur constitué par un autre métal, ce qui permettra à terme d'augmenter la radiosensibilité des cellules tumorales et de réaliser une dosimétrie intra-tumorale de l'irradiation en temps réel.

Annexes

Annexe I : Applications biomédicales des nanoparticules métalliques

a. Applications des nanoparticules métalliques en imagerie

L'évolution de l'imagerie médicale vers une médecine de précision offre de nombreuses perspectives notamment en oncologie, où une délimitation plus précise des tumeurs, l'analyse de la dissémination tumorale et de la maladie résiduelle peuvent guider les gestes chirurgicaux et aider à la prise de décision. Les nanoparticules d'or peuvent par exemple être utilisées comme agent de contraste pour des applications en tomodensitométrie (CT-Scan), en tomographie à émission de positons (PETScan) et en imagerie photo acoustique (PAT).

La **tomodensitométrie** (ang : CT-Scan pour *Computed Tomography*) est une des modalités d'imagerie les plus courantes qui apporte des informations anatomiques sur la base des contrastes entre les tissus. Elle permet notamment d'imager les structures anatomiques denses (squelette, etc.) sans contrainte de profondeur d'image. Dans un contexte de diagnostic, le contraste apporté naturellement entre les tissus sains et le tissu tumoral est insuffisant. L'examen requiert donc l'utilisation d'un agent de contraste le plus souvent à base d'iode. Les composés iodés ont un numéro atomique élevé qui les rend particulièrement absorbants pour les rayons X, mais ils peuvent être allergisants ou associés à une toxicité rénale (Pelaz et al., 2017). Les nanoparticules d'or possèdent également une densité électronique élevée du fait de leur haut numéro atomique ($Z=79$), qui leur confère un haut pouvoir d'absorption des rayons X et un potentiel de contraste proportionnel à leur concentration.

Aux énergies utilisées pour le CT-Scan, l'or présente une absorption massique 2,7 fois plus importante que l'iode et les nanoparticules d'or pourraient être utilisées comme alternative.

La **tomographie à émission de positrons** (ang : PETScan) permet de détecter et de suivre des éléments radioactifs. Cette méthode, plus sensible que le CT-Scan, est utilisée dans un contexte d'imagerie moléculaire et permet d'apporter une information quantitative de l'expression de molécules cibles. Les possibilités de fonctionnalisation des nanoparticules métalliques permettent d'envisager un couplage multiple de ces nanoparticules, avec à la fois un isotope radioactif pour suivre leur biocinétique (tel que le cuivre ^{64}Cu) et avec un peptide spécifique de la tumeur à visualiser.

L'**imagerie photo acoustique** (PAT) consiste en l'excitation des tissus par un rayonnement non-ionisant (laser) conduisant à la production localisée de chaleur puis d'ultrasons.

Comme les ultrasons sont peu diffusés dans les tissus, ils permettent, après reconstruction, d'obtenir une meilleure résolution spatiale que les techniques d'imageries optiques, allant jusqu'à une résolution infra-millimétrique à plusieurs millimètres de profondeur (Figure 90).

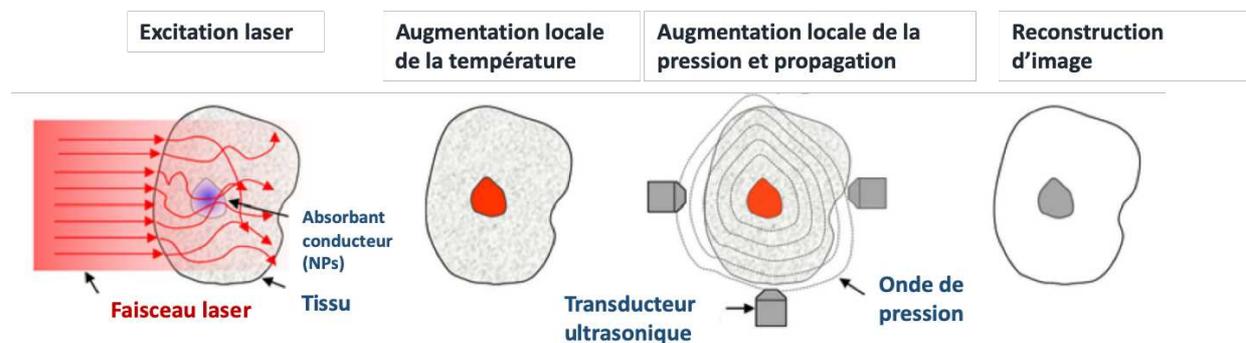


Figure 90 : **Principe de l'imagerie photo acoustique.** En réponse à une excitation optique (lumière laser pulsée), la présence de nanoparticules de haut-Z favorise la conversion des photons en chaleur, provoquant une augmentation locale de la température. Celle-ci se transforme alors en ondes acoustiques détectables permettant la reconstruction d'images 3D. D'après Wang et Yao (L. V. Wang & Yao, 2016).

Avec cette méthode, le contraste est basé sur les capacités différentielles d'absorption de la lumière selon la nature des tissus. L'utilisation de nanoparticules pour densifier la matière peut être optimisée afin d'imager spécifiquement certaines structures. En particulier, les nanoparticules d'or qui ont des propriétés d'absorption intense de la lumière, du fait de leur plasmon de résonance, peuvent être fonctionnalisées pour la détection spécifique de structures tissulaires ou cellulaires (Padmanabhan et al., 2016).

b. Applications des nanoparticules métalliques en diagnostic

Les propriétés singulières des nanoparticules liées à leur rapport surface/volume élevé ainsi que les possibilités d'adaptation de leur chimie de surface améliorent la sensibilité des tests de diagnostic. En effet, leur fonctionnalisation multiple permet d'obtenir plusieurs informations simultanément et donc d'améliorer la performance des tests tout en réduisant la taille des supports et les quantités d'échantillons nécessaires au diagnostic. Ainsi, les supports diagnostiques à base de nanoparticules métalliques permettent la détection de petites molécules, de protéines, d'acides nucléiques, de pathogènes ou de cellules cancéreuses (Zhou et al., 2015).

Les stratégies de détection des molécules biologiques associées à un état de santé ou à une pathologie sont alors rapides, non invasives et dépendantes des propriétés des nanoparticules singulièrement exploitées : optiques, électrochimiques ou piézoélectriques (Sasidharan & Monteiro-riviere, 2015).

Par exemple, les propriétés optiques de nanoparticules d'or peuvent être exploitées pour la détection colorimétrique d'oligonucléotides. La position du plasmon de résonance de nanostructures étant fonction de leur état d'agrégation, il est possible de distinguer à l'œil nu une suspension colloïdale de nanoparticules d'or dispersées de son équivalent agrégé.

Comme illustré figure 91, la reconnaissance de l'analyte, par hybridation avec un oligonucléotide complémentaire greffé à la surface de nanoparticules d'or, conduit à la formation d'un complexe, assimilable à une agrégation de nanoparticules. La présence de l'analyte est alors caractérisée par un changement de couleur de la suspension (du rouge au bleu), résultant d'un déplacement du plasmon de résonance vers une longueur d'onde plus élevée.

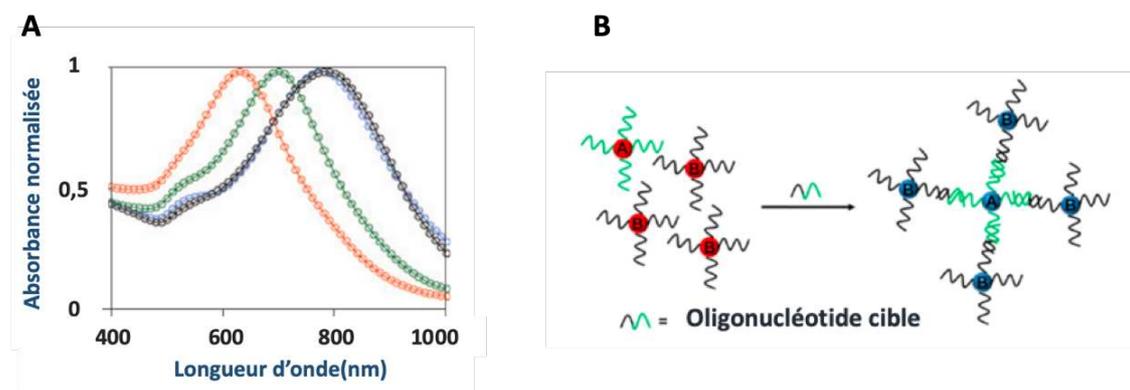


Figure 91 : Principe d'utilisation des propriétés optiques de nanoparticules d'or pour des applications diagnostiques.

(A) *Spectre visible-proche infrarouge illustrant le déplacement de plasmon en réponse à un traitement. Nanoparticules d'or (courbe noire), échantillon contrôle (courbe bleue), concentrations croissantes d'échantillons tests (courbes vertes et oranges). D'après Zhou (Zhou et al., 2015).*

(B) *Principe de l'utilisation du plasmon de résonance de nanoparticules d'or pour la détection d'oligonucléotides par un test colorimétrique. En présence de l'oligonucléotide cible, les nanoparticules provoquant un déplacement du plasmon de résonance. D'après Yang (X. Yang et al., 2015).*

c. Applications des nanoparticules métalliques en thérapie

La **thérapie photo-thermique** ou ablation thermique vise une hyperthermie localisée à l'origine d'une dénaturation des protéines et d'une déstabilisation membranaire délétères pour les cellules visées. Ce procédé utilise des lasers précis mais dont la cible n'est pas spécifique des structures cellulaires à

éliminer. Il peut donc être utilisé pour le traitement de tumeurs peu profondes (cutanées ou oculaires) pour lesquelles la résolution du laser est maîtrisée.

L'utilisation de nanoparticules d'or pour médier l'hyperthermie repose essentiellement sur leurs propriétés plasmoniques. En effet, à la longueur d'onde de leur plasmon de résonance, l'oscillation des électrons à la surface des nanoparticules provoque une absorption massive de la lumière. Les procédés de relaxation électrons/phonons facilitent alors la conversion d'énergie lumineuse en énergie thermique et la chaleur ainsi produite est transmise au milieu environnant. Comme l'emplacement du plasmon de résonance dépend des propriétés physico-chimiques des nanoparticules, il est possible d'en modifier la forme ou la taille afin de produire des nanoparticules à l'absorption massive dans le proche infra-rouge. A ces longueurs d'onde, le corps n'absorbe que très peu et il est relativement transparent à la lumière. La densification de la matière par des nanoparticules spécifiquement accumulées dans des cellules cancéreuses rend alors possible le traitement spécifique de tumeurs non superficielles (Beik et al., 2016).

La photo-thermie médiée par des nanoparticules est testée cliniquement notamment par NanoSpectra avec sa technologie AuroLase® qui utilise des nanoparticules de structure cœur-coquille (silice-or), optimisées pour une absorption dans le proche infra-rouge. La première indication vise le traitement de cancers prostatiques, pour lesquels le développement de thérapies plus localisées et moins toxiques pour les cellules saines que la chimiothérapie ou la radiothérapie permettrait d'éviter des complications urologiques (Rastinehad et al., 2019).

Article

Gold Nanoparticle Uptake in Tumor Cells: Quantification and Size Distribution by sp-ICPMS

Johanna Noireaux¹, Romain Grall², Marie Hullo², Sylvie Chevillard², Caroline Oster¹, Emilie Brun³ , Cécile Sicard-Roselli³, Katrin Loeschner⁴  and Paola Fiscaro^{1,*}

¹ Department for biomedical and inorganic chemistry, LNE, 75015 Paris, France; johanna.noireaux@lne.fr (J.N.); caroline.oster@lne.fr (C.O.)

² Experimental cancerology laboratory, CEA, 92260 Fontenay-aux-Roses, France; romain.grall@cea.fr (R.G.); marie.hullo@cea.fr (M.H.); sylvie.chevillard@cea.fr (S.C.)

³ Laboratoire de Chimie Physique, UMR CNRS 8000, Université Paris Sud, 91405 Orsay, France; emilie.brun@u-psud.fr (E.B.); cecile.sicard@u-psud.fr (C.S.-R.)

⁴ National Food Institute, Technical University of Denmark, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark; kals@food.dtu.dk

* Correspondence: paola.fiscaro@lne.fr

Received: 31 October 2018; Accepted: 13 December 2018; Published: 9 January 2019



Abstract: Gold nanoparticles (AuNPs) are increasingly studied for cancer treatment purposes, as they can potentially improve both control and efficiency of the treatment. Intensive research is conducted in vitro on rodent and human cell lines to objectify the gain of combining AuNPs with cancer treatment and to understand their mechanisms of action. However, using nanoparticles in such studies requires thorough knowledge of their cellular uptake. In this study, we optimized single particle ICPMS (sp-ICPMS) analysis to qualify and quantify intracellular AuNP content after exposure of in vitro human breast cancer cell lines. To this aim, cells were treated with an alkaline digestion method with 5% TMAH, allowing the detection of gold with a yield of 97% on average. Results showed that under our experimental conditions, the AuNP size distribution appeared to be unchanged after internalization and that the uptake of particles depended on the cell line and on the exposure duration. Finally, the comparison of the particle numbers per cell with the estimates based on the gold masses showed excellent agreement, confirming the validity of the sp-ICPMS particle measurements in such complex samples.

Keywords: sp-ICPMS; gold nanoparticles; tumor cells; nanoparticle uptake

1. Introduction

In 2016, 51 FDA-approved nanomedicines were available and 77 nanoproducts were on clinical trials, among which a large number were related to oncology [1]. Nanoparticles are thus increasingly developed for cancer diagnosis and therapy, mainly as drug nanocarriers, but other applications are currently being investigated: in particular, gold nanoparticles (AuNPs) are studied as promising contrast agents and as radiosensitizers in X-ray therapy (also known as high Z radioenhancement) [2]. Two major barriers to break down in nanomedicine are the uptake of nanoparticles by normal tissues and the nanoparticles' inability to efficiently penetrate solid tumors. Overcoming these hurdles is of great interest during the development of efficient gold nanoparticles for therapy, since mass and number of internalized AuNPs and their aggregation state could be overriding parameters for cellular responses. Different pathways of internalization could drive to huge variation in intracellular accumulation of AuNPs and lead to different aggregation states or to sequestration in cellular compartments, and thus to different biological activities. Studying these issues requires robust methods to characterize and quantify gold nanoparticle uptake into cells.

To this aim, single particle ICPMS (sp-ICPMS) appears to be a powerful tool in enabling the analysis of particle sizes, particle mass concentrations, and particle number concentrations. This method is based on ICPMS instruments that allow targeting of inorganic nanoparticles even in a complex matrix by using fast scanning to analyze one particle individually in diluted samples. It has been so far successfully applied to a variety of samples from the environment [3,4], food products [5,6], manufactured goods [7–9], or from biological origins [10–14]. Performing an analysis of biological samples by sp-ICPMS requires a digestion step to release the particles from their biological matrix. At least two methods are currently in use, either an alkaline or an enzymatic digestion. Plant digestions with Macerozyme R-10 (multicomponent enzyme mixture) resulted in a high recovery rate for many different nanoparticles, such as gold nanoparticles [11], but also platinum [12], palladium [15], and cerium oxide nanoparticles [16]. In animal or human tissues, the protease Proteinase K is used. Enzymatic digestion with Proteinase K at an enzyme concentration of around 4 µg Proteinase K per mg wet tissue resulted in a satisfactory size distribution but a 60% lower recovery rate of gold nanoparticles from rat spleen in comparison to alkaline digestion with tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH) [17]. In contrast, silver nanoparticles were satisfactorily recovered from human placenta tissue at an enzyme concentration of 60 µg Proteinase K per mg wet tissue [18] and from chicken meat at an enzyme concentration of 4 µg Proteinase K per mg wet tissue [19]. Another study was able to make successful use of alkaline digestion for both gold and silver nanoparticle extraction from ground beef, *Daphnia magna*, and *Lumbriculus variegatus* [20]. These studies clearly show that nanoparticle extraction must currently be optimized and verified for each nanoparticle–sample pair, as no versatile procedure is available yet. In this study, we optimized the sp-ICPMS method for the analysis of 32 nm PEGylated gold nanoparticles internalized after in vitro exposure of human breast cancer cell lines. PEGylation is among the most common functionalizations, as it lowers opsonization and thus the capture of the nanoparticles by the immune system [21]. Our aim was to validate the use of sp-ICPMS in analyzing intracellular particle size distribution and to quantify their average mass and number per cell for biological and medical research dealing with AuNPs. First, an alkaline digestion procedure was adapted to our samples, then the results obtained with sp-ICPMS were compared to ICPMS acid digestion for validation, and finally the particle numbers per cell were estimated through three different calculation methods.

2. Materials and Methods

2.1. Instruments

Both ICPMS and sp-ICPMS measurements were performed on a Thermo iCAPQ quadrupole ICPMS (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) fitted with a 400 µL/min Micromist concentric quartz nebulizer (Glass Expansion, Melbourne, Australia) and a Peltier cooled cyclonic spray chamber (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany). The instrument daily performance was checked with a tune solution containing Ba, Bi, Ce, Co, In, Li, and U at 1.0 ng/g concentration in 2% HNO₃ and 0.5% HCl. Measurements by sp-ICPMS were performed in time-resolved analysis, and signals (in cps) were exported. Calculations were performed with a custom-made Excel spreadsheet based on the tool developed by Peters and colleagues [22], modified to include transport efficiency calculations using the size method [23]. The sample uptake was determined gravimetrically by weighing ultrapure water three times for 5 min. Operating parameters of the Thermo iCAPQ instrument are listed in Table 1.

2.2. Reagents

Ultrapure water (18.2 mΩ/cm) was obtained from Merck Millipore (Guyancourt, France). Mono-elemental gold solutions and TMAH 25% w/w were obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany), and bovine serum albumin (BSA) 30% in 0.85% sodium chloride was obtained from Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). High-purity (Suprapur) hydrochloric and nitric acids were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Two gold nanoparticle suspensions were used as

reference materials for transport efficiency: NIST RM8012 and BBI 60 nm, obtained from British Biocell International (Crumlin, UK). For calculations, we used the average value of all sizes reference value for 30 nm NIST RM8012 (26.80 ± 0.38 nm, $k = 2$), and we used the product datasheet value of 61.5 ± 4.9 nm for BBI 60 nm.

Table 1. Operating parameters of Thermo iCAPQ in ICPMS and single particle (sp)-ICPMS mode.

	ICP-MS	sp-ICPMS
Plasma power (W)	1550	1550
Plasma gas (mL/min)	0.8	0.8
Cool gas (mL/min)	14	14
Nebulizer gas (mL/min)	1.0	1.0
Spray chamber	Quartz cyclonic spray chamber	
Nebulizer	Quartz concentric	
Measurement mode	STD	STD
Isotope	^{197}Au	^{197}Au
Sample uptake rate (g/min)	~0.4	0.259 ± 0.008
Dwell time (ms)	200	5
Number of scans per measurement	60	18000

2.3. Samples and Sample Preparation

2.3.1. Gold Nanoparticle Synthesis and Functionalization

Gold nanoparticles were prepared through the Turkevich procedure [24] by mixing trisodium citrate (4.6 mL, 1% (*w/v*)) with aqueous KAuCl_4 solution (0.1 mmol, 100 mL), as previously published [25]. Raw batches were functionalized with thiolated polyethylene glycol (PEG) with a molecular weight of 1000 and an amine moiety (SH-PEG1000-NH₂, Interchim, Montluçon, France), and 25 mL of a 40 μM PEG aqueous solution were added to 90 mL of a gold AuNP solution (approximately 1 nM, 11,000 PEG/AuNP) and mixed vigorously at 4 °C during 30 min. The suspension was left undisturbed overnight. Cold temperature was used to promote S anchoring as mentioned in Xia et al. [26]. Three cycles of centrifugation at 18,000 g for 8 min were then performed to remove the excess reactants. The nanoparticles were characterized by UV-visible spectroscopy to estimate their concentration, transmission electron microscopy (TEM) to measure the diameter of their gold core, and dynamic light scattering (DLS) and zetametry to confirm their functionalization. For TEM experiments, 2 μL of AuNP stock solution was deposited onto a formvar/carbon-coated copper grid for 3 min and imaged with a JEOL 1400 TEM instrument (JEOL USA, Peabody, MA, USA) operating at 80 kV. AuNP size was determined from recorded images with ImageJ 1.41 software. For DLS, AuNPs were analyzed on a Malvern NanoZS3600 (Malvern Panalytical, Almelo, Netherlands) at 25 °C (633 nm laser, backscatter mode) after dilution in water (0.08 nM). The hydrodynamic diameter was extracted from intensity measurements, ignoring the rotational diffusion of particles. Zeta potentials were measured on a Malvern instrument NanoZS3600 in 1 mL folded capillary cells on 1 nM AuNP samples in water with a fixed voltage at 150 mV at 25 °C.

According to TEM, AuNPs had a typical quasi-spherical, slightly ovoid shape from Turkevich synthesis and a mean of 31.9 ± 5.3 nm in diameter (Figure 1). Functionalization was assessed by the 5 nm redshift of the plasmon band, the increase of the hydrodynamic diameter from 40.6 ± 1.0 nm for nonfunctionalized, nonwashed nanoparticles to 66.0 ± 2.2 nm for thiolated nanoparticles, and the sign inversion of the zeta potential in ultrapure water from -39 ± 2 mV for citrate-capped AuNPs to 30 ± 5 mV for AuNP @S-PEG1000-NH₃⁺.

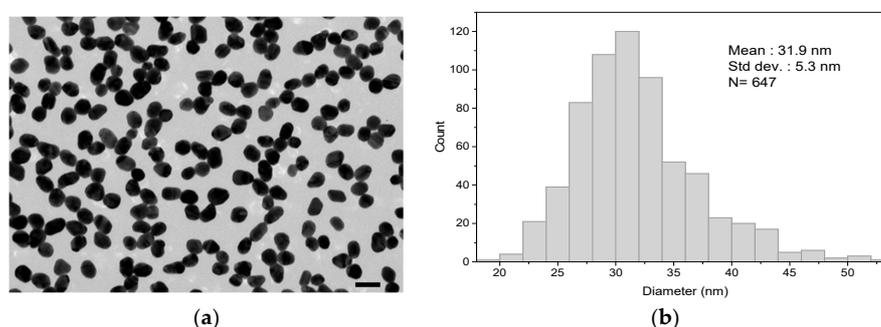


Figure 1. (a) Representative TEM images and (b) size distribution histogram of the PEGylated gold nanoparticles (AuNPs) used in the present study: 647 nanoparticles were manually measured to obtain this distribution. Scale bar in the right bottom corner of (a): 50 nm.

2.3.2. Cell Growth

Tumor cell lines MDAMB231 (ATCC number HTB-26) and T47D (ATCC number HTB-133) were routinely grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), GlutaMAX supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and 1 mM antibiotic-antimycotic (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Briefly, cells were seeded in 25 cm² flasks, 500,000 cells and 1,000,000 cells per flask for MDAMB231 and T47D, respectively. Twenty-four hours later, the medium was removed and fresh medium of AuNP suspension was added, depending on the sample, following the plan detailed in Table 2. After 6 h and 24 h of exposure, supernatants were removed and cells were washed twice with PBS buffer containing calcium and magnesium (Invitrogen), before being harvested with trypsin (Invitrogen). Trypsin was inactivated with fresh complete medium, before centrifugation (1200 rpm, 5 min). Pellets were resuspended in fresh complete medium, and then cells were counted twice (Trypan Blue) and centrifuged again. Finally, to preserve the sample stability, pellets were prepared for sp-ICPMS less than 12 h after centrifugation.

Table 2. Number of cells per condition and gold mass in the medium at the beginning of exposure.

Sample	Gold Mass in Cell Medium	Number of Cells
MDAMB231 (control)	0 µg	2.21 × 10 ⁶
MDAMB231 (6 h)	250 µg	2.01 × 10 ⁶
MDAMB231 (24 h)	250 µg	2.25 × 10 ⁶
T47D (control)	0 µg	1.8 × 10 ⁶
T47D (6 h)	250 µg	2.49 × 10 ⁶
T47D (24 h)	250 µg	2.21 × 10 ⁶

2.3.3. Sample Preparation for Total Gold Mass Concentration Measurements

For total gold mass concentration measurements, samples were digested in 2 mL aqua regia in quartz vials, then microwaved in a Discover SP instrument (CEM, Saclay, France) for 15 min with a 5 min temperature increase to reach a 200 °C plateau, which was maintained for 10 min. After digestion, the samples were diluted in ultrapure water for ICPMS introduction. All dilutions were performed gravimetrically. Blanks were carefully checked, and at least one aqua regia blank per day was digested and diluted following the same procedure as the samples. Digestion blanks did not show any additional gold compared to diluted aqua regia.

To obtain gold recovery rates, one cell test sample (T47D test) was split in two aliquots: the first one was measured by ICPMS after acid digestion, whereas the other one was measured by sp-ICPMS

after alkaline digestion. For the other cell samples, acid digestion was performed on 500 μL of the suspensions obtained after the alkaline digestion of a whole sample.

2.3.4. Sample Preparation for Sp-ICPMS Measurement and Method Validation

Samples were digested for sp-ICPMS measurements using an alkaline method with TMAH based on two previously published methods for biological tissues [17,20]. The TMAH concentration and the addition of BSA were optimized for the specific samples of the present study. The best results were obtained when the samples were digested overnight in 1 mL of 5% TMAH with 10 μL of BSA 1.5 mg/mL. After this digestion step, the suspensions were diluted to the desired concentration in 1% TMAH. Measurements of 1% TMAH were regularly performed for blank corrections, and the instrument was rinsed in ultrapure water for 4 min between each measurement. Control cell samples that were not exposed to gold did not show any additional signal compared to blanks.

All ICPMS measurements on cell samples were performed in a single day following overnight digestion to avoid compromising the samples' stability. Whenever possible, at least two different dilutions of samples were performed, and the average results and standard deviation were reported.

For method validation, AuNP mass concentrations measured by sp-ICPMS were compared to the ICPMS mass concentrations obtained after classic acid digestion and the diameters obtained on reference gold nanoparticles were compared to their reference diameters.

2.4. Calculations

2.4.1. Limits of Detection and Uncertainty

The limit of detection (LOD) by ICPMS was determined as the smallest measurement of dissolved gold standard corrected from the dilutions performed for sample preparation. For sp-ICPMS, the LOD for particle mass concentration was calculated using the ISO 19590 standard equation [27].

In practice, the gold dissolved standards ranged from 0.02 ng/g to 1 ng/g, and all samples (except control samples) were diluted for ICPMS measurements to a mass concentration varying between 0.05 ng/g and 0.5 ng/g. The expanded uncertainties associated with the calculation of the gold mass concentration by ICPMS and sp-ICPMS were obtained according to the law of propagation of the variances of the related parameters following the "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement" [28].

2.4.2. Particle Size

The sizes of the gold nanoparticles are expressed as equivalent spherical diameters (ESDs) and were calculated based on the particle median intensity measured for the gold standard materials with known sizes (NIST RM8012 and BBI 60 nm). The equivalent spherical diameter was deduced from the standard particle diameter (Equation (1)). This calculation required a threshold to be set to distinguish nanoparticle intensity from background intensity:

$$d_p = \left(\frac{I_p - I_0}{R} \right)^{1/3} \quad (1)$$

where I_p is the intensity of a nanoparticle (cps), I_0 is the average intensity of the background (cps), and R is the slope of the linear regression between intensities and the cubed diameter of nanoparticles from the standard materials (cps/nm^3).

2.4.3. Particle Mass Concentration

Particle mass concentration represents the gold masses in suspension attributed to particles. According to IUPAC [29], since all dilutions were performed gravimetrically, it should be named particle mass fraction and be expressed for example in ng/g. However, to avoid confusion and to be

consistent with the particle number concentration (C_p , expressed as part/kg), the expression “particle mass concentration” is used throughout the text.

Particle mass concentration (C_m) was calculated by summing all intensities attributed to particles using a linear regression between intensities and elemental gold concentration (2):

$$C_m = \frac{t_{dwell} \cdot \sum(I_p - I_0)}{60 \cdot t_s \cdot K} \quad (2)$$

where C_m is the particle mass concentration (ng/g), t_{dwell} is the dwell time (ms), t_s is the total duration of a measurement (min), and K is the slope of the linear regression between intensities and elemental gold concentrations (cps/ng/g).

2.4.4. Number Particle Concentration and Transport Efficiency

The number particle concentration was calculated by counting the events attributed to nanoparticles during one measurement, considering the loss of sample in the spray chamber. Therefore, nebulization or transport efficiency needed to be estimated. Three different methods currently exist to estimate it: the frequency method, the size method, and the waste method [23]. In this study, we chose to use the size method, as it is easier to implement than the waste method and is based on the size of gold nanoparticle standard material rather than on the particle number concentration, for which no standard materials are currently available. The transport efficiency was determined by measuring three times two standards with different sizes (NIST RM8012 and BBI 60 nm). The relationship between intensities (cps) and cubed diameter was linear, with a correlation factor of 0.99998. The transport efficiency was 0.0595 ± 0.0020 ($k = 1$), which means that only about 6% of the gold from the samples reached the ICPMS plasma. Though not used in this study, the transport efficiency was also determined in the same measurements session as the frequency method and had a similar value at 0.0602 ± 0.0085 ($k = 1$).

The number particle concentration (C_p) was then determined according to Equation (3):

$$C_p = \frac{N_p}{Q \cdot \eta_{size} \cdot t_s} \cdot 10^3 \quad (3)$$

where C_p is the particle number concentration (part/kg), N_p is the number of detected nanoparticles, Q is the sample uptake rate (g/min), and η_{size} is the transport efficiency.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of Sp-ICPMS Measurements

Measurements by sp-ICPMS with time scans (or dwell time) between 1 ms and 10 ms are based on the hypothesis that only one nanoparticle is detected during each scan. If the dwell time is too long or too short, unwanted events such as double particle events (i.e., two particles detected during the same time scan), or partial events (i.e., the same particle counted twice in two consecutive time scans) may occur. To achieve the best measurement conditions, both dwell time and particle concentrations should be optimized. Laborda et al. [30] estimated that with a 5 ms dwell time and a particle flux reaching plasma comprised of between 4.7 NP/s and 15.2 NP/s, the probability of double events is between 0.03% and 0.28%, which corresponds to 1.3% and 3.8% of the total particle count, respectively. Following these results, we conducted our experiments in order to keep the particle fluxes below 15.2 NP/s. Figure 2 shows the results of the analysis of NIST RM8012 30 nm gold nanoparticles with varying dwell times. Concentrations and analysis duration were adapted in order to approximately obtain 3000 particle events for each tested dwell time. Since the duration of nanoparticle event detection in ICPMS is ca. 300–400 μ s [31], a 1 ms dwell time should be sufficient for the measurement of one single nanoparticle. But such short dwell times tend to increase the amount of nanoparticle partial detection. In fact, it has been shown that a 5 ms dwell time results in less than 10% partial detection,

whereas this ratio could reach almost 30% for a 1 ms dwell time [32]. This is illustrated in Figure 2a, where, with a 1 ms dwell time, the nanoparticle peak was not clearly visible from the background. With 5 ms of dwell time (Figure 2b), the nanoparticle peak was best separated. Although none of these histograms shows perfect distinction between background and particles, we performed our analysis with 5 ms, which we considered to be the best condition.

The determination of the threshold between particles and background is crucial for sp-ICPMS measurements. Various published methods exist to determine this limit or cut-off, such as using the standard deviation of the background or the n-sigma iterative method [33]. However, as previously observed for AuNP measurements on the same instrument, these methods could not be applied in our case, as they result in limits that are either too low or too high [17]. As a consequence, we calculated the average 99.9 centile intensity of all blank measurements of 1% TMAH and used this intensity value as the limit ($I_{cut-off}$) between background and particles. Using the 99.9 centile meant that an average of 7 particles/min were detected in the 1% TMAH blank. This method resulted in a limit that was visually consistent and gave excellent results for all experiments in terms of both gold yields and size (Figure 3).

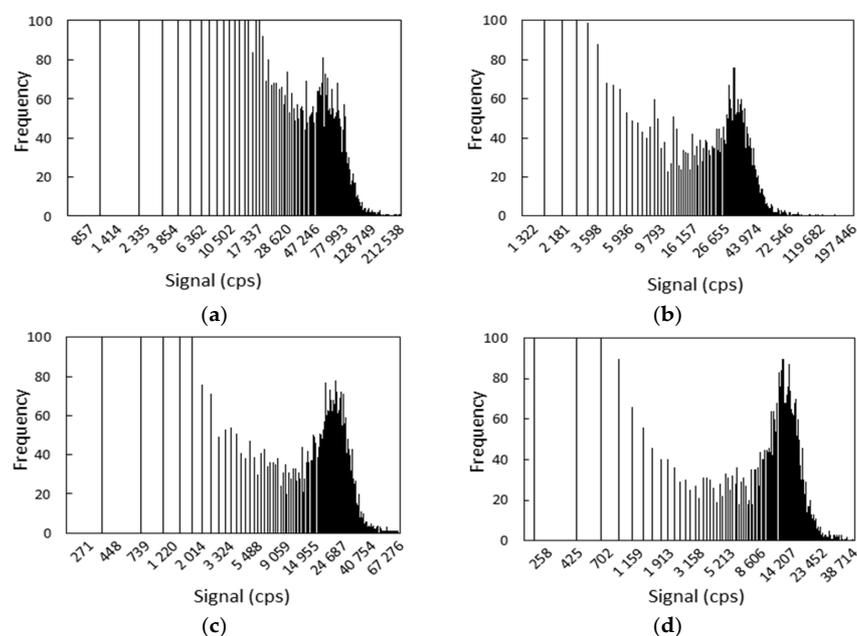


Figure 2. Histograms of signals obtained for a NIST RM8012 suspension with the following dwell time, analysis time, and gold concentrations: (a) 1 ms, 1 min, and 23.2 ng/kg; (b) 2 ms, 2 min, and 9.8 ng/kg; (c) 3 ms, 3 min, and 8.0 ng/kg; (d) 5 ms, 5 min, and 4.9 ng/kg. Note that the x axis has nonlinear scale to better display the limit between background and particles.

Table 3. Sp-ICPMS and ICPMS analysis of the tumor cell samples: d_{50} and d_{avg} are the median and average diameters, respectively; C_m is gold mass per pellet; SD is the standard deviation; U is the expanded uncertainty on the gold masses; C_p is the particle number per pellet. E_N numbers were calculated for the gold masses between the ICPMS and the sp-ICPMS measurements of the same samples. N is the number of independent dilutions analyzed.

Cell Samples	sp-ICPMS							ICPMS					
	d_{50} nm	d_{avg} nm	C_p 10 ⁷ Part	SD	C_m µg	SD	U (k = 2)	N	C_m µg	SD	U (k = 2)	N	E_N
MDAMB231 (control)	-	-	-	-	<0.009	-	-	1	<0.006	-	-	1	-
MDAMB231 (6 h)	32	32	4.8	-	0.019	-	0.003	1	0.020	0.001	0.004	2	0.3
MDAMB231 (24 h)	33	33	41.5	11.8	0.152	0.009	0.031	2	0.123	0.001	0.007	2	0.9
T47D (control)	-	-	-	-	<0.004	-	-	1	<0.006	-	-	1	-
T47D (6 h)	32	32	3.3	0.4	0.014	0.001	0.003	2	0.015	0.001	0.003	2	0.2
T47D (24 h)	32	32	14.9	5	0.057	0.014	0.029	2	0.067	0.007	0.013	2	0.3
T47D (test)	31	31	56	-	0.194	-	0.041	1	0.223	-	0.037	1	0.6

All E_N numbers were below 1, which indicated that the gold masses measured by sp-ICPMS were not significantly different from the ones estimated with ICPMS. The total gold yields were 97% on average for the cell samples. This validated our alkaline procedure for gold nanoparticle extraction from cells and confirmed that alkaline extraction resulted in total gold recovery.

The limit of detection in size was calculated using the cut-off intensity to determine the minimum measurable diameter, which was 18 nm. This value was in agreement with previously published limits of detection in size with quadrupole sp-ICPMS [35]. The median diameter of the PEG AuNPs was 31 nm, and the average diameter was 32 nm, in total agreement with the TEM measurements on these nanoparticles (Figure 1). For the cell samples, the median and the average diameters were similar, and ranged from 31 nm to 33 nm (Table 4). The shapes of the size distributions are shown on Figure 4. They were not different from the initial gold suspension (Figure 4f).

Table 4. Comparison of the average number of nanoparticles per cell between the three methods of quantification: particle number counting with sp-ICPMS (a), particle mass with sp-ICPMS (b), and particle mass with ICPMS (c). RSD: Relative Standard Deviation.

Cell Samples	Part/Cell (a)	Part/Cell (b)	Part/Cell (c)	Mean	RSD
MDAMB231 (6 h)	24	28	30	27	11%
MDAMB231 (24 h)	184	190	154	176	11%
T47D (6 h)	13	17	18	16	15%
T47D (24 h)	67	77	90	78	15%

Thus sp-ICPMS indicated that the gold nanoparticles were not modified in size upon tumor cell uptake in any of the tested cells after 6 and 24 h of exposure. In primary human endothelial cells, no size modification upon uptake was observed by sp-ICPMS upon gold nanoparticle uptake [14]. Indeed, gold nanoparticles are highly resistant and can be used to encapsulate more fragile particles [36]. No aggregation of the nanoparticles was observed in our analysis. It cannot, however, be excluded that the sample preparation with TMAH may have separated particles that were agglomerated in the cells.

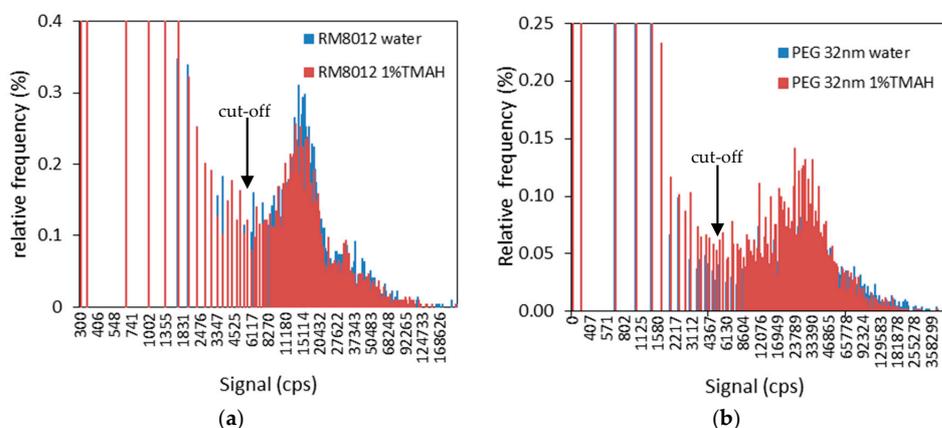


Figure 3. Histogram of signals obtained with a 5 ms dwell time in ultrapure water and 1% TMAH matrix for (a) NIST RM8012 and (b) PEGylated 32 nm gold nanoparticles suspensions.

3.2. Effect of Sample Preparation

Matrix effects can occur in ICPMS due to the presence of large amounts of matrix ions, resulting in plasma destabilization and loss of ions from the plasma to the detector. These matrix effects are usually considered negligible in highly diluted solutions, but TMAH and the ions coming from the dissolved solids and solubilized molecules originating from the cells may still affect nanoparticle ionization and transfer. In addition, digestion and dilution in TMAH may destabilize the gold nanoparticles.

We first checked that the same results were obtained in terms of size and peak shape in ultrapure water and in 1% TMAH. According to Figure 3, the signal distributions and the peak shapes were similar in both matrices, showing no effect of the dilution in 1% TMAH, neither on NIST RM8012 particles nor on the 32 nm PEGylated AuNPs used in the present study.

Then the effect of the digestion on particles in water and on control cells spiked with particles was studied. Higher TMAH concentrations (20%) were used by Gray et al. [20] to extract gold and silver particles with good results, but led in our case to a complete loss of particles for both nanoparticle types after one night (not shown here). Whether this loss occurred by dissolution or aggregation is unclear at this stage. Indeed, a loss by dissolution would have resulted in a signal too low to be distinguished from the blank after dilution, and a loss by aggregation could have resulted in the simple loss of particles by sedimentation in the vial. It was therefore found necessary to keep TMAH concentration low (5%) and to add BSA to preserve the particles, as proposed by Loeschner et al. [17]. The different results obtained with 20% TMAH on apparently similar biological samples may have come from the nature of the nanoparticles. Although they were both AuNPs, the ones from Gray et al. were much larger (100 nm) and had a polyvinylpyrrolidone (PVP) coating, whereas our nanoparticles were smaller and either citrate-stabilized or PEGylated. Further investigations would be required to really understand the effect of TMAH on these various particles and their coatings.

3.3. Gold Recovery and Size Measurements

In order to compare the gold masses obtained by acid digestion followed by ICPMS to those obtained by alkaline digestion followed by sp-ICPMS measurements, the E_N numbers were calculated according to ISO/IEC 17043 [34] using the uncertainty associated with each sample and each technique (Table 3). The aim of the E_N number is to estimate a deviation from a reference value, here the ICPMS bulk gold measurements.

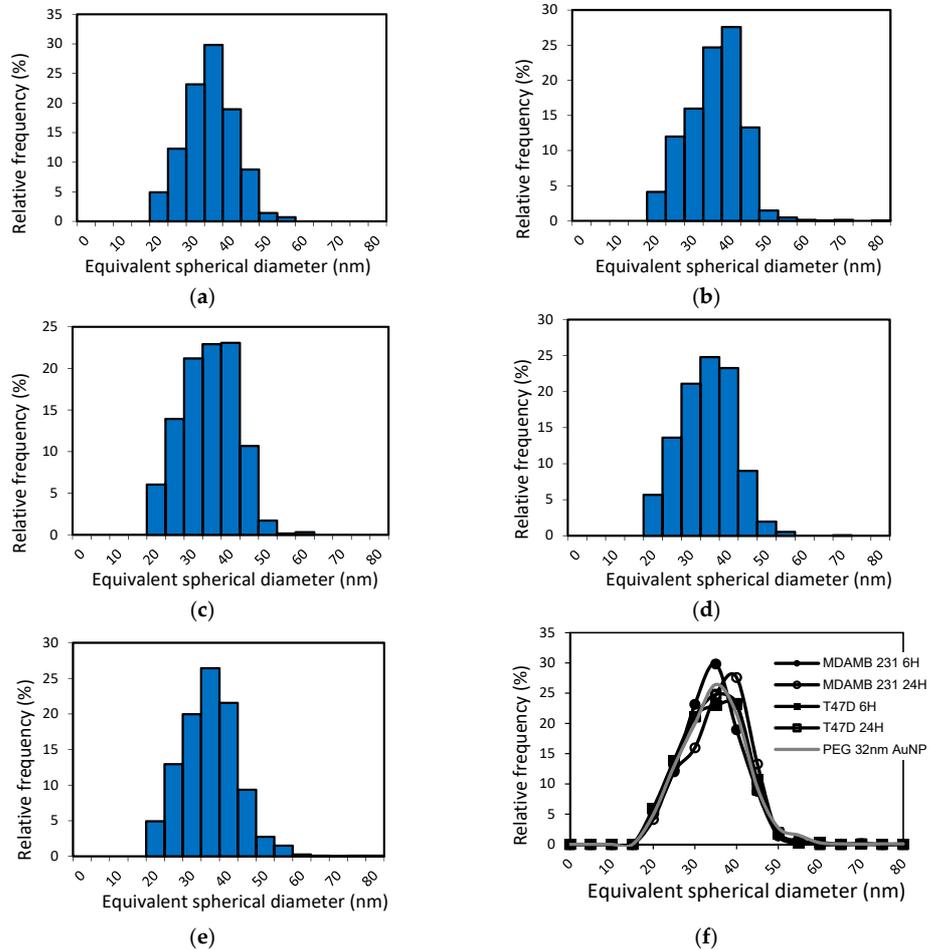


Figure 4. Size distribution of gold nanoparticles in the tumor cells and in suspension: (a) MDAMB231 (6 h); (b) MDAMB 231 (24 h); (c) T47D (6 h); (d) T47D (24 h); (e) 32 nm PEGylated AuNPs; (f) all together.

3.4. Average Particle Number Per Cell

For comparison to the sp-ICPMS results, the particle number concentration could be estimated with a second method, knowing the particle mass concentration and the average particle diameter:

$$C_p = \frac{C_m}{\frac{4}{3}\pi\rho_{\text{Au}}\left(\frac{d}{2}\right)^3} \cdot 10^9 \quad (4)$$

where C_p is the particle number concentration (part/kg) and C_m is the particle mass concentration (ng/g).

We thus compared the average particle number per cell calculated by three methods. The first method, (a), was the sp-ICPMS particle counting based on Equation (3). The second method, (b), was based on the sp-ICPMS total gold mass per pellet and d_{avg} of the particles (Equation (4)). The third one, (c), was based on ICPMS gold mass and d_{avg} of the particles (Equation (4)).

As shown in Table 4, these three methods displayed very similar results with a good relative standard deviation (RSD) between 11% and 15%. It demonstrated that the particle number determined

by counting the particles by sp-ICPMS was consistent with the gold masses obtained. Since no reference material for particle numbers currently exists, this is a first approach in validating particle number measurements.

The mean values for the number of particles per cell ranged from 16 to 176 depending on the cell line and duration of exposure. Overall, the uptake of gold nanoparticles into MDAMB231 cells was twice as high as into T47D cells, whatever the time of exposure, illustrating how important the quantification of nanoparticle uptake within the cells is for understanding AuNP biological effects. Such differences between cell lines have been reported in several publications but have not been rationalized yet [37–39]. For comparison, in MDAMB231 cells incubated with 14 or 50 nm AuNPs functionalized by thiolated PEG of MW 2000, Cruje and Chithrani found 160 or 40 particles per cell, respectively, which is consistent with our results [37].

4. Conclusions

Our work showed that analysis by sp-ICPMS is a suitable tool in studying the uptake of particles at the cellular level. This is relevant for nanomedical applications, but also for nanotoxicological studies where the internalized concentration is of interest. It allows retrieving the size distribution and the average concentration of particles in a cell sample, which is not possible by classical ICPMS analysis. Calculation of particle number per cell based on ICPMS gold mass and average particle diameter might be possible in the case of monomodal AuNPs (as in this study), but is not possible if (a) the particle size is unknown, (b) the particles have a broad size distribution, and (c) the material is not only present in the form of NPs. In these cases, sp-ICPMS can be a suitable technique. TEM analysis is not quantitative regarding NP number per cell, but can provide additional information about NP localization, agglomeration and aggregation (typically not distinguishable) in the cells. Care must still be taken when applying a digestion method for sp-ICPMS, as several methods currently exist, but they cannot be applied to all samples and nanoparticles. In addition, the effects of sample preparation on the particles are not well understood and prevent definitive conclusions on the likelihood of aggregation upon cell uptake. More work is needed to understand these differences and to be able in the future to propose more versatile and controlled sample preparation methods.

Author Contributions: J.N., R.G., K.L., P.F., and S.C. conceived and designed the experiments; J.N., R.G., M.H., C.S.-R., E.B. and C.O. performed the experiments; J.N. wrote the paper; all authors contributed to editing the paper.

Funding: This work was funded by the French metrology 2018 program and benefited from the DRF Impulsion (CEA) and CYTOMETRY/ELECTRONIC MICROSCOPY/LIGHT MICROSCOPY facility of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), a member of IBISA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-BioImaging” (ANR-10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Science” (ANR-11-IDEX-0003-02).

Acknowledgments: Jialan Wang, Enrica Alasonati, and Daniela Stoica are deeply thanked for their help and discussions on this project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 2373–2387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Jain, S.; Hirst, D.G.; O’Sullivan, J.M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* **2012**, *85*, 101–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hadioui, M.; Merdzan, V.; Wilkinson, K.J. Detection and Characterization of ZnO Nanoparticles in Surface and Waste Waters Using Single Particle ICPMS. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 6141–6148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Adeleye, A.S.; Pokhrel, S.; Mädler, L.; Keller, A.A. Influence of nanoparticle doping on the colloidal stability and toxicity of copper oxide nanoparticles in synthetic and natural waters. *Water Res.* **2018**, *132*, 12–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Peters, R.J.B.; van Bommel, G.; Herrera-Rivera, Z.; Helsper, H.P.F.G.; Marvin, H.J.P.; Weigel, S.; Tromp, P.C.; Oomen, A.G.; Rietveld, A.G.; Bouwmeester, H. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: Analytical methods to define nanoparticles. *Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6285–6293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Loeschner, K.; Correia, M.; Chaves, C.L.; Rokkjær, I.; Sloth, J.J. Detection and characterization of aluminium-containing nanoparticles in Chinese noodles by single particle ICP-MS. *Food Addit. Contam. Part A* **2018**, *35*, 86–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Dan, Y.; Shi, H.; Stephan, C.; Liang, X. Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchem. J.* **2015**, *122*, 119–126. [[CrossRef](#)]
8. de la Calle, I.; Menta, M.; Klein, M.; Séby, F. Screening of TiO₂ and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, SP-ICP-MS, ICP-MS and ICP-OES). *Talanta* **2017**, *171*, 291–306. [[CrossRef](#)]
9. Adeleye, A.S.; Oranu, E.A.; Tao, M.; Keller, A.A. Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint. *Water Res.* **2016**, *102*, 374–382. [[CrossRef](#)]
10. Bao, D.; Oh, Z.G.; Chen, Z. Characterization of Silver Nanoparticles Internalized by Arabidopsis Plants Using Single Particle ICP-MS Analysis. *Plant Sci.* **2016**, *7*, 32. [[CrossRef](#)]
11. Dan, Y.; Zhang, W.; Xue, R.; Ma, X.; Stephan, C.; Shi, H. Characterization of gold nanoparticle uptake by tomato plants using enzymatic extraction followed by single-particle Inductively Coupled plasma-mass spectrometry analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 3007–3014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jimenez-Lamana, J.; Wojcieszek, J.; Jakubiak, M.; Asztemborska, M.; Szpunar, J. Single particle ICP-MS characterization of platinum nanoparticles uptake and bioaccumulation by *Lepidium sativum* and *Sinapis alba* plants. *J. Anal. Atomic Spectrom.* **2016**, *31*, 2321–2329. [[CrossRef](#)]
13. Keller, A.A.; Huang, Y.; Nelson, J. Detection of nanoparticles in edible plant tissues exposed to nano-copper using single-particle ICP-MS. *J. Nanopart. Res.* **2018**, *20*, 101. [[CrossRef](#)]
14. Klingberg, H.; Oddershede, L.B.; Loeschner, K.; Larsen, E.H.; Loft, S.; Møller, P. Uptake of gold nanoparticles in primary human endothelial cells. *Toxicol. Res.* **2015**, *4*, 655–666. [[CrossRef](#)]
15. Kińska, K.; Jiménez-Lamana, J.; Kowalska, J.; Krasnodebska-Ostręga, B.; Szpunar, J. Study of the uptake and bioaccumulation of palladium nanoparticles by *Sinapis alba* using single particle ICP-MS. *Sci. Total Environ.* **2018**, *615*, 1078–1085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Dan, Y.; Ma, X.; Zhang, W.; Liu, K.; Stephan, C.; Shi, H. Single particle ICP-MS method development for the determination of plant uptake and accumulation of CeO₂ nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 5157–5167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Loeschner, K.; Brabrand, M.S.J.; Sloth, J.J.; Larsen, E.H. Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 3845–3851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Vidmar, J.; Buerki-Thurnherr, T.; Loeschner, K. Comparison of the suitability of alkaline or enzymatic sample pre-treatment for characterization of silver nanoparticles in human tissue by single particle ICP-MS. *J. Anal. Atomic Spectrom.* **2018**, *33*, 752–761. [[CrossRef](#)]
19. Peters, R.J.B.; Rivera, Z.H.; van Bommel, G.; Marvin, H.J.P.; Weigel, S.; Bouwmeester, H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 3875–3885. [[CrossRef](#)]
20. Gray, E.P.; Coleman, J.; Bednar, A.; Kennedy, A.J.; Ranville, J.F.; Higgins, C.P. Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 14315–14323. [[CrossRef](#)]
21. Jokerst, J.V.; Lobovkina, T.; Zare, R.N.; Gambhir, S.S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 715–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Peters, R.; Herrera-Rivera, Z.; Undas, A.; van der Lee, M.; Marvin, H.; Bouwmeester, H.; Weigel, S. Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *J. Anal. Atomic Spectrom.* **2015**, *30*, 1274–1285. [[CrossRef](#)]
23. Pace, H.E.; Rogers, N.J.; Jarolimek, C.; Coleman, V.A.; Higgins, C.P.; Ranville, J.F. Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 9361–9369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Turkevich, J. Colloidal gold. Part I. *Gold Bull.* **1985**, *18*, 86–91. [[CrossRef](#)]

25. Gilles, M.; Brun, E.; Sicard-Roselli, C. Gold nanoparticles functionalization notably decreases radiosensitization through hydroxyl radical production under ionizing radiation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *123*, 770–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Xia, X.; Yang, M.; Wang, Y.; Zheng, Y.; Li, Q.; Chen, J.; Xia, Y. Quantifying the Coverage Density of Poly(ethylene glycol) Chains on the Surface of Gold Nanostructures. *ACS Nano* **2012**, *6*, 512–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. International Organization for Standardization. *Nanotechnologies—Size Distribution and Concentration of Inorganic Nanoparticles in Aqueous Media via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*; XP ISO/TS 19590:20178; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2017.
28. Joint Committee for Guides in Metrology. *Evaluation of Measurement Data—Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; JCGM 100:2008; Joint Committee for Guides in Metrology: Paris, France, 2008.
29. Cohen, E.R.; Cvitas, T.; Frey, J.G.; Holmström, B.; Kuchitsu, K.; Marquardt, R.; Mills, I.; Pavese, F.; Quack, M.; Stohner, J.; et al. *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*, 3rd ed.; IUPAC Green Book; IUPAC & RSC Publishing: Cambridge, UK, 2008.
30. Laborda, F.; Jiménez-Lamana, J.; Bolea, E.; Castillo, J.R. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *J. Anal. Atomic Spectrom.* **2013**, *28*, 1220–1232. [[CrossRef](#)]
31. Hineman, A.; Stephan, C. Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality. *J. Anal. Atomic Spectrom.* **2014**, *29*, 1252–1257. [[CrossRef](#)]
32. Liu, J.; Murphy, K.E.; MacCuspie, R.I.; Winchester, M.R. Capabilities of Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Size Measurement of Nanoparticles: A Case Study on Gold Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3405–3414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tuoriniemi, J.; Cornelis, G.; Hassellöv, M. Size discrimination and detection capabilities of single-particle ICP-MS for environmental analysis of silver nanoparticles. *Anal. Chem.* **2012**, *29*, 743–752. [[CrossRef](#)]
34. International Organization for Standardization. *Conformity Assessment—General Requirements for Proficiency Testing*; NF EN ISO/CEI 17043:2010; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2010.
35. Lee, S.; Bi, X.; Reed, R.B.; Ranville, J.F.; Herckes, P.; Westerhoff, P. Nanoparticle Size Detection Limits by Single Particle ICP-MS for 40 Elements. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 10291–10300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Espinosa, A.; Curcio, A.; Cabana, S.; Radtke, G.; Bugnet, M.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Péchoux, C.; Alvarez-Lorenzo, C.; Botton, G.A.; Silva, A.K.A.; et al. Intracellular Biodegradation of Ag Nanoparticles, Storage in Ferritin, and Protection by a Au Shell for Enhanced Photothermal Therapy. *ACS Nano* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cruje, C.; Chithrani, B.D. Integration of Peptides for Enhanced Uptake of PEGylated Gold Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 2125–2131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Unciti-Broceta, J.D.; Cano-Cortés, V.; Altea-Manzano, P.; Pernagallo, S.; Díaz-Mochón, J.J.; Sánchez-Martín, R.M. Number of Nanoparticles per Cell through a Spectrophotometric Method—A key parameter to Assess Nanoparticle-based Cellular Assays. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Coulter, J.A.; Jain, S.; Butterworth, K.T.; Taggart, L.E.; Dickson, G.R.; McMahon, S.J.; Hyland, W.B.; Muir, M.F.; Trainor, C.; Hounsell, A.R.; et al. Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 2673–2685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Références bibliographiques

- A**bdalla, A. M. E., Xiao, L., Ullah, M. W., Yu, M., Ouyang, C., & Yang, G. (2018). Current Challenges of Cancer Anti-angiogenic Therapy and the Promise of Nanotherapeutics. *Theranostics*, *8*(2), 533-548. <https://doi.org/10.7150/thno.21674>
- Acosta Jimenez, A. J. (2016). *Les nanotechnologies : À la découverte d'un cosmos en miniature. Chapitre : Evolution des nanotechnologies et importance actuelle.* (p. 15-42).
- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. W. (2012). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *14*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>
- Aleskandarany, M. A., Vandenberghe, M. E., Marchiò, C., Ellis, I. O., Sapino, A., & Rakha, E. A. (2018). Tumour Heterogeneity of Breast Cancer : From Morphology to Personalised Medicine. *Pathobiology*, *85*(1-2), 23-34. <https://doi.org/10.1159/000477851>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(7), 3983-3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Arnold, C. R., Mangesius, J., Skvortsova, I.-I., & Ganswindt, U. (2020). The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Frontiers in Oncology*, *10*, 164. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00164>
- Asna, N., Livoff, A., Batash, R., Debbi, R., Schaffer, P., Rivkind, T., & Schaffer, M. (2018). Radiation therapy and immunotherapy—A potential combination in cancer treatment. *Current Oncology*, *25*(5). <https://doi.org/10.3747/co.25.4002>
- Attalla, S., Taifour, T., Bui, T., & Muller, W. (2020). Insights from transgenic mouse models of PyMT-induced breast cancer : Recapitulating human breast cancer progression in vivo. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01560-0>
- B**adve, S., & Nakshatri, H. (2012). Breast-cancer stem cells—Beyond semantics. *The Lancet Oncology*, *13*(1), e43-e48. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70191-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70191-7)
- Balaji, K., Subramanian, B., Yadav, P., Anu Radha, C., & Ramasubramanian, V. (2016). Radiation therapy for breast cancer : Literature review. *Medical Dosimetry*, *41*(3), 253-257. <https://doi.org/10.1016/j.meddos.2016.06.005>
- Banin Hirata, B. K., Oda, J. M. M., Losi Guembarovski, R., Ariza, C. B., Oliveira, C. E. C. de, & Watanabe, M. A. E. (2014). Molecular Markers for Breast Cancer : Prediction on Tumor Behavior. *Disease Markers*, *2014*, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2014/513158>
- Barnett, G. C., West, C. M. L., Dunning, A. M., Elliott, R. M., Coles, C. E., Pharoah, P. D. P., & Burnet, N. G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy : Towards tailoring treatment dose by genotype. *Nature Reviews Cancer*, *9*(2), 134-142. <https://doi.org/10.1038/nrc2587>
- Barthés-Labrousse, M.-G. (1995). The Auger Effect. *Microscopy Microanalysis Microstructures*, *6*(3), 253-262. <https://doi.org/10.1051/mmm:1995122>

- Bazak, R., Hourri, M., El Achy, S., Hussein, W., & Refaat, T. (2014). Passive targeting of nanoparticles to cancer : A comprehensive review of the literature. *Molecular and Clinical Oncology*, 2(6), 904-908. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.356>
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles : Journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218-4244. <https://doi.org/10.1039/C6CS00636A>
- Beik, J., Abed, Z., Ghoreishi, F. S., Hosseini-Nami, S., Mehrzadi, S., Shakeri-Zadeh, A., & Kamrava, S. K. (2016). Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy : From fundamental principles to advanced applications. *Journal of Controlled Release*, 235, 205-221. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.062>
- Benveniste, M. F., Gomez, D., Carter, B. W., Betancourt Cuellar, S. L., Shroff, G. S., Benveniste, A. P. A., Odisio, E. G., & Marom, E. M. (2019). Recognizing Radiation Therapy–related Complications in the Chest. *RadioGraphics*, 39(2), 344-366. <https://doi.org/10.1148/rg.2019180061>
- Bill, R., & Christofori, G. (2015). The relevance of EMT in breast cancer metastasis : Correlation or causality? *FEBS Letters*, 589(14), 1577-1587. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.002>
- Birzele, F., Voss, E., Nopora, A., Honold, K., Heil, F., Lohmann, S., Verheul, H., Le Tourneau, C., Delord, J.-P., van Herpen, C., Mahalingam, D., Coveler, A. L., Meresse, V., Weigand, S., Runza, V., & Cannarile, M. (2015). CD44 Isoform Status Predicts Response to Treatment with Anti-CD44 Antibody in Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 21(12), 2753-2762. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2141>
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941-951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>
- Bonvalot, S., Le Pechoux, C., De Baere, T., Kantor, G., Buy, X., Stoeckle, E., Terrier, P., Sargos, P., Coindre, J. M., Lassau, N., Ait Sarkouh, R., Dimitriu, M., Borghi, E., Levy, L., Deutsch, E., & Soria, J.-C. (2017). First-in-Human Study Testing a New Radioenhancer Using Nanoparticles (NBTXR3) Activated by Radiation Therapy in Patients with Locally Advanced Soft Tissue Sarcomas. *Clinical Cancer Research*, 23(4), 908-917. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1297>
- Bonvalot, S., Rutkowski, P. L., Thariat, J., Carrère, S., Ducassou, A., Sunyach, M.-P., Agoston, P., Hong, A., Mervoyer, A., Rastrelli, M., Moreno, V., Li, R. K., Tiangco, B., Herraiez, A. C., Gronchi, A., Mangel, L., Sy-Ortin, T., Hohenberger, P., de Baère, T., ... Papai, Z. (2019). NBTXR3, a first-in-class radioenhancer hafnium oxide nanoparticle, plus radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with locally advanced soft-tissue sarcoma (Act.In.Sarc) : A multicentre, phase 2–3, randomised, controlled trial. *The Lancet Oncology*, 20(8), 1148-1159. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30326-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30326-2)
- Boustani, Grapin, Laurent, Apetoh, & Mirjolet. (2019). The 6th R of Radiobiology : Reactivation of Anti-Tumor Immune Response. *Cancers*, 11(6), 860. <https://doi.org/10.3390/cancers11060860>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.

<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- Bright, S., & Kadhim, M. (2018). The future impacts of non-targeted effects. *International Journal of Radiation Biology*, *94*(8), 727-736. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1454617>
- Brill-Karniely, Y., Dror, D., Duanis-Assaf, T., Goldstein, Y., Schwob, O., Millo, T., Orehov, N., Stern, T., Jaber, M., Loyfer, N., Vosk-Artzi, M., Benyamini, H., Bielenberg, D., Kaplan, T., Buganim, Y., Reches, M., & Benny, O. (2020). Triangular correlation (TrC) between cancer aggressiveness, cell uptake capability, and cell deformability. *Science Advances*, *6*(3), eaax2861. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2861>
- Bromma, K., Bannister, A., Kowalewski, A., Cicon, L., & Chithrani, D. B. (2020). Elucidating the fate of nanoparticles among key cell components of the tumor microenvironment for promoting cancer nanotechnology. *Cancer Nanotechnology*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s12645-020-00064-6>
- Brun, E., Sanche, L., & Sicard-Roselli, C. (2009). Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *72*(1), 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.025>
- Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Currell, F. J., & Prise, K. M. (2012). Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale*, *4*(16), 4830. <https://doi.org/10.1039/c2nr31227a>
- Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Taggart, L. E., & Prise, K. M. (2013). Radiosensitization by gold nanoparticles: Effective at megavoltage energies and potential role of oxidative stress. *Translational Cancer Research*, *2*(4), 11.
- Butterworth, K. T., Nicol, J. R., Ghita, M., Rosa, S., Chaudhary, P., McGarry, C. K., McCarthy, H. O., Jimenez-Sanchez, G., Bazzi, R., Roux, S., Tillement, O., Coulter, J. A., & Prise, K. M. (2016). Preclinical evaluation of gold-DTDTPA nanoparticles as theranostic agents in prostate cancer radiotherapy. *Nanomedicine*, *11*(16), 2035-2047. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0062>
- Byrne, H., McNamara, A., & Kuncic, Z. (2019). IMPACT OF NANOPARTICLE CLUSTERING ON DOSE RADIO-ENHANCEMENT. *Radiation Protection Dosimetry*, *183*(1-2), 50-54. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncy218>
- C**ai, Z., Cao, Y., Luo, Y., Hu, H., & Ling, H. (2018). Signalling mechanism(s) of epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cells in tumour therapeutic resistance. *Clinica Chimica Acta*, *483*, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.04.033>
- Calavia, P. G., Bruce, G., Pérez-García, L., & Russell, D. A. (2018). Photosensitizer-gold nanoparticle conjugates for photodynamic therapy of cancer. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *17*(11), 1534-1552. <https://doi.org/10.1039/C8PP00271A>
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, *331*(6024), 1559-1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>
- Chaffer, Christine L., San Juan, B. P., Lim, E., & Weinberg, R. A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, *35*(4), 645-654. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9648-7>

- Chandarana, H., Wang, H., Tijssen, R. H. N., & Das, I. J. (2018). Emerging role of MRI in radiation therapy : Emerging Role of MRI in Radiation Therapy. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 48(6), 1468-1478. <https://doi.org/10.1002/jmri.26271>
- Charbgoon, F., Nejabat, M., Abnous, K., Soltani, F., Taghdisi, S. M., Alibolandi, M., Thomas Shier, W., Steele, T. W. J., & Ramezani, M. (2018). Gold nanoparticle should understand protein corona for being a clinical nanomaterial. *Journal of Controlled Release*, 272, 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.002>
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression : Therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>
- Cheng, N. N., Starkewolf, Z., Davidson, R. A., Sharmah, A., Lee, C., Lien, J., & Guo, T. (2012). Chemical Enhancement by Nanomaterials under X-ray Irradiation. *Journal of the American Chemical Society*, 134(4), 1950-1953. <https://doi.org/10.1021/ja210239k>
- Cheng, Z., Zaki, A. A., Hui, J. Z., Muzykantov, V. R., & Tsourkas, A. (2012). Multifunctional Nanoparticles : Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6109), 903-910. <https://doi.org/10.1126/science.1226338>
- Cheung, K. (2006). Intensity modulated radiotherapy : Advantages, limitations and future development. *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, 2(1). <https://doi.org/10.2349/bij.2.1.e19>
- Cho, E. C., Zhang, Q., & Xia, Y. (2011). The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 6(6), 385-391. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.58>
- Clift, R., Souratha, J., Garrovillo, S. A., Zimmerman, S., & Blouw, B. (2019). Remodeling the Tumor Microenvironment Sensitizes Breast Tumors to Anti-Programmed Death-Ligand 1 Immunotherapy. *Cancer Research*, 79(16), 4149-4159. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3060>
- Corallino, S., Malabarba, M. G., Zobel, M., Di Fiore, P. P., & Scita, G. (2015). Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity Harnesses Endocytic Circuitries. *Frontiers in Oncology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00045>
- Cottu, P., & Delaloue, S. (2019). *Cancer du sein : Attitudes diagnostiques et thérapeutiques, protocole de traitement 2019-2020*.
- Cui, L., Her, S., Borst, G. R., Bristow, R. G., Jaffray, D. A., & Allen, C. (2017). Radiosensitization by gold nanoparticles : Will they ever make it to the clinic? *Radiotherapy and Oncology*, 124(3), 344-356. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.07.007>
- Cui, L., Tse, K., Zahedi, P., Harding, S. M., Zafarana, G., Jaffray, D. A., Bristow, R. G., & Allen, C. (2014). Hypoxia and Cellular Localization Influence the Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles (AuNPs) in Breast Cancer Cells. *Radiation Research*, 182(5), 475-488. <https://doi.org/10.1667/RR13642.1>

Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131-3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>

Delalogue, S., & Marsiglia, H. (2005). Bases génétiques de la radiosensibilité des cancers du sein. *Cancer/Radiothérapie*, 9(2), 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2004.11.003>

Dieci, M. V., Orvieto, E., Dominici, M., Conte, P., & Guarneri, V. (2014). Rare Breast Cancer Subtypes : Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. *The Oncologist*, 19(8), 805-813. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0108>

Donahue, N. D., Acar, H., & Wilhelm, S. (2019). Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 143, 68-96. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>

Duffy, M. J., Harbeck, N., Nap, M., Molina, R., Nicolini, A., Senkus, E., & Cardoso, F. (2017). Clinical use of biomarkers in breast cancer : Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European Journal of Cancer*, 75, 284-298. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.017>

European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection. (2014). *Titanium dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105 : Characterisation and physico chemical properties*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2788/79554>

Evans, R., & Beiser, A. (1955). *The Atomic Nucleus*. <https://doi.org/10.1063/1.3059850>

Faraday, M. (1857). *The Bakerian Lecture : Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light*. 38.

Farhood, B., Goradel, N. H., Mortezaee, K., Khanlarkhani, N., Salehi, E., Nashtaei, M. S., Mirtavoosmahyari, H., Motevaseli, E., Shabeeb, D., Musa, A. E., & Najafi, M. (2019). Melatonin as an adjuvant in radiotherapy for radioprotection and radiosensitization. *Clinical and Translational Oncology*, 21(3), 268-279. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1934-0>

Farjadian, F., Ghasemi, A., Gohari, O., Roointan, A., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2019). Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market : Challenges and opportunities. *Nanomedicine*, 14(1), 93-126. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0120>

Fertil, B., & Malaise, E.-P. (1981). Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 7(5), 621-629. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(81\)90377-1](https://doi.org/10.1016/0360-3016(81)90377-1)

Franco, S., Szczesna, K., Iliou, M. S., Al-Qahtani, M., Mobasher, A., Kobolák, J., & Dinnyés, A. (2016). In vitro models of cancer stem cells and clinical applications. *BMC Cancer*, 16(S2), 738. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2774-3>

Gatto, F., Moglianetti, M., Pompa, P., & Bardi, G. (2018). Platinum Nanoparticles Decrease Reactive Oxygen Species and Modulate Gene Expression without Alteration of Immune Responses in

- THP-1 Monocytes. *Nanomaterials*, 8(6), 392. <https://doi.org/10.3390/nano8060392>
- Gilles, M., Brun, E., & Sicard-Roselli, C. (2014). Gold nanoparticles functionalization notably decreases radiosensitization through hydroxyl radical production under ionizing radiation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 770-777. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.028>
- Ginestier, C. (2017). Cellules souches cancéreuses : Définition et techniques d'isolement. *Bulletin du Cancer*, 104(12), 1060-1063. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.10.009>
- Ginsburg, O., Bray, F., Coleman, M. P., Vanderpuye, V., Eniu, A., Kotha, S. R., Sarker, M., Huong, T. T., Allemani, C., Dvaladze, A., Gralow, J., Yeates, K., Taylor, C., Oomman, N., Krishnan, S., Sullivan, R., Kombe, D., Blas, M. M., Parham, G., ... Conteh, L. (2017). The global burden of women's cancers : A grand challenge in global health. *The Lancet*, 389(10071), 847-860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31392-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31392-7)
- Golden, E. B., Chhabra, A., Chachoua, A., Adams, S., Donach, M., Fenton-Kerimian, M., Friedman, K., Ponzo, F., Babb, J. S., Goldberg, J., Demaria, S., & Formenti, S. C. (2015). Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours : A proof-of-principle trial. *The Lancet Oncology*, 16(7), 795-803. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00054-6)
- Grall, R., Girard, H., Saad, L., Petit, T., Gesset, C., Combis-Schlumberger, M., Paget, V., Delic, J., Arnault, J.-C., & Chevillard, S. (2015). Impairing the radioresistance of cancer cells by hydrogenated nanodiamonds. *Biomaterials*, 61, 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.034>
- Gray, M., Turnbull, A. K., Ward, C., Meehan, J., Martínez-Pérez, C., Bonello, M., Pang, L. Y., Langdon, S. P., Kunkler, I. H., Murray, A., & Argyle, D. (2019). Development and characterisation of acquired radioresistant breast cancer cell lines. *Radiation Oncology*, 14(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1268-2>
- Guglielmi, V., Carton, F., Vattermi, G., Arpicco, S., Stella, B., Berlier, G., Marengo, A., Boschi, F., & Malatesta, M. (2019). Uptake and intracellular distribution of different types of nanoparticles in primary human myoblasts and myotubes. *International Journal of Pharmaceutics*, 560, 347-356. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.017>
- Hainfeld, J. F., Dilmanian, F. A., Slatkin, D. N., & Smilowitz, H. M. (2008). Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(8), 977-985. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.8.0005>
- Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., & Smilowitz, H. M. (2004). The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine and Biology*, 49(18), N309-N315. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/18/N03>
- Halamoda-Kenzaoui, B., Ceridono, M., Urbán, P., Bogni, A., Ponti, J., Gioria, S., & Kinsner-Ovaskainen, A. (2017). The agglomeration state of nanoparticles can influence the mechanism of their cellular internalisation. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0281-6>
- Han, X., Alu, A., Xiao, Y., Wei, Y., & Wei, X. (2020). Hyperprogression : A novel response pattern under immunotherapy. *Clinical and Translational Medicine*, 10(5). <https://doi.org/10.1002/ctm2.167>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- HAS. (2019). *Utilité clinique des signatures génomiques dans le cancer du sein de stade précoce* (p. 63). HAS, Haute autorité de santé.
- He, L., Wang, Y., Wu, Q., Song, Y., Ma, X., Zhang, B., Wang, H., & Huang, Y. (2020). Association between levels of tumor-infiltrating lymphocytes in different subtypes of primary breast tumors and prognostic outcomes : A meta-analysis. *BMC Women's Health*, 20. <https://doi.org/10.1186/s12905-020-01038-x>
- Heldin, P., Basu, K., Kozlova, I., & Porsch, H. (2014). HAS2 and CD44 in Breast Tumorigenesis. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 123, p. 211-229). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800092-2.00008-3>
- Her, S., Jaffray, D. A., & Allen, C. (2017). Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy : Mechanisms and recent advancements. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109, 84-101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.012>
- Heuskin, A., Gallez, B., Feron, O., Martinive, P., Michiels, C., & Lucas, S. (2017). Metallic nanoparticles irradiated by low-energy protons for radiation therapy : Are there significant physical effects to enhance the dose delivery? *Medical Physics*, 44(8), 4299-4312. <https://doi.org/10.1002/mp.12362>
- Horikoshi, S., & Serpone, N. (2013). Introduction to Nanoparticles. In S. Horikoshi & N. Serpone (Éds.), *Microwaves in Nanoparticle Synthesis* (p. 1-24). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527648122.ch1>
- Howard, D., Sebastian, S., Le, Q. V.-C., Thierry, B., & Kempson, I. (2020). Chemical Mechanisms of Nanoparticle Radiosensitization and Radioprotection : A Review of Structure-Function Relationships Influencing Reactive Oxygen Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 579. <https://doi.org/10.3390/ijms21020579>
- Hu, Z. I., Ho, A. Y., & McArthur, H. L. (2017). Combined Radiation Therapy and Immune Checkpoint Blockade Therapy for Breast Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*, 99(1), 153-164. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.05.029>
- INCa, I. N. du C. (2019). *Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018* (p. 20). Institut National du Cancer, INCa.
- Ingthorsson, S., Briem, E., Bergthorsson, J. T., & Gudjonsson, T. (2016). Epithelial Plasticity During Human Breast Morphogenesis and Cancer Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 21(3-4), 139-148. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9366-3>
- Insua-Rodríguez, J., & Oskarsson, T. (2016). The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.017>

- Jabbari, N., Nawaz, M., & Rezaie, J. (2019). Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells : A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3649. <https://doi.org/10.3390/ijms20153649>
- Jain, S., Coulter, J. A., Butterworth, K. T., Hounsell, A. R., McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Dickson, G. R., Prise, K. M., Currell, F. J., Hirst, D. G., & O'Sullivan, J. M. (2014). Gold nanoparticle cellular uptake, toxicity and radiosensitisation in hypoxic conditions. *Radiotherapy and Oncology*, 110(2), 342-347. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.12.013>
- Jain, S., Coulter, J. A., Hounsell, A. R., Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Dickson, G. R., Prise, K. M., Currell, F. J., O'Sullivan, J. M., & Hirst, D. G. (2011). Cell-Specific Radiosensitization by Gold Nanoparticles at Megavoltage Radiation Energies. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 79(2), 531-539. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.08.044>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 1050-1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Jiang, Y., Huo, S., Mizuhara, T., Das, R., Lee, Y.-W., Hou, S., Moyano, D. F., Duncan, B., Liang, X.-J., & Rotello, V. M. (2015). The Interplay of Size and Surface Functionality on the Cellular Uptake of Sub-10 nm Gold Nanoparticles. *ACS nano*, 9(10), 9986-9993. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b03521>
- Jiménez Sánchez, G., Maury, P., Stefancikova, L., Campion, O., Laurent, G., Chateau, A., Bouraleh Hoch, F., Boschetti, F., Denat, F., Pinel, S., Devy, J., Porcel, E., Lacombe, S., Bazzi, R., & Roux, S. (2019). Fluorescent Radiosensitizing Gold Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4618. <https://doi.org/10.3390/ijms20184618>
- Johnston, S. T., Faria, M., & Crampin, E. J. (2020). Isolating the sources of heterogeneity in nano-engineered particle-cell interactions. *Journal of the Royal Society, Interface*, 17(166), 20200221. <https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0221>
- Kalinowski, L., Saunus, J. M., McCart Reed, A. E., & Lakhani, S. R. (2019). Breast Cancer Heterogeneity in Primary and Metastatic Disease. In A. Ahmad (Éd.), *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance* (Vol. 1152, p. 75-104). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_6
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Keld Alstrup Jensen, Yahia Kembouche, Elzbieta, Christiansen, Nicklas R Jacobsen, and Håkan Wallin, Camille Guiot and Olivier Spalla, & Olivier Witschger. (2009). *Towards a method for detecting the potential genotoxicity of nanoparticles/ The generic NANOGENOTOX dispersion protocol.*
- Khetan, J., Shahinuzzaman, M., Barua, S., & Barua, D. (2019). Quantitative Analysis of the Correlation between Cell Size and Cellular Uptake of Particles. *Biophysical Journal*, 116(2), 347-359. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.3134>

- Kim, Lee, Seo, Kim, Kim, Kim, Kang, Seong, Youn, & Youn. (2019). Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells*, 8(9), 1105. <https://doi.org/10.3390/cells8091105>
- Kimbung, S., Loman, N., & Hedenfalk, I. (2015). Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases. *Seminars in Cancer Biology*, 35, 85-95. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.08.009>
- Knudson, W., Chow, G., & Knudson, C. B. (2002). CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 21(1), 15-23. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(01\)00186-x](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(01)00186-x)
- Konge, J., Leteurtre, F., Goislard, M., Biard, D., Morel-Altmeier, S., Vaurijoux, A., Gruel, G., Chevillard, S., & Lebeau, J. (2018). Breast cancer stem cell-like cells generated during TGFβ-induced EMT are radioresistant. *Oncotarget*, 9(34), 23519-23531. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25240>
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., & He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines : Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>
- Kuncic, Z., & Lacombe, S. (2018). Nanoparticle radio-enhancement : Principles, progress and application to cancer treatment. *Physics in Medicine & Biology*, 63(2), 02TR01. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aa99ce>
- Kwatra, D., Venugopal, A., & Anant, S. (2013). Nanoparticles in radiation therapy : A summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Translational Cancer Research*, 2(4), 13.
- Lagadec, C., Dekmezian, C., Bauché, L., & Pajonk, F. (2012). Oxygen Levels Do Not Determine Radiation Survival of Breast Cancer Stem Cells. *PLoS ONE*, 7(3), e34545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034545>
- Lara, P. C., López-Peñalver, J. J., Farias, V. de A., Ruiz-Ruiz, M. C., Oliver, F. J., & Ruiz de Almodóvar, J. M. (2015). Direct and bystander radiation effects : A biophysical model and clinical perspectives. *Cancer Letters*, 356(1), 5-16. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.006>
- Lee, S. Y., Jeong, E. K., Ju, M. K., Jeon, H. M., Kim, M. Y., Kim, C. H., Park, H. G., Han, S. I., & Kang, H. S. (2017). Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Molecular Cancer*, 16(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0577-4>
- Lesniak, A., Salvati, A., Santos-Martinez, M. J., Radomski, M. W., Dawson, K. A., & Åberg, C. (2013). Nanoparticle Adhesion to the Cell Membrane and Its Effect on Nanoparticle Uptake Efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, 135(4), 1438-1444. <https://doi.org/10.1021/ja309812z>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect : How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Lin, C.-Y., Barry-Holson, K. Q., & Allison, K. H. (2016). Breast cancer stem cells : Are we ready to go from bench to bedside? *Histopathology*, 68(1), 119-137. <https://doi.org/10.1111/his.12868>

- Liu, Y., Zhang, P., Li, F., Jin, X., Li, J., Chen, W., & Li, Q. (2018). Metal-based *NanoEnhancers* for Future Radiotherapy : Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells. *Theranostics*, *8*(7), 1824-1849. <https://doi.org/10.7150/thno.22172>
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, *481*(7381), 287-294. <https://doi.org/10.1038/nature10760>
- Lu, W., & Kang, Y. (2019). Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Developmental Cell*, *49*(3), 361-374. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.010>
- Luo, M., Shang, L., Brooks, M. D., Jiagge, E., Zhu, Y., Buschhaus, J. M., Conley, S., Fath, M. A., Davis, A., Gheordunescu, E., Wang, Y., Harouaka, R., Lozier, A., Triner, D., McDermott, S., Merajver, S. D., Luker, G. D., Spitz, D. R., & Wicha, M. S. (2018). Targeting Breast Cancer Stem Cell State Equilibrium through Modulation of Redox Signaling. *Cell Metabolism*, *28*(1), 69-86.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.006>
- M**a, D., Jiang, Y.-Z., Liu, X.-Y., Liu, Y.-R., & Shao, Z.-M. (2017). Clinical and molecular relevance of mutant-allele tumor heterogeneity in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *162*(1), 39-48. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4113-z>
- Ma, N., Wu, F.-G., Zhang, X., Jiang, Y.-W., Jia, H.-R., Wang, H.-Y., Li, Y.-H., Liu, P., Gu, N., & Chen, Z. (2017). Shape-Dependent Radiosensitization Effect of Gold Nanostructures in Cancer Radiotherapy : Comparison of Gold Nanoparticles, Nanospikes, and Nanorods. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *9*(15), 13037-13048. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01112>
- MacParland, S. A., Tsoi, K. M., Ouyang, B., Ma, X.-Z., Manuel, J., Fawaz, A., Ostrowski, M. A., Alman, B. A., Zilman, A., Chan, W. C. W., & McGilvray, I. D. (2017). Phenotype Determines Nanoparticle Uptake by Human Macrophages from Liver and Blood. *ACS Nano*, *11*(3), 2428-2443. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06245>
- Maeda, H., Tsukigawa, K., & Fang, J. (2015). A Retrospective 30 Years After Discovery of the EPR Effect of Solid Tumors : Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic-therapy—Problems, Solutions, Prospects. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, *23*. <https://doi.org/10.1111/micc.12228>
- Maggiorella, L., Barouch, G., Devaux, C., Pottier, A., Deutsch, E., Bourhis, J., Borghi, E., & Levy, L. (2012). Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncology*, *8*(9), 1167-1181. <https://doi.org/10.2217/fon.12.96>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. Ng., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, *133*(4), 704-715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Marill, J., Anesary, N. M., Zhang, P., Vivet, S., Borghi, E., Levy, L., & Pottier, A. (2014). Hafnium oxide nanoparticles : Toward an in vitro predictive biological effect? *Radiation Oncology*, *9*(1), 150. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-9-150>
- Marill, J., Mohamed Anesary, N., & Paris, S. (2019). DNA damage enhancement by radiotherapy-activated hafnium oxide nanoparticles improves cGAS-STING pathway activation in human

- colorectal cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 141, 262-266. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.07.029>
- Masood, S. (2016). Breast Cancer Subtypes : Morphologic and Biologic Characterization. *Women's Health*, 12(1), 103-119. <https://doi.org/10.2217/whe.15.99>
- Matsudaira, H., Ueno, A. M., & Furuno, I. (1980). Iodine Contrast Medium Sensitizes Cultured Mammalian Cells to X Rays but Not to γ Rays. *Radiation Research*, 84(1), 144-148. <https://doi.org/10.2307/3575225>
- Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy : Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research*, 46(12 Part 1), 6387-6392.
- McGranahan, N., & Swanton, C. (2017). Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution : Past, Present, and the Future. *Cell*, 168(4), 613-628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.018>
- Mehrnia, S. S., Hashemi, B., Mowla, S. J., & Arbabi, A. (2017). Enhancing the effect of 4 MeV electron beam using gold nanoparticles in breast cancer cells. *Physica Medica*, 35, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2017.02.014>
- Mehta, M., Griffith, J., Panneerselvam, J., Babu, A., Mani, J., Herman, T., Ramesh, R., & Munshi, A. (2020). Regorafenib sensitizes human breast cancer cells to radiation by inhibiting multiple kinases and inducing DNA damage. *International Journal of Radiation Biology*, 0(0), 1-12. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1730012>
- Misra, S., Hascall, V. C., Markwald, R. R., & Ghatak, S. (2015). Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201>
- Mondini, M., Levy, A., Meziani, L., Milliat, F., & Deutsch, E. (2020). Radiotherapy–immunotherapy combinations – perspectives and challenges. *Molecular Oncology*, 14(7), 1529-1537. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12658>
- Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7(12), 779-786. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>
- Monslow, J., Govindaraju, P., & Puré, E. (2015). Hyaluronan—A Functional and Structural Sweet Spot in the Tissue Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00231>
- Moore, T. L., Urban, D. A., Rodriguez-Lorenzo, L., Milosevic, A., Crippa, F., Spuch-Calvar, M., Balog, S., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M., & Petri-Fink, A. (2019). Nanoparticle administration method in cell culture alters particle-cell interaction. *Scientific Reports*, 9(1), 900. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36954-4>
- Morales-Orue, I., Chicas-Sett, R., & Lara, P. C. (2019). Nanoparticles as a promising method to enhance the abscopal effect in the era of new targeted therapies. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 24(1), 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2018.11.001>
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of Breast

- Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*, 3(8), e2888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>
- Moustakas, A., & Heldin, P. (2014). TGF β and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), 2621-2634. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.004>
- Mueller, C., Haymond, A., Davis, J. B., Williams, A., & Espina, V. (2018). Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. *Expert Review of Proteomics*, 15(2), 131-152. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1421071>
- Müller, S., Sindikubwabo, F., Cañeque, T., Lafon, A., Versini, A., Lombard, B., Loew, D., Wu, T.-D., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Durand, A., Vallot, C., Baulande, S., Servant, N., & Rodriguez, R. (2020). CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *Nature Chemistry*, 12(10), 929-938. <https://doi.org/10.1038/s41557-020-0513-5>
- N**akamura, Y., Mochida, A., Choyke, P. L., & Kobayashi, H. (2016). Nano-drug delivery : Is the enhanced permeability and retention (EPR) effect sufficient for curing cancer? *Bioconjugate chemistry*, 27(10), 2225-2238. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00437>
- Nallanthighal, S., Heiserman, J. P., & Cheon, D.-J. (2019). The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00086>
- Ngwa, W., Irabor, O. C., Schoenfeld, J. D., Hesser, J., Demaria, S., & Formenti, S. C. (2018). Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nature Reviews Cancer*, 18(5), 313-322. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.6>
- Nicol, J. R., Harrison, E., O'Neill, S. M., Dixon, D., McCarthy, H. O., & Coulter, J. A. (2018). Unraveling the cell-type dependent radiosensitizing effects of gold through the development of a multifunctional gold nanoparticle. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(2), 439-449. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.019>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT : 2016. *Cell*, 166(1), 21-45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- O**livares-Urbano, M. A., Griñán-Lisón, C., Marchal, J. A., & Núñez, M. I. (2020). CSC Radioresistance : A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells*, 9(7), 1651. <https://doi.org/10.3390/cells9071651>
- P**admanabhan, P., Kumar, A., Kumar, S., Chaudhary, R. K., & Gulyás, B. (2016). Nanoparticles in practice for molecular-imaging applications : An overview. *Acta Biomaterialia*, 41, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.003>
- Pagáčová, E., Štefančíková, L., Schmidt-Kaler, F., Hildenbrand, G., Vičar, T., Depeš, D., Lee, J.-H., Bestvater, F., Lacombe, S., Porcel, E., Roux, S., Wenz, F., Kopečná, O., Falková, I., Hausmann, M., & Falk, M. (2019). Challenges and Contradictions of Metal Nano-Particle Applications for Radio-Sensitivity Enhancement in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 588. <https://doi.org/10.3390/ijms20030588>

Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Reviews*, 8(2), 98-101.

Patel, S., Kim, J., Herrera, M., Mukherjee, A., Kabanov, A. V., & Sahay, G. (2019). Brief update on endocytosis of nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 144, 90-111. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.08.004>

Peitzsch, C., Kurth, I., Ebert, N., Dubrovskaya, A., & Baumann, M. (2019). Cancer stem cells in radiation response : Current views and future perspectives in radiation oncology. *International Journal of Radiation Biology*, 95(7), 900-911. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589023>

Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-Puebla, R. A., Alves, F., Andrews, A. M., Ashraf, S., Balogh, L. P., Ballerini, L., Bestetti, A., Brendel, C., Bosi, S., Carril, M., Chan, W. C. W., Chen, C., Chen, X., Chen, X., Cheng, Z., Cui, D., Du, J., ... Parak, W. J. (2017). Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*, 11(3), 2313-2381. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06040>

Penninckx, S., Heuskin, A.-C., Michiels, C., & Lucas, S. (2020). Gold Nanoparticles as a Potent Radiosensitizer : A Transdisciplinary Approach from Physics to Patient. *Cancers*, 12(8), 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers12082021>

Pickup, M. W., Mouw, J. K., & Weaver, V. M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Reports*, 15(12), 1243-1253. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>

Polf, J. C., Bronk, L. F., Driessen, W. H. P., Arap, W., Pasqualini, R., & Gillin, M. (2011). Enhanced relative biological effectiveness of proton radiotherapy in tumor cells with internalized gold nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 98(19). <https://doi.org/10.1063/1.3589914>

Ponnusamy, L., Mahalingaiah, P. K. S., Chang, Y.-W., & Singh, K. P. (2019). Role of cellular reprogramming and epigenetic dysregulation in acquired chemoresistance in breast cancer. *Cancer Drug Resistance*. <https://doi.org/10.20517/cdr.2018.11>

Porcel, E., Liehn, S., Remita, H., Usami, N., Kobayashi, K., Furusawa, Y., Sech, C. L., & Lacombe, S. (2010). Platinum nanoparticles : A promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology*, 21(8), 085103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/8/085103>

Rabus, H., Gargioni, E., Li, W. B., Nettelbeck, H., & Villagrasa, C. (2019). Determining dose enhancement factors of high- Z nanoparticles from simulations where lateral secondary particle disequilibrium exists. *Physics in Medicine & Biology*, 64(15), 155016. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/ab31d4>

Rastinehad, A. R., Anastos, H., Wajswol, E., Winoker, J. S., Sfakianos, J. P., Doppalapudi, S. K., Carrick, M. R., Knauer, C. J., Taouli, B., Lewis, S. C., Tewari, A. K., Schwartz, J. A., Canfield, S. E., George, A. K., West, J. L., & Halas, N. J. (2019). Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(37), 18590-18596. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906929116>

Reda, M., Bagley, A. F., Zaidan, H. Y., & Yantasee, W. (2020). Augmenting the therapeutic window of radiotherapy : A perspective on molecularly targeted therapies and nanomaterials. *Radiotherapy and Oncology*, 150, 225-235. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.06.041>

Références bibliographiques

- Rees, P., Wills, J. W., Brown, M. R., Barnes, C. M., & Summers, H. D. (2019). The origin of heterogeneous nanoparticle uptake by cells. *Nature Communications*, *10*(1), 2341. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10112-4>
- Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux, n° 696/2011, L 275/38, 3 (2011).
- Ricaud, M., & Witschger, O. (2012). *Les nanomatériaux. Définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention* (p. 52). Institut national de recherche et de sécurité (INRS).
- Rios de la Rosa, J. M., Tirella, A., & Tirelli, N. (2018). Receptor-Targeted Drug Delivery and the (Many) Problems We Know of : The Case of CD44 and Hyaluronic Acid. *Advanced Biosystems*, *2*(6), 1800049. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800049>
- Rosa, S., Connolly, C., Schettino, G., Butterworth, K. T., & Prise, K. M. (2017). Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnology*, *8*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12645-017-0026-0>
- Rycaj, K., & Tang, D. G. (2014). Cancer stem cells and radioresistance. *International Journal of Radiation Biology*, *90*(8), 615-621. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.892227>
- Sabourian, P., Yazdani, G., Ashraf, S. S., Frounchi, M., Mashayekhan, S., Kiani, S., & Kakkar, A. (2020). Effect of Physico-Chemical Properties of Nanoparticles on Their Intracellular Uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 8019. <https://doi.org/10.3390/ijms21218019>
- Salado-Leza, D., Porcel, E., Yang, X., Štefančíková, L., Bolsa-Ferruz, M., Savina, F., Dragoe, D., Guerquin-Kern, J.-L., Wu, T.-D., Hirayama, R., Remita, H., & Lacombe, S. (2020). Green One-Step Synthesis of Medical Nanoagents for Advanced Radiation Therapy. *Nanotechnology, Science and Applications*, *13*, 61-76. <https://doi.org/10.2147/NSA.S257392>
- Sancey, L., Lux, F., Kotb, S., Roux, S., Dufort, S., Bianchi, A., Crémillieux, Y., Fries, P., Coll, J.-L., Rodriguez-Lafrasse, C., Janier, M., Dutreix, M., Barberi-Heyob, M., Boschetti, F., Denat, F., Louis, C., Porcel, E., Lacombe, S., Le Duc, G., ... Tillement, O. (2014). The use of theranostic gadolinium-based nanoproboscopes to improve radiotherapy efficacy. *The British Journal of Radiology*, *87*(1041), 20140134. <https://doi.org/10.1259/bjr.20140134>
- Santamaría, P. G., Moreno-Bueno, G., & Cano, A. (2019). Contribution of Epithelial Plasticity to Therapy Resistance. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(5), 676. <https://doi.org/10.3390/jcm8050676>
- Sasidharan, A., & Monteiro-riviere, N. A. (2015). Biomedical applications of gold nanomaterials : Opportunities. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology*, *7*(December), 779-796. <https://doi.org/10.1002/wnan.1341>
- Schulz, A., Meyer, F., Dubrovskaya, A., & Borgmann, K. (2019). Cancer Stem Cells and Radioresistance : DNA Repair and Beyond. *Cancers*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/cancers11060862>
- Scott, L. E., Weinberg, S. H., & Lemmon, C. A. (2019). Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*, 135. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00135>

- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance : The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(10), 611-629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- Sicard-Roselli, C., Brun, E., Gilles, M., Baldacchino, G., Kelsey, C., McQuaid, H., Polin, C., Wardlow, N., & Currell, F. (2014). A New Mechanism for Hydroxyl Radical Production in Irradiated Nanoparticle Solutions. *Small*, 10(16), 3338-3346. <https://doi.org/10.1002/smll.201400110>
- Sindhvani, S., Syed, A. M., Ngai, J., Kingston, B. R., Maiorino, L., Rothschild, J., MacMillan, P., Zhang, Y., Rajesh, N. U., Hoang, T., Wu, J. L. Y., Wilhelm, S., Zilman, A., Gadde, S., Sulaiman, A., Ouyang, B., Lin, Z., Wang, L., Egeblad, M., & Chan, W. C. W. (2020). The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nature Materials*, 19(5), 566-575. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>
- Singh, P., Pandit, S., Mokkalpati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018). Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1979. <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>
- Smith, B., & Bhowmick, N. (2016). Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), 17. <https://doi.org/10.3390/jcm5020017>
- Song, Z.-M., Chen, N., Liu, J.-H., Tang, H., Deng, X., Xi, W.-S., Han, K., Cao, A., Liu, Y., & Wang, H. (2015). Biological effect of food additive titanium dioxide nanoparticles on intestine : An in vitro study. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 35(10), 1169-1178. <https://doi.org/10.1002/jat.3171>
- Soo Choi, H., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J. P., Iltis Ipe, B., Bawendi, M. G., & Frangioni, J. V. (2007). Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology*, 25(10), 1165-1170. <https://doi.org/10.1038/nbt1340>
- Spadea, A., Rios de la Rosa, J. M., Tirella, A., Ashford, M. B., Williams, K. J., Stratford, I. J., Tirelli, N., & Mehibel, M. (2019). Evaluating the Efficiency of Hyaluronic Acid for Tumor Targeting via CD44. *Molecular Pharmaceutics*, 16(6), 2481-2493. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00083>
- Spiegelberg, L., Houben, R., Niemans, R., de Ruyscher, D., Yaromina, A., Theys, J., Guise, C. P., Smaill, J. B., Patterson, A. V., Lambin, P., & Dubois, L. J. (2019). Hypoxia-activated prodrugs and (lack of) clinical progress : The need for hypoxia-based biomarker patient selection in phase III clinical trials. *Clinical and Translational Radiation Oncology*, 15, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.01.005>
- Steel, G. G., McMillan, T. J., & Peacock, J. H. (1989). The 5Rs of Radiobiology. *International Journal of Radiation Biology*, 56(6), 1045-1048. <https://doi.org/10.1080/09553008914552491>
- Štefančíková, L., Porcel, E., Eustache, P., Li, S., Salado, D., Marco, S., Guerquin-Kern, J.-L., Réfrégiers, M., Tillement, O., Lux, F., & Lacombe, S. (2014). Cell localisation of gadolinium-based nanoparticles and related radiosensitising efficacy in glioblastoma cells. *Cancer Nanotechnology*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12645-014-0006-6>
- Sun, R., Sbai, A., Ganem, G., Boudabous, M., Collin, F., Marcy, P.-Y., Doglio, A., & Thariat, J. (2014). Effets non ciblés (bystander, abscopal) de la radiothérapie externe : Potentielles implications pour le clinicien ? *Cancer/Radiothérapie*, 18(8), 770-778. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2014.08.004>

- Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., & Zhao, J. (2015). Breast Cancer : Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2), 333-338. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>
- Thariat, J., Valable, S., Laurent, C., Haghdoost, S., Pérès, E. A., Bernaudin, M., Sichel, F., Lesueur, P., Césaire, M., Petit, E., Ferré, A. E., Saintigny, Y., Skog, S., Tudor, M., Gérard, M., Thureau, S., Habrand, J.-L., Balosso, J., & Chevalier, F. (2019). Hadrontherapy Interactions in Molecular and Cellular Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010133>
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 4-27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- Tian, S., Roepman, P., van't Veer, L. J., Bernards, R., De Snoo, F., & Glas, A. M. (2010). Biological Functions of the Genes in the Mammprint Breast Cancer Profile Reflect the Hallmarks of Cancer. *Biomarker Insights*, 5, BMI.S6184. <https://doi.org/10.4137/BMI.S6184>
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 25(1), 16-27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
- Torre, Lindsey A., Islami, F., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2017). Global Cancer in Women : Burden and Trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 26(4), 444-457. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0858>
- Udabage, L., Brownlee, G. R., Nilsson, S. K., & Brown, T. J. (2005). The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Experimental Cell Research*, 310(1), 205-217. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.026>
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor Metastasis : Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
- Venkatesan, S., & Swanton, C. (2016). *Tumor Evolutionary Principles : How Intratumor Heterogeneity Influences Cancer Treatment and Outcome*. 9.
- Verry, C., Porcel, E., Chargari, C., Rodriguez-Lafrasse, C., & Balosso, J. (2019). Utilisation de nanoparticules comme agent radiosensibilisant en radiothérapie : Où en est-on ? *Cancer/Radiothérapie*, 23(8), 917-921. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2019.07.134>
- Verry, Camille, Sancey, L., Dufort, S., Le Duc, G., Mendoza, C., Lux, F., Grand, S., Arnaud, J., Quesada, J. L., Villa, J., Tillement, O., & Balosso, J. (2019). Treatment of multiple brain metastases using gadolinium nanoparticles and radiotherapy : NANO-RAD, a phase I study protocol. *BMJ Open*, 9(2), e023591. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023591>
- Vila, L., García-Rodríguez, A., Cortés, C., Velázquez, A., Xamena, N., Sampayo-Reyes, A., Marcos, R., & Hernández, A. (2018). Effects of cerium oxide nanoparticles on differentiated/undifferentiated human intestinal Caco-2 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 283, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.018>

- W**ang, L. V., & Yao, J. (2016). A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences. *Nature Methods*, *13*(8), 627-638. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3925>
- Wang, R., Zhou, T., Liu, W., & Zuo, L. (2018). Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget*, *9*(26), 18637-18647. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24746>
- Wang, X., Hu, X., Li, J., Russe, A. C. M., Kawazoe, N., Yang, Y., & Chen, G. (2016). Influence of cell size on cellular uptake of gold nanoparticles. *Biomaterials Science*, *4*(6), 970-978. <https://doi.org/10.1039/C6BM00171H>
- Wang, Y., Yan, J., Wen, N., Xiong, H., Shundong, C., He, Q., Hu, Y., Peng, D., & Liu, Z. (2019). Metal-organic frameworks for stimuli-responsive drug delivery. *Biomaterials*, *230*, 119619. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119619>
- Wilhelm, S., Tavares, A. J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H. F., & Chan, W. C. W. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, *1*(5), 1-12. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>
- Witschen, P. M., Chaffee, T. S., Brady, N. J., Huggins, D. N., Knutson, T. P., LaRue, R. S., Munro, S. A., Tiegs, L., McCarthy, J. B., Nelson, A. C., & Schwertfeger, K. L. (2020). Tumor Cell Associated Hyaluronan-CD44 Signaling Promotes Pro-Tumor Inflammation in Breast Cancer. *Cancers*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/cancers12051325>
- Y**adav, P., & Shankar, B. S. (2019). Radio resistance in breast cancer cells is mediated through TGF- β signalling, hybrid epithelial-mesenchymal phenotype and cancer stem cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *111*, 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.055>
- Yameen, B., Choi, W. I., Vilos, C., Swami, A., Shi, J., & Farokhzad, O. C. (2014). Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *Journal of Controlled Release*, *190*, 485-499. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.038>
- Yang, C., He, Y., Zhang, H., Liu, Y., Wang, W., Du, Y., & Gao, F. (2015). Selective killing of breast cancer cells expressing activated CD44 using CD44 ligand-coated nanoparticles *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget*, *6*(17), 15283-15296. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3681>
- Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M., & Xia, Y. (2015). Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chemical Reviews*, *115*(19), 10410-10488. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00193>
- Ye, J. C., & Formenti, S. C. (2018). Integration of radiation and immunotherapy in breast cancer—Treatment implications. *The Breast*, *38*, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.12.005>
- Yue, T., Zhou, H., Sun, H., Li, S., Zhang, X., Cao, D., Yi, X., & Yan, B. (2019). Why are nanoparticles trapped at cell junctions when the cell density is high? *Nanoscale*, *11*(14), 6602-6609. <https://doi.org/10.1039/c9nr01024f>
- Yuzhalin, A. E., Lim, S. Y., Kutikhin, A. G., & Gordon-Weeks, A. N. (2018). Dynamic matrisome : ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1870*(2), 207-228. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.09.002>

- Zardavas, D., Irrthum, A., Swanton, C., & Piccart, M. (2015). Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(7), 381-394. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.73>
- Zhang, Darmon, A., Marill, J., Mohamed Anesary, N., & Paris, S. (2020). Radiotherapy-Activated Hafnium Oxide Nanoparticles Produce Abscopal Effect in a Mouse Colorectal Cancer Model. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 3843-3850. <https://doi.org/10.2147/IJN.S250490>
- Zhang, X.-D., Wu, D., Shen, X., Chen, J., Sun, Y.-M., Liu, P.-X., & Liang, X.-J. (2012). Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy. *Biomaterials*, 33(27), 6408-6419. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.047>
- Zhang, Y., & Weinberg, R. A. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer : Complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine*, 12(4), 361-373. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0656-6>
- Zhou, W., Gao, X., Liu, D., & Chen, X. (2015). Gold Nanoparticles for In Vitro Diagnostics. *Chemical Reviews*, 115(19), 10575-10636. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00100>
- Zucker, R. M., Massaro, E. J., Sanders, K. M., Degn, L. L., & Boyes, W. K. (2010). Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 77A(7), 677-685. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20927>

Titre : Place des nanoparticules pour lutter contre la radio-résistance du cancer du sein : impact de l'hétérogénéité tumorale

Mots clés : cancer du sein, radio-résistance, nanoparticules, hétérogénéité tumorale

Résumé : L'utilisation de nanoparticules de haut numéro atomique pour potentialiser les effets de la radiothérapie fait l'objet de nombreux travaux de recherches. Historiquement, l'intérêt porté à ces nanoparticules repose sur un principe d'action physique : en densifiant la matière, les nanoparticules localisées dans une tumeur augmentent localement la probabilité d'interaction des rayonnements ionisants avec celle-ci. L'augmentation de la dose délivrée localement serait alors associée à un stress oxydatif et à une augmentation des lésions de l'ADN. Ainsi la radio-sensibilisation liée aux nanoparticules permettrait d'une part de lutter contre la radio-résistance et d'autre part d'améliorer l'index thérapeutique.

La radiothérapie constitue l'un des piliers du traitement du cancer du sein. Néanmoins, les tumeurs mammaires sont hétérogènes et plusieurs sous populations coexistent avec des sensibilités différentes aux traitements. Les cellules souches cancéreuses (CSC) et le processus de transition épithélio-mésenchymateuses (TEM) contribuent principalement à cette hétérogénéité et confèrent aux cellules tumorales des propriétés de plasticité, de tumorigénicité et de résistance à la mort cellulaire. Dans le cas particulier du cancer du sein, les cellules issues de la TEM et les cellules souches cancéreuses partagent un même phénotype surfacique caractérisé par la perte d'expression de la protéine membranaire CD24 et la surexpression de CD44.

Ce travail de thèse vise à évaluer l'efficacité de nanoparticules

métalliques de nature (or, platine), de taille (5 à 35 nm) et de charges (positives, négatives) différentes comme agents potentialisateurs des effets de l'irradiation sur des modèles de tumeurs mammaires aux statuts épithélio-mésenchymateux différents. Face à la difficulté à mettre en évidence un effet biologique significatif du double traitement *in vitro*, j'ai cherché à comprendre quels paramètres physiques, chimiques et biologiques sont nécessaires pour observer l'effet radio-sensibilisant. L'un des principaux enjeux a été de parvenir à une bonne diffusion des nanoparticules au sein des tumeurs.

Pour comprendre les mécanismes, nous avons comparé la réponse transcriptomique de cellules cancéreuses mammaires, au fond génétique commun mais de phénotype épithélial ou mésenchymateux (triées selon leur niveau d'expression CD24/CD44), exposées à un groupe de nanoparticules de composition physico-chimique différente de manière à s'affranchir d'un l'effet qui serait spécifique à une nanoparticule. L'analyse du transcriptome souligne l'importance des structures membranaires et extracellulaires dans la reconnaissance et l'interaction préférentielle des nanoparticules avec les cellules mésenchymateuses. Ces résultats sont d'autant plus importants que l'identification de gènes et de mécanismes clés favorisant l'accumulation de nanoparticules dans les cellules cancéreuses les plus résistantes aux traitements devrait permettre d'améliorer la conception de nouvelles nanoparticules à haut potentiel thérapeutique.

Title: Influence of tumoral heterogeneity on the effect of nanoparticle used against radioresistance of breast cancer

Keywords: breast cancer, radiation resistance, nanoparticles, tumoral heterogeneity

Abstract: The use of high-Z nanoparticles to enhance radiotherapy effects has gained momentum over the last decade. Historically, as nanoparticles increase tumor density, they were thought to improve radiation dose by locally increasing the probability of interactions with ionizing radiations. Local dose enhancement is then associated with increased oxidative stress and DNA damage. Therefore, radiosensitization with nanoparticles could impair radioresistance as well as improve therapeutic index. Radiotherapy is a cornerstone of breast cancer treatment. However, mammary tumors are heterogeneous and comprise distinct populations of cancer cells that respond differently to treatments. Cancer stem cells (CSC) and epithelial to mesenchymal transition (EMT) are major factors contributing to cancer cells plasticity, tumor heterogeneity, and escape from programmed cell death (apoptosis). In breast cancer, both CSC and cells undergoing EMT are characterized by the expression of two surface markers CD24 and CD44 (CD24-/low, CD44 high).

This work aims to evaluate the efficiency of high-Z nanoparticles of different nature (gold, platinum), different size (from 5 to 35 nm) and different surface charge (positive and negative) as potent radiosensitizer on several breast cancer models of different epithelial or mesenchymal state.

As no significant change could initially be observed *in vitro* following the combination of nanoparticles with radiation compared to radiation alone, I gain insight on the influence of physical, chemical and biological parameters required for characterizing radio-enhancement. Among them, I focused on improving the diffusion of nanoparticles and their internalization in tumor cells.

I showed that nanoparticles uptake by breast cancer cells was depending on their mesenchymal state: nanoparticle internalization by cancer cells is dramatically increased in mesenchymal-like cancer cells compared to epithelial-like cells across a panel of several breast cancer cell lines. Importantly this discrepancy was not affected by the charge, size or surface chemistry of the nanoparticles themselves. This strongly suggests a cell-dependent mechanism, in opposition to the current paradigm that nanoparticles uptake is mainly governed by their inherent physical/chemical properties.

This study emphasized the importance of membrane and extracellular structures in nanoparticle recognition and preferential interaction with cells. Our results are of peculiar interests as the identification of genes or mechanisms facilitating nanoparticles accumulation into radioresistant cancer cells could further conception of promising therapeutic nanoparticles.